

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **033720**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.11.20

(51) Int. Cl. **C07K 16/00** (2006.01)

(21) Номер заявки
201491571

(22) Дата подачи заявки
2013.02.22

(54) МОДИФИЦИРОВАННЫЕ БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА IgG4 С АСИММЕТРИЧНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬЮ

(31) **1203071.4**

(32) **2012.02.22**

(33) **GB**

(43) **2015.02.27**

(86) **PCT/EP2013/053615**

(87) **WO 2013/124451 2013.08.29**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЮСБ ФАРМА С.А. (BE)

(72) Изобретатель:
**Хамфриз Дэвид Пол, Питерс Ширли
Джейн (GB)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) SCHUURMAN J. ET AL.: "The inter-heavy chain disulfide bonds of IgG4 are in equilibrium with intra-chain disulfide bonds", MOLECULAR IMMUNOLOGY, PERGAMON, GB, vol. 38, no. 1, 1 January 2001 (2001-01-01), pages 1-8, XP002329378, ISSN: 0161-5890, DOI: 10.1016/50161-5890(01)00050-5, page 5

US-A-5677425

EP-A1-2409990

BLOOM J.W. ET AL.: "Intrachain disulfide bond in the core hinge region of human IgG4", PROTEIN SCIENCE, CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, vol. 6, no. 2, 1 January 1997 (1997-01-01), pages 407-415, XP002329379, ISSN: 0961-8368 page 408

AALBERSE R.C. ET AL.: "IgG4 breaking the rules", IMMUNOLOGY, BLACKWELL PUBLISHING, OXFORD, GB, vol. 105, no. 1, 1 January 2002 (2002-01-01), pages 9-19, XP002987706, ISSN: 0019-2805, DOI: 10.1046/J.0019-2805.2001.01341.X figure 2

KOLFSCHOTEN MARIJN VAN DER NEUT ET AL.: "Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange", SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, WASHINGTON, DC; US, vol. 317, no. 5844, 1 September 2007 (2007-09-01), pages 1554-1557, XP009104480, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/SCIENCE.1144603 page 1555

(57) Изобретение относится к асимметричному смешанному антителу, содержащему две тяжелые цепи или фрагмент тяжелой цепи, каждая из которых содержит по меньшей мере вариабельную область, шарнирную область и C_H1-домен, где первая тяжелая цепь или ее фрагмент принадлежит классу IgG4 и имеет а) цистеин межцепочечной связи в положении 127 при нумерации по системе нумерации Kabat в домене C_H1, замененный на другую аминокислоту; и б) необязательно одну или несколько из аминокислот, расположенных в верхней шарнирной области и замененных цистеином, и где вторая тяжелая цепь или ее фрагмент отличается тем, что часть или вся цепь отличается по аминокислотной последовательности от указанной первой тяжелой цепи по меньшей мере в области вне вариабельной области (например, в константной области), к составам, содержащим их, терапевтическому средству, в котором используются оба из указанных выше, и к способам получения антител и состава.

B1**033720****033720****B1**

Настоящее изобретение относится к асимметричным антителам, содержащим тяжелую цепь IgG4 или фрагмент, которая является мутантной, и вторую тяжелую цепь или фрагмент, которая отличается от указанной цепи IgG4. Также изобретение относится к композициям, содержащим указанные асимметричные антитела, и к применению антител и композиций, содержащих их, для лечения. В другом аспекте изобретение относится к способам получения антител и составов, векторов, кодирующих антитела, и хозяев, экспрессирующих их.

Биофармацевтическая промышленность, охватывающая рекомбинантные белки, моноклональные антитела (mAb) и лекарственные средства на основе нуклеиновых кислот, быстро растет. Инженерия антител привела к конструированию и получению фрагментов антител или альтернативных форматов.

Предпочтительный молекулярный формат, а также другие аспекты, такие как выход продукции, качество белка и стабильность при хранении, учитываются при выборе белка на основе антитела в качестве лекарственного средства.

Основная структура всех молекул иммуноглобулинов (Ig) содержит две идентичных тяжелых цепи (HC) и две идентичных легких цепи (LC), которые связаны дисульфидными связями. Каждая LC состоит из переменного (V_L) и константного домена (C_L). На основе HC различают пять основных классов Ig: IgG, IgA, IgD, IgE и IgM. В случае IgG HC состоит из одного переменного домена (V_H) и трех константных доменов (C_H1-3). Домены C_H2 и C_H3 формируют Fc-часть молекулы, которая ответственна за стимуляцию эффекторной функции и связана с Fab-фрагментом (V_HV_L и C_HC_L) шарнирной областью, которая сообщает молекуле IgG гибкость. На концах доменов V_L и V_H расположены два распознающих антиген участка. IgG далее подразделяют на 4 различных изотипа: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

Опосредуемые Fc эффекторные функции, т.е. антителозависимая цитотоксичность (ADCC) или комплементзависимая цитотоксичность (CDC), являются зависимыми от изотипа. Каждый изотип эволюционировал так, чтобы выполнять конкретную функцию в организме. В настоящее время изотип IgG1 наиболее широко используется в качестве терапевтического средства вследствие более длительного времени полужизни, усиленной активации ADCC и активации комплемента. Другие изотипы используют в качестве лекарственных средств в зависимости от мишени и желаемого эффекта. Например, когда антигены-мишени необходимо просто нейтрализовать и эффекторные функции менее важны, можно использовать альтернативные изотипы, такие как IgG2 и IgG4. Альтернативно могут быть предусмотрены IgG с модифицированной способами инженерии Fc/эффекторной функцией.

IgG2 также обладает минимальной связанной с ним эффекторной функцией, однако он склонен к димеризации, которая не полностью понятна.

IgG4 остается подходящим изотипом вследствие его относительной недостаточности индукции эффекторной функции. Однако использование IgG4 также имеет присущие некоторые ему практические затруднения, а именно более короткое время полужизни в сыворотке и способность претерпевать "обмен Fab-плечами" (также обозначаемый как динамический обмен тяжелыми цепями или обмен тяжелыми цепями), где происходит обмен тяжелой цепи и связанной с ней легкой цепи антитела с тяжелой цепью и связанной с ней легкой цепью другого антитела с образованием целого антитела, состоящего из двух тяжелых цепей и двух связанных с ними легких цепей (van der Neut Kolfshoten et al., 2007 Science 317, 1554-1557).

In vivo обмен Fab-плечами приводит к биспецифическим антителам, которые вследствие их различных переменных доменов могут связывать одновременно различные антигены-мишени. Это приводит к продукции большого процента циркулирующих IgG4, для которых выявлено, что они являются биспецифическими, но функционально одновалентными (Schuurman, J., Van Ree, R., Perdok, G.J., Van Doorn, H.R., Tan, K.Y., Aalberse, R.C., 1999. Normal human immunoglobulin G4 can be bispecific: it has two different antigen-combining sites. Immunology 97, 693-698).

In vitro, когда антитела IgG4 анализируют с помощью невосстанавливающего SDS-PAGE, наблюдают, что они образуют так называемые "половинные молекулы", каждая из которых содержит одну ковалентно связанную пару тяжелая-легкая цепь, являющуюся результатом отсутствия дисульфидных связей, как правило, вследствие образования дисульфидных связей внутри тяжелой цепи в шарнирной области одной тяжелой цепи. Тяжелая цепь "половинной молекулы" может нековалентно связываться с тяжелой цепью, являющейся ее партнером в паре, причем связывание поддерживается взаимодействиями доменов $C_H3:C_H3$. С использованием способов, таких как эксклюзионная хроматография, в растворе такие "половинные молекулы" фактически наблюдают как полноразмерные, которые имеют размер приблизительно 150 кДа, однако на невосстанавливающем SDS-PAGE присутствуют пары LC:HC массой 75 кДа (так называемая "половинная молекула").

Мутация Ser на Pro в положении 241 (при нумерации по системе нумерации Kabat) в шарнирной области уменьшает появление этих "половинных молекул" при невосстанавливающем SDS-PAGE (Angal, S. et al., 1993. A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody as observed during SDS-PAGE analysis, Mol Immunol 30, 105-108). Кроме того, эта точечная мутация не влияет на компактную структуру IgG4, тем самым, позволяя IgG4 сохранять его сниженную способность активировать комплемент.

После открытия мутации S241P исследовали дополнительные мутации IgG4 для понимания взаи-

модействия между тяжелыми цепями в антителах IgG4, снижения эффекторной функции IgG4 и усиления стабильности структуры. В Schuurman et al. (Schuurman, J et al., 2001. The inter-heavy chain disulphide bonds of IgG4 are in equilibrium with intra-heavy chain disulphide bonds. *Molecular Immunology* 38, 1-8), наблюдаемую нестабильность дисульфидных связей между цепями IgG4 исследовали с использованием мутантов IgG4. В мутанте M1 Cys 131 (при нумерации по системе нумерации EU или Cys 127 по системе нумерации Kabat), который вовлечен в дисульфидную связь между тяжелой цепью и легкой цепью (C_L - C_{H1}), был заменен на серин, и было выявлено, что этот мутант приводит к образованию димеров легких цепей и димеров тяжелых цепей. В мутанте M2 цистеин 226 (226 при нумерации по системе нумерации EU или 239 по системе нумерации Kabat), который вовлечен в дисульфидную связь между тяжелыми цепями в шарнирной области, был заменен на серин, и было выявлено, что этот мутант обладает более стабильной связью между тяжелыми цепями по сравнению с IgG4 и препятствует образованию дисульфидной связи внутри тяжелой цепи.

Ранее исследовали изменение количества остатков цистеина, присутствующих в шарнирной области антител. В US 5677425, Bodmer et al., описано, что количество остатков цистеина в шарнирной области можно увеличивать для способствования использованию тиольных групп цистеина для связывания с эффекторными или репортерными молекулами. В US 5677425 также описано, что количество остатков цистеина в шарнирной области можно уменьшать до одного, чтобы способствовать сборке молекул антител, поскольку будет необходимо образовать только одну дисульфидную связь, которая обеспечит специфическую мишень для присоединения шарнирной области либо к другой шарнирной области, либо к эффекторной или репортерной молекуле.

Учитывая, что IgG4-антитела, вводимые индивидууму, являются чувствительными к динамическому обмену тяжелыми цепями с образованием "смешанных антител", этот процесс можно использовать в рамках настоящего изобретения для получения антител *in vitro* по настоящему изобретению. Преимущественно это позволяет манипулировать характеристиками антител.

Все еще существует потребность в получении новых антител для применения в качестве лекарственного средства. Настоящее изобретение относится к новым мутантным антителам, которые могут обладать преимущественными свойствами, включая улучшенные биофизические свойства, например, по сравнению с антителами дикого типа.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к асимметричному смешанному антителу, содержащему две тяжелые цепи или фрагменты тяжелых цепей, каждая из которых содержит, по меньшей мере, вариабельную область, шарнирную область и домен C_{H1} ,

где первая тяжелая цепь или ее фрагмент принадлежит классу IgG4 и имеет:

а) цистеин между цепями в положении 127 при нумерации по системе нумерации Kabat в домене C_{H1} , замененный на другую аминокислоту; и

б) необязательно, одну или несколько аминокислот, расположенных в верхней шарнирной области и замененных на цистеин,

где вторая тяжелая цепь или ее фрагмент характеризуется тем, что часть всей цепи имеет отличающуюся аминокислотную последовательность относительно указанной первой тяжелой цепи, по меньшей мере, в области вне вариабельной области.

В альтернативном аспекте настоящее изобретение относится к асимметричному смешанному антителу, содержащему тяжелую цепь IgG4 или фрагмент тяжелой цепи, где тяжелая цепь или фрагмент содержит вариабельную область, шарнирную область и домен C_{H1} , где шарнирная область является мутантной так, что она представляет собой шарнирную область IgG1-типа.

Также предусматривается асимметричное смешанное антитело, содержащее первую и вторую тяжелые цепи или фрагменты тяжелой цепи, каждая из которых содержит, по меньшей мере, вариабельную область, шарнирную область и домен C_{H1} , где первая тяжелая цепь или ее фрагмент принадлежит классу IgG4 и имеет шарнирную область IgG1-типа, и вторая тяжелая цепь или ее фрагмент обладает отличающейся аминокислотной последовательностью указанной первой тяжелой цепи, по меньшей мере, в области вне вариабельной области.

В одном из вариантов осуществления последовательности шарнирной области двух тяжелых цепей являются сходными или идентичными.

Настоящее изобретение является преимущественным, поскольку оно позволяет манипулировать и контроль над свойствами антител способами, которые являются удобными и свободно доступными.

Антитела по настоящему изобретению могут продемонстрировать пониженный обмен тяжелыми цепями по сравнению с IgG4 дикого типа, который обеспечивает асимметрию (как например, биспецифическое антитело), который демонстрирует небольшой обмен или отсутствие обмена с IgG4 дикого типа *in vivo* вследствие их сниженной подверженности к обмену по сравнению с IgG4 и также вследствие относительно низкой концентрации асимметричного смешанного антитела *in vivo* по сравнению с природными циркулирующими IgG4-антителами.

Антитела по настоящему изобретению могут продемонстрировать сниженный обмен тяжелыми цепями при концентрациях, превышающих концентрации *in vivo*, например при концентрациях 0,5 mM или

более по сравнению с IgG4 дикого типа. В то время как антитела по изобретению демонстрируют сниженный обмен тяжелыми цепями по сравнению с IgG4 дикого типа, они демонстрируют степень обмена тяжелыми цепями, по сравнению с IgG1 wt и IgG4 S241P, которая является достаточной для образования асимметричного смешанного антитела (такого как биспецифическое антитело) из двух отличающихся антител (таких как два антитела, обладающие различными антигенными специфичностями) *in vitro*.

Таким образом, в одном из вариантов осуществления антитела по настоящему изобретению могут обмениваться *in vitro* с 5 mM GSH, но не с 0,5 mM GSH. Последний из этих случаев в большей степени имитирует барьер обмена *in vivo*. На фиг. 20 это иллюстрируется тем, что Ab28 (C127S Y229C) обменивается с WT, S241G S241A или S241T при 5 mM GSH, но не при 0,5 mM.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к способу получения асимметричного смешанного антитела, включающему стадии взятия симметричного антитела, содержащего первую последовательность тяжелой цепи или ее фрагмента, как определено в настоящем описании, и смешения указанного антитела *in vitro* со вторым симметричным антителом, содержащим вторую последовательность тяжелой цепи или ее фрагмента, которая отличается от указанной первой последовательности тяжелой цепи, в условиях, способствующих обмену тяжелыми цепями между двумя антителами, и, необязательно, выделения асимметричного смешанного антитела, полученного из них. В одном из вариантов осуществления способ, который включает смешение двух антител, обеспечивает биспецифическое антитело, где антигенная специфичность переменных областей в первом антителе отличается от антигенной специфичности переменных областей во втором антителе.

В одном из вариантов осуществления антитела являются одновалентными.

Способ по настоящему изобретению позволяет полностью манипулировать свойствами антитела, обеспечивая конечную терапевтическую молекулу, которая индивидуализирована и оптимизирована для предполагаемого терапевтического применения.

Кроме того, антитела по настоящему изобретению могут быть преимущественными в том, что они обладают более низкими уровнями эффекторной функции и/или не участвуют в перекрестном связывании.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1a представлены последовательности C_{H1} и шарнирной области человека IgG1 дикого типа и IgG4 дикого типа, где остатки шарнирной области подчеркнуты, и константная последовательность легкой цепи каппа.

На фиг. 1b представлены:

константная последовательность легкой цепи каппа человека, где указан цистеин (подчеркнут), который формирует дисульфидные связи между цепями C_L - C_{H1} ;

последовательности N-концевых остатков C_{H1} и шарнирной области тяжелой цепи IgG1, 2, 3 и 4 человека, где указано (подчеркнуто) положение цистеина (в верхней шарнирной области для IgG1 и в N-конце C_{H1} для IgG2, 3 и 4), который формирует дисульфидную связь между цепями C_L - C_{H1} ;

последовательности N-концевых остатков C_{H1} и часть шарнирной области тяжелой цепи IgD человека, где указано (подчеркнуто) положение цистеина в N-концевой последовательности C_{H1} , который формирует дисульфидную связь между цепями C_L - C_{H1} ;

N-концевые остатки C_{H1} , C-концевые остатки C_{H1} тяжелой цепи IgM человека и отдельные N-концевые остатки C_{H2} , где указано (подчеркнуто) положение цистеина в N-концевой последовательности C_{H1} , который формирует дисульфидную связь между цепями C_L - C_{H1} ; и

остатки в верхней шарнирной области IgG3 и IgG4, шарнирной области IgD и на C-конце C_{H1} и в C_{H2} IgM, где подчеркнутые остатки указывают на положения, где один или несколько остатков могут быть заменены на цистеин в антителах по настоящему изобретению.

На фиг. 2a представлен остаток цистеина C_{H1} (C127), который формирует межцепочечную дисульфидную связь с цистеином легкой цепи, и остатки верхней и центральной шарнирной области IgG1 дикого типа, IgG4 дикого типа, и положения, в которых в IgG4-антитела по настоящему изобретению внесены мутации.

На фиг. 2b представлен остаток цистеина C_{H1} (C127), который формирует межцепочечную дисульфидную связь с цистеином легкой цепи, и остатки шарнирной области IgG3 дикого типа и положения, где один или несколько остатков заменены на цистеин в IgG3-антителах по настоящему изобретению.

На фиг. 2c представлен остаток цистеина C_{H1} (C127), который формирует межцепочечную дисульфидную связь с цистеином легкой цепи, и отдельные остатки C_{H1} и C_{H2} IgM дикого типа и положения, где один или несколько остатков заменены на цистеин в IgM-антителах по настоящему изобретению.

На фиг. 2d представлен остаток цистеина C_{H1} (C128), который формирует межцепочечную дисульфидную связь с цистеином легкой цепи, и остатки шарнирной области IgD дикого типа и положения, где один или несколько остатков замещены цистеином в IgD-антителах по настоящему изобретению.

На фиг. 3a представлены мутации, внесенные в IgG4-антитела в соответствии с настоящим изобретением.

На фиг. 3b представлены положения остатков в мутантной тяжелой цепи IgG4-антител, представленной на фиг. 3a, и предсказанная дисульфидная связь, которая может образовываться с цистеином ли-

бо в легкой цепи (LC), либо в другой мутантной тяжелой цепи (HC). Когда цистеин может связываться с цистеином в LC или HC, подчеркнутая цепь представляет собой предсказанное преобладающее расположение дисульфидной связи.

На фиг. 4а представлены мутации, внесенные в IgG4-антитела в соответствии с настоящим изобретением.

На фиг. 4b представлены положения остатков цистеина в IgG4-антителах, представленных на фиг. 4а, и предсказанная дисульфидная связь, которая может образовываться с цистеином либо в легкой цепи (LC), либо в тяжелой цепи (HC). Когда цистеин может связываться с цистеином в LC или HC, подчеркнутая цепь представляет собой предсказанное преобладающее расположение дисульфидной связи.

На фиг. 5 представлены различные последовательности.

На фиг. 6 представлены различные последовательности.

На фиг. 7 представлен анализ с использованием вестерн-блоттинга антител в соответствии с настоящим изобретением, причем на верхнем геле представлены результаты использования антитела против Fc человека, а на нижнем геле представлены результаты использования антитела против каппа-цепи.

На фиг. 8 представлен анализ с использованием вестерн-блоттинга антител в соответствии с настоящим изобретением, причем на верхнем геле представлены результаты использования антитела против Fc человека, а на нижнем геле представлены результаты использования антитела против каппа-цепи человека.

На фиг. 9 представлен анализ с использованием вестерн-блоттинга антител в соответствии с настоящим изобретением, причем на верхнем геле представлены результаты использования антитела против Fc человека, а на нижнем геле представлены результаты использования антитела против каппа-цепи человека.

На фиг. 10 представлен анализ с использованием вестерн-блоттинга антител в соответствии с настоящим изобретением, причем на верхнем геле представлены результаты использования антитела против Fc человека, а на нижнем геле представлены результаты использования антитела против каппа-цепи человека.

На фиг. 11 представлены результаты анализа ThermoFluor антител по настоящему изобретению, которые демонстрируют термостабильность доменов Fab и C_H2.

На фиг. 12 представлены результаты анализа ThermoFluor антител по настоящему изобретению, которые демонстрируют термостабильность доменов Fab и C_H2.

На фиг. 13 представлены результаты анализа ThermoFluor антител по настоящему изобретению, которые демонстрируют термостабильность доменов Fab и C_H2.

На фиг. 14 представлены результаты анализа ThermoFluor антител по настоящему изобретению, которые демонстрируют термостабильность доменов Fab и C_H2.

На фиг. 15 представлено ранжирование величин термостабильности отдельных антител по настоящему изобретению.

На фиг. 16 представлен обмен тяжелыми цепями через 16 ч, где первое антитело выбрано из IgG1 дикого типа, IgG4 дикого типа и различных мутантных антител, и второе антитело представляет собой IgG4 дикого типа при двух концентрациях GSH. На фигуре показано, что мутанты обладают несколько меньшим обменом, чем антитела IgG4 дикого типа, и значительно более высоким обменом, чем антитела IgG1 дикого типа и антитела IgG4 P. Это является преимущественным, поскольку обмен можно использовать для получения асимметричных антител по настоящему изобретению, которые *in vivo* менее подвержены обмену, чем антитела IgG4 дикого типа. В некоторых условиях увеличение концентрации восстановителя, такого как GSH, увеличивает величину наблюдаемого обмена.

На фиг. 17 представлен анализ асимметричного обмена мутантов, содержащих переменные области 1 типа с альтернативными остатками в положении 241, и мутантов с переменными областями 2 типа.

На фиг. 18 представлен анализ асимметричного домена IgG4 WT с переменными областями 1 типа, инкубированного с различными мутантами S241, и центрального цистеина шарнирной области с переменными областями 2 типа.

На фиг. 19 представлен анализ асимметричного обмена IgG4 S241P с переменными областями 1 типа, инкубированного с различными мутантами S241, IgG4 C127S Y229C (Ab 28) с переменными областями 2 типа.

На фиг. 20 представлен анализ асимметричного обмена IgG4 C127S Y229C (номер 28) с переменными областями 1 типа, инкубированного с различными мутантами S241 и IgG4 WT с переменными областями 2 типа.

На фиг. 21 представлен анализ асимметричного обмена мутантов с двойной шарнирной областью с переменными областями 1 типа, инкубированных с множеством мутантов с переменными областями 2 типа.

Краткое описание последовательностей

В SEQ ID NO: 1 показана последовательность C_H1 и шарнирной области IgG1-антитела дикого типа.

В SEQ ID NO: 2 показана последовательность C_H1 и шарнирной области IgG4-антитела дикого ти-

па.

B SEQ ID NO: 3 показана часть константной области легкой цепи каппа человека дикого типа.

B SEQ ID NO: 4 показана часть N-концевой последовательности C_H1-домена IgG1-антитела человека.

B SEQ ID NO: 5 показана шарнирная область IgG1-антитела человека.

B SEQ ID NO: 6 показана часть N-концевой последовательности C_H1-домена IgG2-антитела человека.

B SEQ ID NO: 7 показана шарнирная область IgG2-антитела человека.

B SEQ ID NO: 8 показана часть N-концевой последовательности C_H1-домена IgG3-антитела человека.

B SEQ ID NO: 9 показана шарнирная область IgG3-антитела человека.

B SEQ ID NO: 10 показана часть N-концевой последовательности домена C_H1 IgG4-антитела человека.

B SEQ ID NO: 11 показана шарнирная область IgG4-антитела человека.

B SEQ ID NO: 12-37 показаны последовательности C_H1-домена и шарнирной области антител 6, 7, 8, 15, 16, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 44, 45, 46, 47, 2, 3, 48, 28P и 44P соответственно.

B SEQ ID NO: 38-63 показаны последовательности домена C_H1, шарнирной области, домена C_H2 и домена C_H3 антител 6, 7, 8, 15, 16, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 44, 45, 46, 47, 2, 3, 48, 28P и 44P соответственно.

B SEQ ID NO: 64 показаны последовательности доменов C_H2 и C_H3 IgG4 дикого типа.

B SEQ ID NO: 65 показаны последовательности доменов C_H2 IgG4 дикого типа и C_H3 IgG1 дикого типа.

B SEQ ID NO: 66 показана последовательность константной области легкой цепи каппа дикого типа человека.

B SEQ ID NO: 67 показана часть N-концевой последовательности домена C_H1 IgD-антитела человека.

B SEQ ID NO: 68 показана часть шарнирной области IgD-антитела человека.

B SEQ ID NO: 69 показана часть N-концевой последовательности домена C_H1 IgM-антитела человека.

B SEQ ID NO: 70 показана часть C-концевой последовательности C_H1-домена IgM-антитела человека.

B SEQ ID NO: 71 показана часть домена C_H2 IgM-антитела человека.

B SEQ ID NO: 72-295 показаны различные шарнирные области.

B SEQ ID NO: 296-305 показаны последовательности домена C_H1 и шарнирной области антител 1, 4, 5, 5P, 9, 10, 11, 12, 13 и 14 соответственно.

B SEQ ID NO: 306-315 показаны последовательности домена C_H1, шарнирной области, домена C_H2 и домена C_H3 антител 1, 4, 5, 5P, 9, 10, 11, 12, 13 и 14 соответственно.

B SEQ ID NO: 316-322 показаны различные шарнирные последовательности и их части.

Подробное описание

Асимметричное антитело, как используют в настоящем описании, представляет собой антитело, где две тяжелые цепи или их фрагменты обладают аминокислотными последовательностями, которые частично или полностью отличаются в шарнирных областях вне переменных областей, например, обладают сходством менее 98% на протяжении соответствующего участка, такой как менее 97, 96, 95% на протяжении соответствующего участка. В одном из вариантов осуществления существует 1, 2, 3, 4, 5 аминокислот, отличающихся или добавленных в области из 10 последовательно расположенных аминокислот. Аминокислотные последовательности также могут иметь различные длины, которые неизбежно приведут к отличию аминокислотных последовательностей. Части тяжелых цепей могут иметь сходные или идентичные последовательности, например переменные области в тяжелой цепи могут быть одинаковыми или могут отличаться.

В одном из вариантов осуществления последовательности тяжелой цепи в антителах по настоящему изобретению ковалентно связаны, например, через межцепочечную дисульфидную связь, например связь, которая присутствует естественным образом в соответствующем фрагменте дикого типа, или связь, которая модифицирована способами генной инженерии так, чтобы она присутствовала в цепях в желаемом положении.

В одном аспекте антитела по настоящему изобретению характеризуются тем, что первая последовательность тяжелой цепи IgG4 или ее фрагмент имеет шарнирную область типа IgG1.

В одном аспекте антитела по настоящему изобретению характеризуются тем, что обе последовательности тяжелой цепи или их фрагменты имеют шарнирную область типа IgG1.

Верхняя и центральная шарнирные области IgG1 дикого типа имеют последовательность EPKSCDKTHTCPPCP SEQ ID NO: 316.

Верхняя и центральная шарнирные области IgG4 дикого типа имеют последовательность ESKYGPCCPSCP SEQ ID NO: 317.

Шарнирная область типа IgG1, используемая в рамках настоящего изобретения, относится к шарнирной области, где одна или несколько, например 1-5, как например, 1, 2 или 3 аминокислоты, встроены в шарнирную область IgG4, в частности, между EPKYGGP SEQ ID NO: 318 и CPSC, и/или одна или несколько из аминокислот YGPP в шарнирной области IgG4 заменены, например, чтобы они соответствовали аминокислоте в шарнирной области IgG1, в частности G (из YGPP в шарнирной области IgG4) заменен на С или где Y (из YGPP в шарнирной области IgG4) заменен на С или S.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к асимметричному смешанному антителу, содержащему первую тяжелую цепь IgG4 с верхней шарнирной областью, центральной и нижней шарнирными областями, и указанная верхняя и центральная шарнирные области в тяжелой цепи или каждой тяжелой цепи в нем имеют длину от 13 до 17, как например, 15 аминокислот.

В одном из вариантов осуществления асимметричное смешанное антитело с первой тяжелой цепью IgG4 имеет верхнюю шарнирную область и центральную шарнирную область длиной 15 аминокислот.

В одном из вариантов осуществления верхняя шарнирная область и центральная шарнирная область по меньшей мере первой тяжелой цепи содержат 12 природных аминокислот, встречающихся в шарнирной области IgG4, и дополнительные три аминокислоты, например, 3 остатка аланина, или 3 остатка глицина, или их комбинацию.

В одном из вариантов осуществления шарнирная область имеет одну из следующих последовательностей:

```
ESKYGPPAAACPSCP SEQ ID NO:72; ESKYGPPGGGCPSCP SEQ ID NO:73;
ESKYGPPHTHTCPSCP SEQ ID NO:74; ESKYGDKHTHTCPSCP SEQ ID NO:75;
EPSKYGPPAAACPSCPSEQ ID NO:76; EPSKYGPPGGGCPSCP SEQ ID NO:77;
EPSKYGPPHTHTCPSCP SEQ ID NO:78; ESKYGDKHTHTCPSCP SEQ ID NO:79;
ESKSYGPPAAACPSCPSEQ ID NO:80; ESKSYGPPGGGCPSCP SEQ ID NO:81;
ESKSYGPPHTHTCPSCP SEQ ID NO:82; ESKSYGDKHTHTCPSCP SEQ ID NO:83;
ESKYGPPAAACPPCP SEQ ID NO:84; ESKYGPPGGGCPPCP SEQ ID NO:85;
ESKYGPPHTHTCPPCP SEQ ID NO:86; ESKYGDKHTHTCPPCP SEQ ID NO:87;
EPSKYGPPAAACPPCP SEQ ID NO:88; EPSKYGPPGGGCPPCP SEQ ID NO:89;
EPSKYGPPHTHTCPPCP SEQ ID NO:90; ESKYGDKHTHTCPPCP SEQ ID NO:91;
ESKSYGPPAAACPPCP SEQ ID NO:92; ESKSYGPPGGGCPPCP SEQ ID NO:93;
ESKSYGPPHTHTCPPCP SEQ ID NO:94; ESKSYGDKHTHTCPPCP SEQ ID NO:95.
```

В одном из вариантов осуществления верхняя шарнирная область и центральная шарнирная область по меньшей мере в первой тяжелой цепи IgG4 по изобретению состоит из природной шарнирной области IgG1, т.е. EPKSCDKTHTCPPC SEQ ID NO: 96, или ее производного, такого как

```
EPKSCDKAAACPPCP SEQ ID NO:97; EPKSCDKGGGCPPCP SEQ ID NO:98;
EPKSCDKTHTSPPCP SEQ ID NO:99; EPKSCDKTHTCPPSP SEQ ID NO:100;
EPKSCDKTHTSPPSP SEQ ID NO:101; EPKSCDKAAASPPCP SEQ ID NO:102;
EPKSCDKAAACPPSP SEQ ID NO:103; EPKSCDKAAASPPSP SEQ ID NO:104;
EPKSCDKGGGSPPCP SEQ ID NO:105; EPKSCDKGGGCPPSP SEQ ID NO:106;
EPKSCDKGGGSPPSP SEQ ID NO:107.
```

Как правило, шарнирные области в каждой из тяжелых цепей асимметричного смешанного антитела, являются по меньшей мере, совместимыми. Иными словами, когда тяжелые цепи образуют пару, расположение не является стабильным, например, благодаря внутреннему напряжению в шарнирной области.

В одном из вариантов осуществления шарнирная область каждой тяжелой цепи содержит последовательность, независимо выбранную из последовательности шарнирной области, описанной в настоящем описании.

В одном из вариантов осуществления шарнирные области в каждой из тяжелых цепей являются сходными или идентичными. Это может быть преимущественным, поскольку это может минимизировать несовместимость шарнирных областей двух цепей.

В следующем аспекте изобретение относится к асимметричному смешанному антителу, содержащему две тяжелые цепи IgG4, каждая из которых содержит вариабельную область, домен C_H1 и шарнирную область, где в первой тяжелой цепи:

а) межцепочечный цистеин в положении 127 при нумерации по системе нумерации Kabat в домене C_H1 заменен на другую аминокислоту; и

б) шарнирная область в тяжелой цепи или каждой тяжелой цепи в нем имеет длину в диапазоне от 12 до 17, такую как 15 аминокислот;

где часть или вся вторая тяжелая цепь имеет отличающуюся аминокислотную последовательность относительно указанной первой тяжелой цепи по меньшей мере в одной области вне вариабельной области.

Подходящие шарнирные области описаны выше.

В следующем аспекте настоящее изобретение также относится к асимметричному антителу, содер-

жащему две тяжелые цепи IgG4, каждая из которых содержит домен C_H1 и шарнирную область, где в первой тяжелой цепи:

а) цистеин в положении 127 при нумерации по системе нумерации Kabat заменен на другую аминокислоту; и

б) цистеин в положении 239 или цистеин в положении 242 при нумерации по системе нумерации Kabat заменен на другую аминокислоту;

где часть или вся вторая тяжелая цепь имеет отличающуюся аминокислотную последовательность относительно указанной первой тяжелой цепи по меньшей мере в одной области вне варибельной области.

В одном из вариантов осуществления в соответствии с последним аспектом изобретения, по меньшей мере, тяжелая цепь IgG4 содержит 22 аминокислоты в шарнирной области, например, как описано выше.

Последовательности второй тяжелой цепи и ее фрагментов включают любую тяжелую цепь антитела, включая IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 (включая тип, описанный выше), IgD и IgM.

В следующем варианте осуществления настоящее изобретение также относится к асимметричному смешанному антителу, содержащему две тяжелые цепи IgG3, каждая из которых содержит домен C_H1 и шарнирную область, например, где в первой тяжелой цепи:

а) цистеин в домене C_H1, который образует межцепочечную дисульфидную связь с цистеином в легкой цепи, заменен на другую аминокислоту; и

б) одна или несколько аминокислот, расположенных в верхней шарнирной области, заменены на цистеин;

где часть или вся вторая тяжелая цепь отличается по аминокислотной последовательности относительно указанной первой тяжелой цепи по меньшей мере в одной области вне варибельной области.

В следующем варианте осуществления настоящее изобретение относится к асимметричному смешанному антителу, дополнительно содержащему две тяжелые цепи IgM, каждая из которых содержит домен C_H1 и домен C_H2, например, где в первой тяжелой цепи:

а) цистеин в домене C_H1, который образует межцепочечную дисульфидную связь с цистеином в легкой цепи, заменен на другую аминокислоту; и

б) одна или несколько из аминокислот, расположенных в домене C_H1 или домене C_H2, заменены на цистеин;

где часть или вся вторая тяжелая цепь отличается по аминокислотной последовательности относительно указанной первой тяжелой цепи, по меньшей мере, в области вне варибельной области.

В следующем варианте осуществления настоящее изобретение относится к асимметричному смешанному антителу, дополнительно содержащему две тяжелые цепи IgD, например, каждая из которых содержит домен C_H1 и шарнирную область, где в первой тяжелой цепи:

а) цистеин в домене C_H1, который образует межцепочечную дисульфидную связь с цистеином в легкой цепи, заменен на другую аминокислоту; и

б) одна или несколько аминокислот, расположенных в шарнирной области, заменены на цистеин;

где часть или вся вторая тяжелая цепь имеет отличающуюся аминокислотную последовательность относительно указанной первой тяжелой цепи, по меньшей мере, в области вне варибельной области.

Без связи с теорией полагают, что область C_H3 IgG4-антител обладает функцией участия в динамическом процессе обмена. Таким образом, замена области C_H3 в антителе не класса IgG4 на домен C_H3 из IgG4-антитела может привести к тому, что мутантное антитело будет больше подвержено обмену.

В одном из вариантов осуществления один или несколько цистеин(ов), которые в природе вовлечены в образование межцепочечной дисульфидной связи между легкой цепью и тяжелой цепью, заменен на аминокислоту, не являющуюся цистеином, как описано в WO 2005/003170 и WO 2005/003171, обе из которых включены в настоящее описание в качестве ссылок.

В одном из вариантов осуществления легкая цепь каппа человека в антителе или его фрагменте в соответствии с настоящим изобретением имеет один или несколько из остатков 171, 156, 202 или 203, замененных, как описано в WO 2008/038024, включенной в настоящее описание в качестве ссылки.

Квалифицированному специалисту будет понятно, что мутации, внесенные в IgG4-антитело, также можно вносить в другие изотипы или классы антител, которые имеют такое же расположение дисульфидных связей, как и у IgG4-антитела, чтобы получить усовершенствованное антитело. Конкретные примеры антител, которые обладают таким же расположением дисульфидных связей, как и у IgG4-антитела, представляют собой IgG3-антитела, IgM-антитела и IgD-антитела. Как показано на фиг. 1b, IgG3 и IgM имеют цистеин в положении 127 в домене C_H1, и IgD имеет цистеин в положении 128 в домене C_H1, который является эквивалентным C127 в домене C_H1 IgG4, который формирует межцепочечную дисульфидную связь с цистеином в легкой цепи. Кроме того, также из фиг. 1b можно видеть, что верхние шарнирные области IgG3 и IgD и C-концевая область домена C_H1 и N-концевая область домена C_H2 в IgM не содержат остаток цистеина, который эквивалентен остаткам верхней шарнирной области IgG1. Таким образом, настоящее изобретение, кроме того, относится к IgG3-антителу, IgD-антителу и IgM-антителу, где цистеин в домене C_H1, который формирует межцепочечную дисульфидную связь с

цистеином в легкой цепи, заменен на другую аминокислоту, и где одна или несколько аминокислот, которые находятся в положении, структурно аналогичном верхней шарнирной области IgG1 или IgG4, заменены на цистеин. Эти мутантные тяжелые цепи можно использовать, например, в качестве второй тяжелой цепи антител по изобретению.

В одном из вариантов осуществления антитело по изобретению содержит две тяжелые цепи класса IgG4.

В одном из вариантов осуществления антитело по настоящему изобретению дополнительно содержит две легких цепи.

В одном из вариантов осуществления антитело по настоящему изобретению содержит две переменные области.

В одном из вариантов осуществления две переменные области имеют одинаковую специфичность, иными словами, они являются специфичными в отношении одного и того же антигена.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к асимметричному смешанному антителу, где переменные области обладают различной специфичностью, т.е. к биспецифическому антителу. Иными словами, когда антитело содержит две переменных области тяжелой цепи, каждая переменная область является специфичной к отличающемуся антигену.

В одном из вариантов осуществления каждая переменная область независимо может связывать антиген-мишень.

Настоящий формат антитела является предпочтительным, поскольку он легко доступен с помощью общепринятых способов получения антител и с использованием природных механизмов.

В одном из вариантов осуществления один или оба С-конца тяжелой цепи слиты с доменным антителом, например, со специфичностью в отношении другого антигена, т.е. антигена, в отношении которого не являются специфичными переменные области тяжелых цепей.

Единичные переменные домены, также известные как однодоменные антитела или dAb для применения в рамках настоящего изобретения, можно получать с использованием способов, известных в данной области, и они включают антитела, описанные в WO 2005118642, Ward et al., 1989, Nature, 341, 544-546, и Holt et al., 2003, Trends in Biotechnology, 21, 484-490. В одном из вариантов осуществления однодоменное антитело для применения в рамках настоящего изобретения представляет собой переменный домен тяжелой цепи (VH) или переменный домен легкой цепи (VL). Каждый домен легкой цепи может представлять собой домен либо подгруппы каппа, либо подгруппы лямбда. Способы выделения доменов VH и VL описаны в данной области, см., например, EP 0368684 и Ward et al., выше. Такие домены могут происходить из любого подходящего вида или исходной модели антитела. В одном из вариантов осуществления однодоменное антитело может происходить из грызуна, человека или другого вида. В одном из вариантов осуществления однодоменное антитело является гуманизированным.

В одном из вариантов осуществления однодоменное антитело получено из библиотеки фагового дисплея с использованием способов, описанных, например, в WO 2005/118642, Jespers et al., 2004, Nature Biotechnology, 22, 1161-1165 и Holt et al., 2003, Trends in Biotechnology, 21, 484-490. Предпочтительно такие однодоменные антитела являются полностью человеческими, однако могут происходить из других видов. Будет понятно, что последовательность однодоменного антитела после выделения можно модифицировать для улучшения характеристик однодоменного антитела, например растворимости, как описано в Holt et al., выше.

В одном из вариантов осуществления одно или каждое доменное антитело представляет собой VH или VHH.

В одном из вариантов осуществления существует два доменных антитела, каждое из которых является слитым с одной тяжелой цепью, где два доменных антитела формируют пару VH/VL, которая связывается с антигеном, в отношении которого они совместно являются специфичными.

В одном из вариантов осуществления антитело по изобретению является выделенным, иными словами, оно не находится в организме человека или животного.

Термины "белок" и "полипептид" используют в рамках настоящего изобретения взаимозаменяемо, если контекст не указывает на иное. Подразумевают, что "пептид" относится к 10 или менее аминокислотам.

Термины "полинуклеотид" включает ген, ДНК, кДНК, РНК, мРНК и т.д., если контекст не указывает на иное.

Как используют в рамках изобретения, термин "содержащий" в контексте настоящего описания следует интерпретировать как "включающий".

Термин "дикий тип" в контексте настоящего изобретения означает антитело, которое встречается в природе или может быть выделено из окружающей среды, которое не содержит никакой внесенной способами генной инженерии мутации.

Обозначение мутанта с заменой в настоящем описании состоит из буквы, за которой следует номер, за которым следует буква. Первая буква обозначает аминокислоту в белке дикого типа. Номер относится к положению аминокислоты, где внесена аминокислотная замена, а вторая буква обозначает аминокислоту, которую используют для замены аминокислоты дикого типа.

Остатки в вариабельных и константных доменах антител обычно нумеруют в соответствии с системой, разработанной Kabat et al. Эта система представлена в Kabat et al., 1987, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Department of Health and Human Services, NIH, США (далее "Kabat et al. (выше)").

Обозначения остатков по Kabat не всегда прямо соответствуют линейной нумерации аминокислотных остатков. Фактическая линейная аминокислотная последовательность может содержать меньшее количество или дополнительные аминокислоты, чем в точной нумерации Kabat, что соответствует укорочению или вставке структурного компонента, либо каркасной области, либо определяющей комплементарность области (CDR) основной структуры вариабельного домена. Правильную нумерацию остатков по Kabat можно определять для данного антитела путем выравнивания гомологичных остатков в последовательности антитела со "стандартной" пронумерованной по Kabat последовательностью. Альтернативно нумерацию аминокислотных остатков можно проводить с помощью индекса EU или системы нумерации EU (также описанных в Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)).

Следующей системой нумерации аминокислотных остатков в антителах является система нумерации IMGT (Lefranc, M.P. et al., *Dev. Comp. Immunol.*, 29, 185-203 (2005)).

В настоящем описании используют систему нумерации Kabat, за исключением тех случаев, где указано, что используют систему нумерации EU или систему нумерации IMGT.

Между четырьмя изотипами IgG внутрицепочечное расположение дисульфидных связей в тяжелой цепи и легкой цепи является сходным, в то время как расположение межцепочечных дисульфидных связей является уникальным для каждого изотипа (рассмотрено Wypych, J., Li, M., Guo, A., Zhang, Z., Martinez, T., Allen, M.J., Fodor, S., Keiner, D.N., Flynn, G.C., Liu, Y.D., Bondarenko, P.V., Ricci, M.S., Dillon, T.M., Balland, A., 2008. Human IgG2 antibodies display disulphide-mediated structural isoforms. *J Biol Chem.* 283, 16194-16205).

Как показано на фиг. 1b, последовательности шарнирной области четырех изотипов IgG различаются. Полная или генетическая шарнирная область, как правило, состоит из остатков 226-251 (нумерация на основе системы нумерации Kabat). На фиг. 1b представлены верхний, центральный и нижний отделы шарнирных областей четырех изотипов IgG. Для изотипа IgG1 верхняя шарнирная область представляет собой остатки 226-238, центральная шарнирная область представляет собой остатки 239-243, и нижняя шарнирная область представляет собой остатки 244-251. Для изотипа IgG4 верхняя шарнирная область представляет собой остатки 226-238, центральная шарнирная область представляет собой остатки 239-243 и нижняя шарнирная область представляет собой остатки 244-251.

Таким образом, шарнирная область, содержащая верхнюю шарнирную область, центральную шарнирную область и нижнюю шарнирную область, в IgG1 имеет длину 23 аминокислоты, как показано на фиг. 1a. Верхняя шарнирная область представляет собой 10 аминокислот. Центральная шарнирная область представляет собой 5 аминокислот, и нижняя шарнирная область представляет собой 8 аминокислот (см., например, фиг. 1b).

Шарнирная область, содержащая верхнюю шарнирную область, центральную шарнирную область и нижнюю шарнирную область в IgG4, имеет длину 20 аминокислот, как показано на фиг. 1a. Верхняя шарнирная область представляет собой 7 аминокислот. Центральная шарнирная область представляет собой 5 аминокислот, и нижняя шарнирная область представляет собой 8 аминокислот (см., например, фиг. 1b).

Новые мутантные IgG4-антитела в соответствии с настоящим изобретением были разработаны путем модификации расположения межцепочечных дисульфидных связей в IgG4, в частности модифицированы расположения межцепочечных дисульфидных связей C_L-C_H1 между легкой цепью (LC) и тяжелой цепью (HC).

На фиг. 1b представлены отделы последовательностей тяжелой и легкой цепей IgG человека для 1-4 изотипов IgG, на которых указаны положения цистеина (подчеркнуты), которые формируют межцепочечные дисульфидные связи C_L-C_H1. Межцепочечная дисульфидная связь C_L-C_H1 в IgG1 образована между LC C214 (система нумерации Kabat) и C233 (система нумерации Kabat) в HC непосредственно перед шарнирной областью. Напротив, дисульфидная связь C_H1-C_L для IgG2, 3 и 4 образуется между LC C214 и C127, N-концевым относительно внутрицепочечной дисульфидной связи в HC. Последовательности LC и HC, окружающие остатки цистеина, вовлеченные в образование дисульфидной связи C_L-C_H1, представлены и выровнены на фиг. 1b.

В рамках настоящего изобретения проводили исследование того, как дисульфидная связь C_L-C_H1 влияет на свойства IgG4-антитела, включая термостабильность, структурную стабильность, гетерогенность дисульфидных связей изоформ, аффинность и обмен половинными молекулами в антителе.

Мутанты IgG4 можно получать путем замены остатка цистеина в положении 127 C_H1 другой аминокислотой, а также путем замены одной или нескольких аминокислот в верхней шарнирной области, предпочтительно аминокислот в положениях, выбранных из 227, 228, 229 и 230, пронумерованных по системе нумерации Kabat для IgG4, на цистеин. Положения 227, 228, 229 или 230 находятся в или вблизи эквивалентного структурного положения, в котором расположен цистеин 233 IgG1.

Каждая тяжелая цепь может содержать дополнительные мутации, включающие замену одного или

обоих из остатков цистеина 239 и 242 в шарнирной области IgG4 на другую аминокислоту. Также в некоторые антитела может быть включена мутация для удлинения верхней шарнирной области IgG4 на три аминокислоты между положениями 238 и 239 так, чтобы они имели ту же длину, что и шарнирная область IgG1. Также в некоторые антитела вносили мутацию S241P.

Таким образом, в одном из вариантов осуществления предусматривается IgG4-антитело, в котором цистеин 127 заменен на другую аминокислоту, и цистеин легкой цепи связан через дисульфидную связь с модифицированным способом инженерии цистеином в положении 227, 228, 229 или 230.

В одном из вариантов осуществления верхняя шарнирная область и центральная шарнирная область выбраны из следующих последовательностей:

```
ESKYGPPCPSCP SEQ ID NO:108; ESKYGDKCPSCP SEQ ID NO:109;
EPSKYGPPCPSCP SEQ ID NO:110; EPSKYGDKCPSCP SEQ ID NO:111;
ESKSYGPPCPSCP SEQ ID NO:112; ESKSYGDKCPSCP SEQ ID NO:113;
ESKYGPPAACPSCP SEQ ID NO:114; ESKYGPPGGCPSCP SEQ ID NO:115;
ESKYGPPHTCPSCP SEQ ID NO:116; ESKYGDKHTCPSCP SEQ ID NO:117;
EPSKYGPPAACPSCP SEQ ID NO:118; EPSKYGPPGGCPSCP SEQ ID NO:119;
EPSKYGPPHTCPSCP SEQ ID NO:120; EPSKYGDKHTCPSCP SEQ ID NO:121;
ESKSYGPPAACPSCP SEQ ID NO:122; ESKSYGPPGGCPSCP SEQ ID NO:123;
ESKSYGPPHTCPSCP SEQ ID NO:124; ESKSYGDKHTCPSCP SEQ ID NO:125;
ESKYGPPACPSCP SEQ ID NO:126; ESKYGPPGCPSCP SEQ ID NO:127;
ESKYGPPTCPSCP SEQ ID NO:128; ESKYGDKTTCPSCP SEQ ID NO:129;
EPSKYGPPACPSCP SEQ ID NO:130; EPSKYGPPGCPSCP SEQ ID NO:131;
EPSKYGPPTCPSCP SEQ ID NO:132; EPSKYGDKTTCPSCP SEQ ID NO:133;
ESKSYGPPACPSCP SEQ ID NO:134; ESKSYGPPGCPSCP SEQ ID NO:135;
ESKSYGPPTCPSCP SEQ ID NO:136; ESKSYGDKTTCPSCP SEQ ID NO:137;
ESKYGPPHTCPSCP SEQ ID NO:138; ESKYGDKTHCPSCP SEQ ID NO:139;
EPSKYGPPHTCPSCP SEQ ID NO:140; EPSKYGDKTHCPSCP SEQ ID NO:141;
ESKSYGPPHTCPSCP SEQ ID NO:142; ESKSYGDKTHCPSCP SEQ ID NO:143;
ESKYGPPHTCPSCP SEQ ID NO:144; ESKYGDKHTCPSCP SEQ ID NO:145;
EPSKYGPPHTCPSCP SEQ ID NO:146; EPSKYGDKHTCPSCP SEQ ID NO:147;
ESKSYGPPHTCPSCP SEQ ID NO:148; ESKSYGDKHTCPSCP SEQ ID NO:149;
ESKYGPPTCPSCP SEQ ID NO:150; ESKYGDKTCPSCP SEQ ID NO:151;
EPSKYGPPTCPSCP SEQ ID NO:152; EPSKYGDKTCPSCP SEQ ID NO:153;
ESKSYGPPTCPSCP SEQ ID NO:154; ESKSYGDKTCPSCP SEQ ID NO:155;
ESKYGPPHCPSCP SEQ ID NO:156; ESKYGDKHCPSCP SEQ ID NO:157;
EPSKYGPPHCPSCP SEQ ID NO:158; EPSKYGDKHCPSCP SEQ ID NO:159;
ESKSYGPPHCPSCP SEQ ID NO:160; ESKSYGDKHCPSCP SEQ ID NO:161;
EPKSCDKAACPPCP SEQ ID NO:162; EPKSCDKGGCPPCP SEQ ID NO:163;
EPKSCDKHTSPPCP SEQ ID NO:164; EPKSCDKHTCPPSP SEQ ID NO:165;
EPKSCDKHTSPPSP SEQ ID NO:166; EPKSCDKAASPPCP SEQ ID NO:167;
EPKSCDKAACPPSP SEQ ID NO:168; EPKSCDKAASPPSP SEQ ID NO:169;
EPKSCDKGGSPPCP SEQ ID NO:170; EPKSCDKGGCPPSP SEQ ID NO:171;
EPKSCDKGGSPSP SEQ ID NO:172; EPKSCDKACPPCP SEQ ID NO:173;
```

EPKSCDKGCPPCP SEQ ID NO:174; EPKSCDKTSPPCP SEQ ID NO:175;
 EPKSCDKTCPPSP SEQ ID NO:176; EPKSCDKTSPPSP SEQ ID NO:177;
 EPKSCDKASPPCP SEQ ID NO:178; EPKSCDKACPPSP SEQ ID NO:179;
 EPKSCDKASPPSP SEQ ID NO:180; EPKSCDKGSPPCP SEQ ID NO:181;
 EPKSCDKGCPPSP SEQ ID NO:182; EPKSCDKGSPPSP SEQ ID NO:183;
 EPKSCDKCPPCP SEQ ID NO:184; EPKSCDKCPPCP SEQ ID NO:185;
 EPKSCDKSPPCP SEQ ID NO:186; EPKSCDKCPPSP SEQ ID NO:187;
 EPKSCDKSPPSP SEQ ID NO:188; EPKSCDKSPPCP SEQ ID NO:189;
 EPKSCDKCPPSP SEQ ID NO:190; EPKSCDKSPPSP SEQ ID NO:191;
 EPKSCDKSPPCP SEQ ID NO:192; EPKSCDKCPPSP SEQ ID NO:193;
 EPKSCDKSPPSP SEQ ID NO:194; EPKSCDKTTSPPCP SEQ ID NO:195;
 EPKSCDKTTCPPSP SEQ ID NO:196; EPKSCDKTTSPPSP SEQ ID NO:197;
 EPKSCDKTHSPPCP SEQ ID NO:198; EPKSCDKTHCPPSP SEQ ID NO:199;
 EPKSCDKTHSPPSP SEQ ID NO:200; ESKYGPPCPPCP SEQ ID NO:201;
 ESKYGPPCPPCP SEQ ID NO:202; ESKYGPPCPPCP SEQ ID NO:203
 ESKYGDKCPPCP SEQ ID NO:204; ESKYGPPCPPCPSEQ ID NO:205;
 EPSKYGPPCPPCP SEQ ID NO:206; EPSKYGPPCPPCP SEQ ID NO:207;
 EPSKYGDKCPPCP SEQ ID NO:208; ESKSYGPPCPPCP SEQ ID NO:209;
 ESKSYGPPCPPCP SEQ ID NO:210; ESKSYGPPCPPCP SEQ ID NO:211;
 ESKSYGDKCPPCP SEQ ID NO:212; ESKYGPPAACPPCP SEQ ID NO:213;
 ESKYGPPGGCPPCP SEQ ID NO:214; ESKYGPPHTCPPCP SEQ ID NO:215;
 ESKYGDKHTCPPCP SEQ ID NO:216; EPSKYGPPAACPPCP SEQ ID NO:217;
 EPSKYGPPGGCPPCP SEQ ID NO:218; EPSKYGPPHTCPPCP SEQ ID NO:219;
 EPSKYGDKHTCPPCP SEQ ID NO:220; ESKSYGPPAACPPCP SEQ ID NO:221;
 ESKSYGPPGGCPPCP SEQ ID NO:222; ESKSYGPPHTCPPCP SEQ ID NO:223;
 ESKSYGDKHTCPPCP SEQ ID NO:224; ESKYGPPACPPCP SEQ ID NO:225;
 ESKYGPPGCPPCP SEQ ID NO:226; ESKYGPPHTCPPCP SEQ ID NO:227;
 ESKYGDKTTCPPCP SEQ ID NO:228; EPSKYGPPACPPCP SEQ ID NO:229;
 EPSKYGPPGCPPCP SEQ ID NO:230; EPSKYGPPHTCPPCP SEQ ID NO:231;
 EPSKYGDKTTCPPCP SEQ ID NO:232; ESKSYGPPACPPCP SEQ ID NO:233;
 ESKSYGPPGCPPCP SEQ ID NO:234; ESKSYGPPHTCPPCP SEQ ID NO:235;
 ESKSYGDKTTCPPCP SEQ ID NO:236; ESKYGPPHTCPPCP SEQ ID NO:237;
 ESKYGDKHTCPPCP SEQ ID NO:238; EPSKYGPPHTCPPCP SEQ ID NO:239;
 EPSKYGDKHTCPPCP SEQ ID NO:240; ESKSYGPPHTCPPCP SEQ ID NO:241;
 ESKSYGDKHTCPPCP SEQ ID NO:242; ESKYGPPHTCPPCP SEQ ID NO:243;
 ESKYGDKHTCPPCP SEQ ID NO:244; EPSKYGPPHTCPPCP SEQ ID NO:245;
 EPSKYGDKHTCPPCP SEQ ID NO:246; ESKSYGPPHTCPPCP SEQ ID NO:247;
 ESKSYGDKHTCPPCP SEQ ID NO:248; ESKYGPPHTCPPCP SEQ ID NO:249;
 ESKYGDKTTCPPCP SEQ ID NO:250; EPSKYGPPHTCPPCP SEQ ID NO:251;
 EPSKYGDKTTCPPCP SEQ ID NO:252; ESKSYGPPHTCPPCP SEQ ID NO:253;
 ESKSYGDKTTCPPCP SEQ ID NO:254; ESKYGPPHTCPPCP SEQ ID NO:255;
 ESKYGDKHTCPPCP SEQ ID NO:256; EPSKYGPPHTCPPCP SEQ ID NO:257;
 EPSKYGDKHTCPPCP SEQ ID NO:258; ESKSYGPPHTCPPCP SEQ ID NO:259;
 ESKSYGDKHTCPPCP SEQ ID NO:260; EPKSCDKTHTCPPCP SEQ ID NO:261;
 EPKSCDKTHTCPSCP SEQ ID NO:262; ESKYCPACPSCP SEQ ID NO:263;
 ESKYCPAACPSCP SEQ ID NO:264; ESKYCPAACPSCP SEQ ID NO:265;
 ESKYCPAAASPSCP SEQ ID NO:266; ESKYCPAAACPSSP SEQ ID NO:267;
 ESKCGPAAACPSCP SEQ ID NO:268; ESKYCPAAACPSCP SEQ ID NO:269;
 ESKYCPAAAAACPSCP SEQ ID NO:270; ESKYCPGGGCPSCP SEQ ID NO:271;
 ESKYCPSSSCPSCP SEQ ID NO:272; ESKYCPPTCPSCP SEQ ID NO:273;
 ESKYCPPTHCPSCP SEQ ID NO:274; ESKYCPPTHTCPSCP SEQ ID NO:275;
 ESKYCPKTHCPSCP SEQ ID NO:276; ESKYCDKTHCPSCP SEQ ID NO:277;
 ESKYCDKTHCPSCP SEQ ID NO:278; ESKYCDKTHCPSCP SEQ ID NO:279;
 ESKYCDKAAACPSCP SEQ ID NO:280; ESKYCDKCPSCP SEQ ID NO:281;
 ESKSCDKTHTCPSCP SEQ ID NO:282; EPKYCDKTHCPSCP SEQ ID NO:283;
 EPKSCPPCPSCP SEQ ID NO:284; ESKSCPPCPSCP SEQ ID NO:285;
 EPKYCPCPSCP SEQ ID NO:286; ECKYGPPCPSCP SEQ ID NO:287;
 ECKYGPPSPSCP SEQ ID NO:288; ECKYGPPCPSSP SEQ ID NO:289;
 ESCYGPPCPSCP SEQ ID NO:290; ESCYGPPSPSCP SEQ ID NO:291;
 ESCYGPPCPSSP SEQ ID NO:292; ESKCGPPCPSCP SEQ ID NO:293;
 ESKCGPPSPSCP SEQ ID NO:294; ESKCGPPCPSSP SEQ ID NO:295.

В одном из вариантов осуществления центральная шарнирная область в одной или обеих последовательностях тяжелой цепи или ее фрагментов имеет последовательность CPPCP SEQ ID NO: 322.

Без связи с теорией полагают, что эта последовательность, вероятно, блокирует динамический обмен плеч антитела при концентрациях, подобных концентрациям "in vivo", например при концентрации восстановителя менее 0,5 мМ, в частности концентрации восстановителя порядка 5 мкМ считают физиологически значимыми (Zilmer et al., 2005, Drug Design Reviews vol. 2, no. 2, pp. 121-127, 2005).

Мутации антител по настоящему изобретению далее описаны подробно. Способы замены аминокислот хорошо известны в области молекулярной биологии. Такие способы включают, например, сайт-направленный мутагенез с использованием способов, таких как ПЦР, для удаления и/или замены аминокислот или для конструирования синтетических последовательностей de novo.

На фиг. 2a представлены остатки шарнирной области IgG1 дикого типа, IgG4 дикого типа и положения, в которых в антителах по настоящему изобретению внесены мутации. Нумерация основана на системе нумерации Kabat.

Антитела в соответствии с настоящим изобретением содержат мутацию в положении 127 (C127), где остаток цистеина заменен на другую аминокислоту, предпочтительно аминокислоту, которая не содержит тиольную группу. Под заменой или замещением авторы настоящего изобретения подразумевают, что, когда обычно в природе встречается межцепочечный цистеин 127 в тяжелой цепи антитела, вместо него находится другая аминокислота. Мутация в положении C127 может представлять собой любую подходящую мутацию одного, двух или трех нуклеотидов, кодирующих аминокислоту в положении 127, которая заменяет аминокислотный остаток с цистеина на другую подходящую аминокислоту. Примеры подходящих аминокислот включают серин, треонин, аланин, глицин или любую полярную аминокислоту. Особенно предпочтительной аминокислотой является серин.

Замена цистеина в положении 127 другой аминокислотой удаляет цистеин из домена C_H1, который обычно формирует дисульфидную связь с цистеином в легкой цепи IgG4 дикого типа. Таким образом, для формирования пары легкой цепи и тяжелой цепи посредством межцепочечной дисульфидной связи легкая цепь должна образовывать дисульфидную связь с цистеином, который расположен в шарнирной области тяжелой цепи.

В первом аспекте изобретения антитела в соответствии с настоящим изобретением содержат тяжелую цепь, где одна или несколько из аминокислот в положениях, выбранных из 227, 228, 229 и 230, пронумерованных по системе нумерации Kabat, заменена на цистеин. Таким образом, антитела в соответствии с настоящим изобретением могут содержать одну или несколько из следующих мутаций: S227C; K228C; Y229C; G230C.

Предпочтительно только один остаток, выбранный из 227, 228, 229 и 230, заменен на остаток цистеина.

Особенно предпочтительные антитела по настоящему изобретению содержат мутацию Y229C или G230C.

Включение остатка цистеина в положение, выбранное из 227, 228, 229 и 230, в шарнирной области тяжелой цепи обеспечивает новое положение для образования межцепочечной дисульфидной связи между тяжелой цепью и легкой цепью.

В антитела согласно этому аспекту настоящего изобретения можно вносить дополнительные мутации. В одном из вариантов осуществления цистеин в положении 239 (C239) и/или цистеин в положении 242 (C242), пронумерованные по системе нумерации Kabat, в тяжелой цепи заменены на другую аминокислоту, предпочтительно аминокислоту, которая не содержит тиольной группы. Под заменой или замещением авторы настоящего изобретения подразумевают, что, когда цистеин 239 и/или цистеин 242 обычно встречаются в тяжелой цепи антитела, вместо него находится другая аминокислота. Мутация в положениях C239 и/или C242 может представлять собой любую подходящую мутацию одного, двух или трех нуклеотидов, кодирующих аминокислоту, которая заменяет остаток аминокислоты с цистеина на другую подходящую аминокислоту. Примеры подходящих аминокислот включают серин, треонин, аланин, глицин или любую полярную аминокислоту. Особенно предпочтительной аминокислотой является серин.

В одном из вариантов осуществления цистеин в положении 239 тяжелой цепи заменен на другую аминокислоту и цистеин в положении 242 тяжелой цепи заменен на другую аминокислоту. В этом варианте осуществления замена как C239, так и C242 удаляет оба остатка цистеина в шарнирной области тяжелой цепи, которые обычно формируют дисульфидные связи между тяжелыми цепями с соответствующими остатками цистеина в другой тяжелой цепи. Полученные половинные молекулы могут образовывать целые молекулы антитела путем образования нековалентных связей между двумя тяжелыми цепями.

В альтернативном варианте осуществления цистеин в положении 239 тяжелой цепи заменен на другую аминокислоту. В этом варианте осуществления цистеин в положении 242 не заменен на другую аминокислоту.

В следующем альтернативном варианте осуществления цистеин в положении 242 тяжелой цепи заменен на другую аминокислоту. В этом варианте осуществления цистеин в положении 239 не заменен на

другую аминокислоту.

Замена либо С239, либо С242, приводит к тому, что в тяжелой цепи остается один остаток цистеина, который способен образовывать дисульфидную связь между тяжелыми цепями с цистеином в другой тяжелой цепи. Без связи с теорией, полагают, что замена одного остатка цистеина в шарнирной области, в частности, замена С239, уменьшает образование внутрицепочечной дисульфидной связи в шарнирной области и, таким образом, может снижать образование молекул половинных антител.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения пролин в положении 240 может быть заменен на другую аминокислоту.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения серин в положении 241 может быть заменен на другую аминокислоту.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, где серин в положении 227 заменен на цистеин, антитело предпочтительно не содержит мутаций в положениях С239 и С242. В другом варианте осуществления, где серин в положении 227 заменен на цистеин, цистеин в положении 239 тяжелой цепи предпочтительно заменен на другую аминокислоту, однако цистеин в положении 242 не заменен на другую аминокислоту.

В одном из вариантов осуществления антитела по настоящему изобретению содержат тяжелую цепь IgG4, в которую внесена мутация для встраивания одной или нескольких аминокислот между аминокислотами 226-243. Количество встроенных аминокислот может составлять от 1 до 10, от 1 до 5, от 1 до 3, предпочтительно встраивают 1, 2, 3 или 4 аминокислоты. Аминокислоты предпочтительно встраивают между аминокислотами 238 и 239. В шарнирной области можно встраивать любые подходящие аминокислоты, такие как аланин, глицин, серин или треонин и их комбинации. Предпочтительно встраивают три остатка аланина (AAA), три остатка глицина (GGG), три остатка серина (SSS) или три остатка треонина (TTT) или треонин, гистидин и еще один треонин (THT). Полагают, что антитела по настоящему изобретению, содержащие тяжелую цепь IgG4, в которую внесена мутация для встраивания трех аминокислот в шарнирной области, демонстрируют увеличенную стабильность, например термостабильность.

Следующей мутацией, которую вносят в антитела в соответствии с настоящим изобретением, является мутация S241P. Ранее было показано, что эта мутация уменьшает образование половинных молекул при биологически характерных концентрациях (Angal, S. et al., 1993. A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody. *Mol Immunol*, 30, 105-108). Неожиданно было открыто, что мутантные антитела по настоящему изобретению, которые содержат мутацию S241P, демонстрируют некоторый обмен тяжелыми цепями *in vitro* в жестких восстанавливающих условиях по сравнению с IgG4 P (IgG4 с S241P). Это позволяет получение биспецифических антител *in vitro* из мутантных IgG4-антител по настоящему изобретению.

Антитела в соответствии с настоящим изобретением могут содержать одну или несколько дополнительных мутаций в шарнирной области. Например, антитела могут дополнительно содержать одну или несколько из следующих мутаций: S227P, Y229S, P237D и P238K.

В одном из вариантов осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением, по существу, содержит шарнирную область IgG1 в остатках 226-243 (верхняя шарнирная область и центральная шарнирная область). Таким образом, антитело по настоящему изобретению содержит шарнирную область, где глицин в положении 230 заменен на цистеин, серин в положении 227 заменен на пролин, тирозин в положении 229 заменен на серин, пролин в положении 237 заменен на аспарагиновую кислоту, пролин в положении 238 заменен на лизин, аминокислотная последовательность треонин-гистидин-треонин встроена между положениями 238 и 239, и серин в положении 241 заменен на пролин. Эти мутации также могут быть обозначены как S227P, Y229S, G230C, P237D, P238KTHT и S241P, как показано на фиг. 2а.

Антитело в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно имеет нижнюю шарнирную область IgG4 в остатках с 244 по 251 (APEFLGGP SEQ ID NO: 321). Без связи с теорией полагают, что нижняя шарнирная область IgG4 вносит вклад в отсутствие эффекторной функции IgG4-антитела.

Во втором аспекте настоящего изобретения асимметричное смешанное антитело по настоящему изобретению содержит тяжелую цепь, где цистеин в положении 127 заменен на другую аминокислоту, как описано выше, и цистеин в положении 239 или цистеин в положении 242 при нумерации по системе нумерации Kabat в тяжелой цепи заменен на другую аминокислоту. В этом втором аспекте ни один из остатков в положениях 227, 228, 229 и 230 не замещен остатком цистеина. Таким образом, предусматривается:

асимметричное смешанное антитело, содержащее две тяжелые цепи, каждая из которых содержит, по меньшей мере, переменную область, шарнирную область и домен C_H1, где первая тяжелая цепь или ее фрагмент характеризуется тем, что она принадлежит классу IgG4 и имеет:

а) межцепочечный цистеин в положении 127 при нумерации по системе нумерации Kabat заменен на другую аминокислоту; и

б) необязательно, цистеин в положении 239 или цистеин в положении 242 при нумерации по системе нумерации Kabat заменен на другую аминокислоту;

где вторая тяжелая цепь или ее фрагмент характеризуется тем, что она обладает аминокислотной последовательностью, отличающейся от указанной первой тяжелой цепи в области вне вариательной области.

Во втором аспекте настоящего изобретения антитело может содержать одну или несколько дополнительных мутаций. В одном из вариантов осуществления антитело содержит по меньшей мере первую тяжелую цепь IgG4, в которую внесена мутация для встраивания трех аминокислот между аминокислотами 226-243, предпочтительно между аминокислотами 238 и 239, как описано выше. В следующем варианте осуществления антитело содержит мутацию S241P. В следующем варианте осуществления антитело может дополнительно содержать одну или несколько из следующих мутаций: S227P, Y229S, P237D и P238K.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к асимметричному смешанному антителу, содержащему две тяжелые цепи, каждая из которых содержит вариательную область, домен C_{H1} и шарнирную область (такие как две тяжелые цепи независимо), причем каждая тяжелая цепь независимо содержит последовательность, выбранную из одной из следующих последовательностей: SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 и SEQ ID NO: 37.

В одном из вариантов осуществления асимметричное смешанное антитело по настоящему изобретению содержит две тяжелые цепи, каждая из которых содержит вариательную область, домен C_{H1} и шарнирную область (такие как две тяжелые цепи независимо), причем каждая тяжелая цепь независимо содержит последовательность, выбранную из одной из следующих последовательностей: SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 и SEQ ID NO: 37. Более конкретно, асимметричное смешанное антитело по настоящему изобретению содержит две тяжелые цепи, каждая из которых содержит вариательную область, домен C_{H1} и шарнирную область (такие как две тяжелые цепи независимо), каждая тяжелая цепь независимо содержит последовательность, выбранную из одной из следующих последовательностей: SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 и SEQ ID NO: 37.

Таким образом, настоящее изобретение относится к асимметричному смешанному антителу, содержащему две тяжелые цепи, каждая из которых содержит вариательный домен, домен C_{H1} и шарнирную область, домен C_{H2} и домен C_{H3} (такие как две тяжелые цепи независимо), каждая из которых содержит последовательность, независимо выбранную из одной из следующих последовательностей: SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62 и SEQ ID NO: 63.

В одном из вариантов осуществления асимметричное смешанное антитело по настоящему изобретению содержит две тяжелые цепи, каждая из которых содержит вариательную область, домен C_{H1} и шарнирную область, где каждая тяжелая цепь независимо содержит SEQ ID NO: 36 (антитело 28P), SEQ ID NO: 37 (антитело 44P) или SEQ ID NO: 35 (антитело 48).

В одном из вариантов осуществления асимметричное смешанное антитело по настоящему изобретению содержит две тяжелые цепи, каждая из которых содержит вариательную область, домен C_{H1} , шарнирную область, домен C_{H2} и домен C_{H3} , где каждая тяжелая цепь независимо содержит SEQ ID NO: 62 (антитело 28P), SEQ ID NO: 63 (антитело 44P) или SEQ ID NO: 61 (антитело 48).

В любом из описанных выше вариантов осуществления вторая тяжелая цепь антитела может быть выбрана из любой последовательности тяжелой цепи, описанной в настоящем описании.

В табл. 1 ниже приведены иллюстративные антитела с мутациями, которые были внесены, по сравнению с последовательностью IgG4 дикого типа. Также табл. 1 включает антитела IgG1 и IgG4 дикого типа и контрольные антитела.

Таблица 1

Номер антитела	Мутации тяжелой цепи (нумерация Kabat)	Домен C _H 1 и шарнирная область SEQ ID NO:	C _H 1, шарнирная область, C _H 2 и C _H 3 SEQ ID NO:
1	C127S	296	306
2	C127S, C239S	33	59
3	C127S, C242S	34	60
4	C127S, C242S, C239S	297	307
5	G230C	298	308
5P	G230C, S241P	299	309
6	C127S, G230C, C239S	12	38
7	C127S, G230C, C242S	13	39
8	C127S, G230C, C239S, C242S	14	40
9	G230C, C239S	300	310
10	G230C, C242S	301	311
11	G230C, C239S, C242S	302	312
12	C239S	303	313
13	C242S	304	314
14	C239S, C242S	305	315
15	C127S, G230C	15	41
16	C127S, G230C, S241P	16	42
17	IgG4 человека дикого типа	2	-
18	S241P	-	-
19	IgG1 человека дикого типа	1	-
28	C127S Y229C	17	43
28P	C127S Y229C, S241P	36	62
29	C127S Y229C C239S	18	44
30	C127S Y229C C242S	19	45
31	C127S Y229C C239S C242S	20	46
32	C127S K228C	21	47
33	C127S K228C C239S	22	48
34	C127S K228C C242S	23	49
35	C127S K228C C239S C242S	24	50
36	C127S S227C	25	51
37	C127S S227C C239S	26	52
38	C127S S227C C242S	27	53
39	C127S S227C C239S C242S	28	54
44	C127S G230C P238PAAA	29	55
44P	C127S G230C P238PAAA, S241P	37	63
45	C127S G230C P238PAAA C239S	30	56
46	C127S G230C P238PAAA C242S	31	57
47	C127S G230C P238PAAA C239S C242S	32	58
48	C127S, S227P, Y229S, G230C, P237D, P238KTHT, S241P	35	61
49	C127S G230C P238PA		
50	C127S G230C P238PAA S241P		
51	C127S, G230C, P238PAAAA		
52	C127S, G230C, P238PAAAAA		
55	C127S, G230C, P238PTHT		
56	C127S, G230C, P237D, P238KTHT		
57	C127S, G230C, P238PGGG		
60	C127S, S227P, G230C		
62	C127S, Y229S, G230C		
64	C127S, S227P, Y229S, G230C		
65	C127S, S227P, Y229S, G230C, P237D, P238KTHT		
66	C127S, G230C, P237D, P238KTH		
67	C127S, G230C, P237D, P238KT		
68	C127S, G230C, P237D, P238K		
69	C127S, G230C P237D, P238KAAA		
71	C127S, S227P, G230C, P237D, P238KTHT		
73	C127S, Y229S, G230C, P237D, P238KTHT		

74	Центральная шарнирная область C127S Y229C, SPSCP		
75	Центральная шарнирная область C127S G230C, CPSCP		
76	Центральная шарнирная область C127S Y229C, CPSCP		
77	Центральная шарнирная область C127S G230C, SPSCP		

В одном из вариантов осуществления первую последовательность тяжелой цепи IgG4 комбинируют со второй последовательностью тяжелой цепи IgG4, каждая из которых содержит мутации в C_H1 и верхней шарнирной области и последовательности центральной шарнирной области, как описано в табл. 2:

Таблица 2

ПЕРВАЯ ТЯЖЕЛАЯ ЦЕПЬ	ВТОРАЯ ТЯЖЕЛАЯ ЦЕПЬ
C127S Y229C (Ab 28)	C127S Y229C S241P (Ab 28P)
C127S Y229C S241P (Ab 28P)	IgG4 WT
C127S Y229C (Ab 28)	IgG4 WT
C127S G230C (Ab 15)	C127S G230C S241P (Ab 16)
C127S G230C S241P (Ab 15P)	IgG4 WT
C127S G230C (Ab 15)	IgG4 WT
C127S + шарнирная область IgG1 (Ab 48)	C127S G230C (Ab 15)
C127S + шарнирная область IgG1 (Ab 48)	C127S G230C S241P (Ab 15P)
C127S + шарнирная область IgG1 (Ab 48)	C127S Y229C (Ab 28)
C127S + шарнирная область IgG1 (Ab 48)	C127S Y229C S241P (Ab 28P)
C127S + шарнирная область IgG1 (Ab 48)	C127S, S227P, Y229S, G230C, P237D, P238KTNT (Ab 65)
Центральная шарнирная область C127S Y229C, SPSCP (Ab 74)	Центральная шарнирная область C127S Y229C, CPSCP, или центральная шарнирная область, CPSCP (Ab 28P или 28)
Центральная шарнирная область C127S Y229C, SPSCP (Ab 29)	Центральная шарнирная область C127S Y229C, CPSCP, или центральная шарнирная область, CPSCP (Ab 28P или 28)
Центральная шарнирная область C127S G230C, SPSCP (Ab 6)	Центральная шарнирная область C127S G230C, CPSCP, или центральная шарнирная область, CPSCP (Ab 16 или 15)
Центральная шарнирная область C127S G230C, CPSCP (Ab 75)	Центральная шарнирная область C127S G230C, CPSCP, или центральная шарнирная область, CPSCP (Ab 16 или 15)
Центральная шарнирная область C127S G230C, CPSCP (Ab 75)	Центральная шарнирная область C127S Y229C, CPSCP, или центральная шарнирная область, CPSCP (Ab 28P или 28)
Центральная шарнирная область C127S Y229C, CPSCP (Ab 76)	Центральная шарнирная область C127S Y229C, CPSCP, или центральная шарнирная область, CPSCP (Ab 28P или 28)
Центральная шарнирная область C127S Y229C, CPSCP (Ab 76)	Центральная шарнирная область C127S G230C, CPSCP, или центральная шарнирная область, CPSCP (Ab 16 или 15)
C127S G230C P238PAAA (Ab 44)	C127S G230C P238PAAA S241P (Ab 44P)
C127S G230C P238PAAA (Ab 44)	IgG4 WT P238PAAA

C127S G230C P238PAAA (Ab 44)	IgG4 WT
C127S G230C P238PAAA S241P (Ab 44P)	IgG4 WT
C127S + шарнирная область IgG1 (Ab 48)	IgG4 WT
C127S, S227P, Y229S, G230C, P237D, P238KTHT (Ab 65)	IgG4 WT
IgG4 дикого типа (S241)	S241G
	S241A
	S241D
	S241E
	S241K
	S241T
	S241P
IgG4 S241G	C127C и Y229C
	S241A
	S241T
	S241D
	S241E
IgG4 S241T	S241K
	S241A
IgG4 дикого типа (S241)	C239S
	C242S
	C239C и C242C
	C127C и Y229C
IgG4 S241P	C127C и Y229C
	S241G
	S241A
	S241T
	S241D
	S241E
IgG4 C127S и Y229C	S241K
	C239C и C242C
	S241G
	S241A
	S241T
	S241D
	S241E
IgG4 C239C и C242C	S241K
	S241G
	S241A
	S241T
	S241D
	S241K
	S241E
	C239C и C242C
IgG4 S241P	C239S
	C242S
	C239C и C242C

Таким образом, настоящее изобретение относится к асимметричному смешанному антителу, содержащему две тяжелые цепи, каждая из которых содержит, по меньшей мере, вариабельную область, шарнирную область и домен С_H1, где последовательности первой тяжелой цепи и второй тяжелой цепи представляют собой последовательности тяжелой цепи IgG4, выбранные из комбинаций мутаций последовательностей первой и второй тяжелых цепей, приведенных в табл. 2.

Асимметричное смешанное антитело может содержать первую и вторую тяжелые цепи, где каждая константная последовательность тяжелой цепи содержит мутации в домене С_H1 и шарнирной области, как описано выше, и где мутации домена С_H1 и шарнирной области в каждой тяжелой цепи различаются. Альтернативно, константные последовательности первой тяжелой цепи могут содержать мутации домена С_H1 и шарнирной области, как описано выше, и константная последовательность второй тяжелой цепи представляет собой IgG4 дикого типа или IgG4 дикого типа с мутацией S241P.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения асимметричное смешанное антитело представляет собой биспецифическое антитело, где каждая тяжелая цепь имеет отличающиеся переменные области. Предпочтительно антитело также содержит две легких цепи, где каждая пара тяжелая-легкая цепь (Fab) имеет отличающиеся переменные области.

Подразумевают, что "отличающиеся переменные области", как используют в настоящем описании, относятся к тому, что указанные переменные области обладают специфичностью к различным антигенам. Иными словами, антиген, к которому каждая переменная область является специфичной, представляет собой отличающийся антиген или часть антигена, например отличающийся эпитоп.

"Специфический", как используют в настоящем описании, относится к тому факту, что связывающие домены распознают антиген-мишень с более высокой аффинностью и/или авидностью, чем другие антигены, к которым они не являются специфичными (например, 10, 20, 50, 100 или 1000 более). Это необязательно подразумевает, что специфическая связывающая область не связывает какой-либо антиген, не являющийся мишенью, а скорее взаимодействие с мишенью является таким, что его можно использовать для очистки антигена-мишени (в отношении которого она является специфической) из комплексной смеси антигенов, включающей антигены того же семейства белков.

В одном из вариантов осуществления антитело по настоящему изобретению является выделенным.

Выделенный, как используют в настоящем описании, относится к антителу, которое является выделенным из организма человека, например получено рекомбинантными способами, очищено с использованием способа, такого как хроматография, и/или находится в фармацевтическом составе.

Термин "антитело", как используют в рамках изобретения, включает интактные (целые) антитела и функционально активные фрагменты, которые содержат две тяжелые цепи, каждая из которых содержит домен V_H , домен C_{H1} и шарнирную область. Антитело в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно содержит по меньшей мере одну легкую цепь. Таким образом, термин "антитело" в рамках настоящего изобретения охватывает двух-, трех- или четырехвалентные антитела, димер Fab'- и $F(ab')_2$ -фрагментов и целые молекулы антител, содержащие две пары легких и тяжелых цепей.

Как хорошо известно в данной области, типичная молекула Fab' содержит пару тяжелой и легкой цепи, в которой тяжелая цепь содержит переменную область V_H , константный домен C_{H1} и шарнирную область, и легкая цепь содержит переменную область V_L и константный домен C_L .

В одном из вариантов осуществления предусматривается димер Fab' по настоящему изобретению, например димеризация может происходить через шарнирную область.

В одном из вариантов осуществления тяжелая цепь содержит домен C_{H2} и домен C_{H3} и, необязательно, домен C_{H4} . В одном из вариантов осуществления антитело содержит две тяжелые цепи, каждая из которых является такой, как определено выше в первом или втором аспекте настоящего изобретения. Антитела в соответствии с настоящим изобретением также предпочтительно содержат две легких цепи, которые могут быть одинаковыми или могут отличаться. В варианте осуществления настоящего изобретения, который относится к биспецифическому антителу, которое содержит две тяжелые цепи, как определено выше, и две легких цепи, две легких цепи имеют различные переменные области и могут иметь одинаковые или различные константные области.

В одном из вариантов осуществления в используемые домены C_{H2} и C_{H3} можно вносить мутации, например, для уменьшения образования агрегатов IgG4-антител. В US 2008/0063635, Takahashi et al., описано исследование мутанта IgG4, в котором аргинин в положении 409 (409 при нумерации по системе нумерации EU или 440 при нумерации по системе нумерации Kabat) в домене C_{H3} заменен на лизин, треонин, метионин или лейцин для ингибирования образования агрегата при низком значении pH. Также описаны дополнительные мутации в положениях L235, D265, D270, K322, P329 и P331 (L235, D265, D270, K322, P329 и P331 при нумерации по системе нумерации EU или L248, D278, D283, K341, P348 и P350 при нумерации по системе нумерации Kabat) для ослабления активности CDC. В WO 2008/145142 Van de Winkel et al. описаны стабильные IgG4-антитела, которые обладают сниженной способностью претерпевать "обмен Fab-плечами" (обозначаемый в настоящем описании как динамический обмен тяжелыми цепями) путем замены остатка аргинина в положении 409, остатка Phe в положении 405 или остатка Lys в положении 370 (R409, F405 и K370 при нумерации по системе нумерации EU или R440, F436 и K393 при нумерации по системе нумерации Kabat), даже в отсутствие мутации S228P (S228 при нумерации по системе нумерации EU или S241 по системе нумерации Kabat) в шарнирной области.

В одном из вариантов осуществления антитело по настоящему изобретению представляет собой целое асимметричное смешанное антитело, содержащее две легких цепи и две тяжелые цепи, где каждая тяжелая цепь содержит IgG4 C_{H1} , где цистеин в положении 127 при нумерации по системе нумерации Kabat заменен на другую аминокислоту, верхнюю и среднюю шарнирные области IgG1, нижнюю шарнирную область IgG4, домен C_{H2} и домен C_{H3} .

Полная шарнирная область IgG4-антитела, как правило, состоит из остатков 226-251 (нумерация на основе системы нумерации Kabat). Однако шарнирная область может быть укороченной или удлиненной при необходимости. Например, в антителах в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения аминокислота дикого типа заменена на остаток цистеина в положении 227, 228, 229 или 230, шарнирная область может оканчиваться после нового остатка цистеина в положении 227, 228, 229 или 230. Антитела

в соответствии с настоящим изобретением также могут содержать одну или несколько дополнительных аминокислот, расположенных на N-конце и/или C-конце шарнирной области. Кроме того, можно контролировать другие характеристики шарнирной области, такие как расстояние остатков цистеина(ов) от межцепочечного цистеина легких цепей, расстояние между остатками цистеина шарнирной области, и состав других аминокислот в шарнирной области, которые могут влиять на свойства шарнирной области, такие как гибкость, например, остатки глицина можно включать в шарнирную область для увеличения гибкости при вращении, или остатки пролина можно включать для уменьшения гибкости. Альтернативно в шарнирную область можно включать заряженные или гидрофобные остатки для сообщения свойств мультимеризации или очистки. Другие модифицированные шарнирные области могут быть полностью синтетическими и могут быть сконструированы так, чтобы они обладали желаемыми свойствами, такими как длина, композиция и гибкость.

Домены константной области, в частности, в Fc-домене, когда он присутствует, используемые в рамках настоящего изобретения, предпочтительно представляют собой домены изотипа IgG4, где эффекторные функции антител не требуются. Таким образом, каждая тяжелая цепь предпочтительно содержит домен C_H2 и домен C_H3 IgG4, как показано в SEQ ID NO: 64.

Будет понятно, что также можно использовать варианты последовательности доменов константной области Fc.

В одном из вариантов осуществления каждая тяжелая цепь содержит домены C_H2 и C_H3 IgG4, где аргинин в положении 409 (нумерация EU) заменен на лизин, треонин, метионин или лейцин для ингибирования образования агрегата при низких значениях pH (US 2008/0063635 Takahashi et al.) Также описаны мутации L235, D265, D270, K322, P331 и P329 (при нумерации по системе нумерации EU) для ослабления активности CDC (US 2008/0063635 Takahashi et al.).

Каждая тяжелая цепь может содержать мутации, как описано в WO 2008/145142 Van de Winkel et al., где описаны стабильные IgG4-антитела, которые обладают сниженной способностью претерпевать обмен Fab-плечами посредством замены остатка аргинина в положении 409, остатка Phe в положении 405 или остатка Lys в положении 370 (при нумерации по системе нумерации EU).

В одном из вариантов осуществления каждая тяжелая цепь содержит домен C_H2 IgG4 и домен C_H3 IgG1, как показано в SEQ ID NO: 65.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, где антитело представляет собой мутантное антитело IgG3, IgD или IgM, каждая тяжелая цепь предпочтительно содержит домен C_H2 и домен C_H3 и, необязательно, домен C_H4. В IgG3-антителе каждая тяжелая цепь предпочтительно содержит домен C_H2 IgG3 и домен C_H3 IgG3. В IgD-антителе каждая тяжелая цепь предпочтительно содержит домен C_H2 IgD и домен C_H3 IgD. В IgM-антителе каждая тяжелая цепь предпочтительно содержит домен C_H2 IgM, домен C_H3 IgM и домен C_H4 IgM.

В одном из вариантов осуществления антитело представляет собой моноклональный, полностью человеческий, гуманизированный или химерный фрагмент антитела. В одном из вариантов осуществления антитело является полностью человеческим или гуманизированным.

Моноклональные антитела можно получать любым способом, известным в данной области, таким как способ гибридом (Kohler & Milstein, Nature, 1975, 256, 495-497), способ триом, способ В-клеточных гибридом человека (Kozbor et al., Immunology Today, 1983, 4, 72) и способ EBV-гибридомы (Cole et al., "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", pp. 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985).

Антитела для применения в рамках изобретения также можно получать с использованием способов антител единичных лимфоцитов путем клонирования и экспрессии кДНК варибельной области иммуноглобулина, полученной из единичных лимфоцитов, выбранных для продуцирования конкретных антител, например, способами, описанными Babcook, J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93(15), 7843-7848, WO 92/02551, WO 2004/051268 и WO 2004/106377.

Гуманизированные антитела представляют собой молекулы антител из не являющегося человеком вида, имеющие одну или несколько определяющих комплементарность областей (CDR) из не являющегося человеком вида и каркасную область из молекулы иммуноглобулина человека, которая необязательно содержит один или несколько донорных остатков из не являющегося человеком вида (см., например, US 5585089).

Антитела для применения в настоящем изобретении также можно получать с использованием различных способов фагового дисплея, известных в данной области, и включают способы, описанные Brinkman et al., J. Immunol. Methods, 1995, 182, 41-50; Ames et al., J. Immunol. Methods, 1995, 184, 177-186; Kettleborough et al. Eur. J. Immunol., 1994, 24, 952-958; Persic et al., Gene, 1997 187, 9-18 и Burton et al., Advances in Immunology, 1994, 57, 191-280; WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401 и US 5698426; 5223409; 5403484; 5580717; 5427908; 5750753; 5821047; 5571698; 5427908; 5516637; 5780225; 5658727; 5733743 и 5969108. Также для получения гуманизированных антител можно использовать трансгенных мышей или другие организмы, включая других млекопитающих.

Полностью человеческие антитела представляют собой антитела, в которых все варибельные области и константные области (когда они присутствуют) как тяжелой, так и легкой цепей происходят из

человека или, по существу, идентичны последовательностям, происходящим из человека, не обязательно из того же антитела. Примеры полностью человеческих антител могут включать антитела, полученные, например, способами фагового дисплея, описанными выше, и антитела, продуцированные мышами, в которых гены варибельной и/или константной области иммуноглобулинов мыши заменены их аналогами человека, например, как описано в общих терминах в EP 0546073 B1, US 5545806, US 5569825, US 5625126, US 5633425, US 5661016, US 5770429, EP 0438474 B1 и EP 0463151 B1.

Исходный материал для антител для применения в рамках настоящего изобретения можно получить с использованием способов рекомбинантных ДНК, вовлекающих манипулирование и повторную экспрессию ДНК, кодирующей варибельную и константную область(и) антитела. Стандартные способы молекулярной биологии можно использовать для модификации, добавления или делеции аминокислот или доменов при желании. Тем не менее, любые изменения варибельных или константных областей охватываются терминами "варибельные" и "константные", как используют в рамках изобретения.

Исходный материал антител можно получать из любого вида, включая, например, мышь, крысу, кролика, хомяка, верблюда, ламу, козу или человека. Части антитела можно получать из более чем одного вида, например, антитело может быть химерным. В одном примере константные области происходят из одного вида, и варибельные области происходят из другого. Исходный материал антител также может быть модифицированным. В другом примере варибельная область антитела создана с использованием рекомбинантных способов инженерии ДНК. Такие полученные способами инженерии версии включают версии, полученные, например, из природных варибельных областей антител посредством вставок, делеций или замены одной или нескольких аминокислотных последовательностей природных антител.

Конкретные примеры этого типа включают модифицированные способами инженерии домены варибельной области, содержащие по меньшей мере одну CDR и, необязательно, одну или несколько каркасных аминокислот из одного антитела и остальную часть варибельной области домена из второго антитела. Способы получения и изготовления этих антител хорошо известны в данной области (см. например, Boss et al., US 4816397; Cabilly et al., US 6331415; Shrader et al., WO 92/02551; Ward et al., 1989, Nature, 341, 544; Orlandi et al., 1989, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 86, 3833; Riechmann et al., 1988, Nature, 322, 323; Bird et al., 1988, Science, 242, 423; Queen et al., US 5585089; Adair, WO 91/09967; Mountain and Adair, 1992, Biotechnol. Genet. Eng. Rev, 10, 1-142; Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181).

В одном из вариантов осуществления антитело содержит пару варибельных доменов, образующих связывающий домен, которая представляет собой когнатную пару. Как используют в настоящем описании, когнатная пара относится к природной паре варибельных доменов, иными словами, выделенной из одного антитела или экспрессирующей антитело клетки.

Варибельные домены могут быть оптимизированными и/или гуманизированными.

Оптимизированные/гуманизированные варибельные домены, происходящие из когнатной пары, все еще считаются когнатной парой после оптимизации/гуманизации.

Таким образом, изобретение относится к молекулам человека, гуманизированным или химерным молекулам.

В одном из вариантов осуществления молекула специфически связывает антиген-мишень. Специфическое связывание, как используют в настоящем описании, относится к молекулам, обладающим высокой аффинностью в отношении антигена-мишени (к которому они являются специфичными) и которые связывают антигены, в отношении которых они не являются специфичными, с низкой или значительно более низкой аффинностью (или не связываются вовсе). Способы измерения аффинности известны специалистам в данной области и включают такие анализы, как BIAcore™.

Удобно, чтобы молекулы антитела по настоящему изобретению обладали высокой аффинностью связывания, в частности наномолярной или пикомолярной. Аффинность можно измерять с использованием любого подходящего способа, известного в данной области, включая BIAcore™. В одном из вариантов осуществления молекула по настоящему изобретению обладает аффинностью связывания приблизительно 100 пМ или лучше. В одном из вариантов осуществления молекула по настоящему изобретению обладает аффинностью связывания приблизительно 50 пМ или лучше. В одном из вариантов осуществления молекула по настоящему изобретению обладает аффинностью связывания приблизительно 40 пМ или лучше. В одном из вариантов осуществления молекула по настоящему изобретению обладает аффинностью связывания приблизительно 30 пМ или лучше. В одном из вариантов осуществления молекула по настоящему изобретению является полностью человеческой или гуманизированной и обладает аффинностью связывания приблизительно 100 пМ или лучше.

Производное природного домена, как используют в рамках настоящего изобретения, относится к случаю, когда одна, две, три, четыре или пять аминокислот в природной последовательности заменены или удалены, например, для оптимизации свойств домена, как например, путем удаления нежелательных свойств, но где характерный признак(и) домена сохранен.

В одном из вариантов осуществления молекулы антитела по настоящему изобретению содержат

один или несколько связывающих альбумин пептидов. In vivo пептид связывает альбумин, который увеличивает время полужизни молекулы.

Связывающий альбумин пептид может быть присоединен к одной или нескольким вариабельным областям, шарнирной области или С-концу молекулы или любому положению, которое не препятствует антигенсвязывающим свойствам молекул.

Примеры связывающих альбумин пептидов предоставлены в WO 2007/106120.

Также специалисту в данной области будет понятно, что антитело может претерпевать множество посттрансляционных модификаций. Тип и степень этих модификаций часто зависят от линии клеток-хозяев, используемой для экспрессии молекулы, а также от условий культивирования. Такие модификации могут включать варьирование гликозилирования, окисления метионина, образования дикетопиперазина, изомеризации аспартата и дезамидации аспарагина. Частой модификацией является утрата С-концевого основного остатка (такого как лизин или аргинин) под действием карбоксипептидаз (как описано в Harris, R.J. *Journal of Chromatography* 705:129-134, 1995).

Если желательно, молекулу для применения в рамках настоящего изобретения можно конъюгировать с одной или несколькими эффекторной молекулой(ами). Будет понятно, что эффекторная молекула может содержать одну эффекторную молекулу или две или более таких молекул, связанных таким образом, чтобы они образовывали одну часть, которая может быть связана с молекулой антитела по настоящему изобретению. Когда желательно получить антитело в соответствии с изобретением, связанное с эффекторной молекулой, его можно получать с помощью стандартных химических методик или методик рекомбинантных ДНК, в которых антитело связывают либо прямо, либо через связывающий агент с эффекторной молекулой. Способы конъюгации таких эффекторных молекул с антителом хорошо известны в данной области (см., Hellstrom et al., *Controlled Drug Delivery*, 2nd Ed., Robinson et al., eds., 1987, pp. 623-53; Thorpe et al., 1982, *Immunol. Rev.*, 62:119-58 и Dubowchik et al., 1999, *Pharmacology and Therapeutics*, 83, 67-123). Конкретные химические методики включают, например, методики, описанные в WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195, WO 89/01476 и WO 03031581. Альтернативно, когда эффекторная молекула представляет собой белок или полипептид, связывание можно осуществлять с использованием методик рекомбинантных ДНК, например, как описано в WO 86/01533 и EP 0392745.

Термин "эффекторная молекула", как используют в рамках изобретения, включает, например, средства против злокачественной опухоли, лекарственные средства, токсины, биологически активные белки, например ферменты, другие антитела или фрагменты антител, синтетические или природные полимеры, нуклеиновые кислоты и их фрагменты, например ДНК, РНК и их фрагменты, радионуклиды, в частности радиоактивный йод, радиоизотопы, хелатированные металлы, наночастицы и репортерные группы, такие как флуоресцентные соединения или соединения, которые можно обнаруживать с помощью ЯМР- или ESR-спектроскопии.

Примеры эффекторных молекул могут включать цитотоксины или цитотоксические средства, включая любое средство, которое является вредоносным (например, уничтожает) для клеток. Примеры включают комбретастины, доластатины, эпотилоны, стауроспорин, майтанзиноиды, спонгистатины, ризоксин, халихондрины, рорицины, гемиастерлины, таксол, цитохалазин В, грамицидин D, бромид этидия, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубин, даунорубин, дигидроксиантрацин дион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, татракаин, лидокаин, пропранолол и пуромицин и их аналоги или гомологи.

Эффекторные молекулы также включают, но ими не ограничиваются, антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацил, декарбазин), алкилирующие средства (например, мехлорэтамин, тиотепа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) и ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфан, дибромманнит, стрептозотоцин, митомицин С и цисдихлордиаминплатина (II) (DDP) цисплатин), антрациклины (например, даунорубин (ранее дауномицин) и доксорубин), антибиотики (например, дактиномицин (ранее актиномицин), блеомицин, митрамицин, антрамицин (АМС), калихеамицины или дуокармицины), и антимитотические средства (например, винкристин и винбластин).

Другие эффекторные молекулы могут включать хелатированные радионуклиды, такие как ^{111}In и ^{90}Y , Lu^{177} , висмут 213 , калифорний 252 , иридий 192 и вольфрам 188 /рений 188 ; или лекарственные средства, такие как, но не ограничиваясь ими, алкилфосфохолины, ингибиторы топоизомеразы I, таксоиды и сурамин.

Другие эффекторные молекулы включают белки, пептиды и ферменты. Представляющие интерес ферменты включают, но не ограничиваются ими, протеолитические ферменты, гидролазы, лиазы, изомеразы, трансферазы. Представляющие интерес белки, полипептиды и пептиды включают, но не ограничиваются ими, иммуноглобулины, токсины, такие как абрин, ризин А, экзотоксин *pseudomonas*, или дифтерийный токсин, белок, такой как инсулин, фактор некроза опухоли, α -интерферон, β -интерферон, фактор роста нервов, тромбоцитарный фактор роста или тканевой активатор плазминогена, тромботический агент или антитромботический агент, например ангиостатин или эндостатин, или модификатор биологического ответа, такой как лимфокин, интерлейкин-1 (IL-1), интерлейкин-2 (IL-2), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), фактор роста нервов (NGF) или другие факторы роста и иммуноглобулины.

Другие эффекторные молекулы могут включать поддающиеся обнаружению вещества, подходящие, например, для диагностики. Примеры поддающихся обнаружению веществ включают различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы, биолуминесцентные материалы, радионуклиды, позитронно-активные металлы (для применения в позитронно-эмиссионной томографии) и нерадиоактивные парамагнитные ионы металлов (см., главным образом, патент США № 4741900 для ионов металлов, которые можно конъюгировать с антителами для применения в качестве диагностических средств). Подходящие ферменты включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, бета-галактозидазу или ацетилхолинэстеразу; подходящие простетические группы включают стрептавидин, авидин и биотин; подходящие флуоресцентные материалы включают умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеин изотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламин флуоресцеин, дансил-хлорид и фикоэритрин; подходящие люминесцентные материалы включают люминол; пригодные биолуминесцентные материалы включают люциферазу, люциферин и экворин; и подходящие радионуклиды включают ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In и ^{99}Tc .

В другом примере эффекторная молекула может увеличивать время полужизни антитела *in vivo*, и/или снижать иммуногенность антитела, и/или усиливать доставку антитела через эпителиальный барьер в иммунную систему. Примеры подходящих эффекторных молекул этого типа включают полимеры, альбумин, связывающие альбумин белки или связывающие альбумин соединения, такие как соединения, описанные в WO 05/117984.

Когда эффекторная молекула представляет собой полимер, она, как правило, может представлять собой синтетический или природный полимер, например необязательно замещенный прямой или разветвленный полиалкиленовый, полиалкениленовый или полиоксипалкиленовый полимер, или разветвленный или неразветвленный полисахарид, например гомо- или гетерополисахарид.

Конкретные необязательные заместители, которые могут присутствовать на упомянутых выше синтетических полимерах, включают одну или несколько гидроксильных, метильных или метоксигрупп.

Конкретные примеры синтетических полимеров включают необязательно замещенный прямой или разветвленный поли(этиленгликоль), поли(пропиленгликоль), поливиниловый спирт или их производные, особенно необязательно замещенный поли(этиленгликоль), такой как метоксиполи(этиленгликоль) или его производные.

Конкретные природные полимеры включают лактозу, амилозу, декстран, гликоген или их производные.

"Производные", как используют в рамках изобретения, включают реактивные производные, например тиолселективные реактивные группы, такие как малеинимиды и т.п. Реакционную группу можно связывать с полимером прямо или через линкерный сегмент. Будет понятно, что остаток такой группы в некоторых случаях будет формировать часть продукта в качестве линкерной группы между антителом по изобретению и полимером.

Размер полимера можно варьировать, если желательно, однако, как правило, он имеет диапазон средней молекулярной массы от 500 до 50000 Да, например от 5000 до 40000 Да, как например, от 20000 до 40000 Да. В частности, размер полимера можно выбирать исходя из предполагаемого применения продукта, например, способности локализоваться в определенных тканях, таких как опухоли, или продолжения половинного времени циркуляции (для обзора см. Chapman, 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 531-545). Таким образом, например, когда предполагается, что продукт покинет циркуляцию и проникнет в ткань, например, для применения для лечения опухоли, может быть преимущественным использование низкомолекулярного полимера, например, с молекулярной массой приблизительно 5000 Да. Для применений, где продукт остается в кровотоке, может быть преимущественным использование более высокомолекулярного полимера, например, имеющего молекулярную массу в диапазоне от 20000 до 40000 Да.

Подходящие полимеры включают полиалкиленовый полимер, такой как поли(этиленгликоль) или, особенно, метоксиполи(этиленгликоль) или его производное, и особенно с молекулярной массой в диапазоне от приблизительно 15000 до приблизительно 40000 Да.

В одном примере антитело для применения в рамках настоящего изобретения связано с частями поли(этиленгликоля) (PEG). В одном конкретном примере молекулы PEG могут быть связаны через любую доступную боковую цепь аминокислоты или концевую функциональную группу аминокислоты, расположенную в антителе, например любую свободную амино-, имино-, тиольную, гидроксильную или карбоксильную группу. Такие аминокислоты могут встречаться естественным образом в антителе или они могут быть встроены способами инженерии в антитело с использованием способов рекомбинантных ДНК (см., например, US 5219996; US 5667425; WO 98/25971). В одном примере молекула по настоящему изобретению представляет собой модифицированное антитело, где модификация представляет собой вставку на С-конце тяжелой цепи одной или нескольких аминокислот, чтобы обеспечить присоединение эффекторной молекулы. Для присоединения двух или более молекул PEG можно использовать множество участков.

В одном из вариантов осуществления молекула PEG связана с цистеином 171 в легкой цепи, например, см. WO 2008/038024, включенную в настоящее описание в качестве ссылки.

Удобно, чтобы молекулы PEG были ковалентно связаны через тиольную группу по меньшей мере одного остатка цистеина, расположенного в антители. Каждая молекула полимера, связанная с модифицированным антители, может быть ковалентно связана с атомом серы остатка цистеина, расположенного в антители. Ковалентная связь, как правило, представляет собой дисульфидную связь или, в частности, связь сера-углерод. Когда тиольную группу используют в качестве точки присоединения соответствующим образом активированных эффекторных молекул, можно использовать, например, тиолселективные производные, такие как малеинимиды и производные цистеина. В качестве исходного материала для получения модифицированного полимером антителя, как описано выше, можно использовать активированный полимер. Активированный полимер может представлять собой любой полимер, содержащий тиольную реакционноспособную группу, такую как α -галогенкарбоновая кислота или сложный эфир, например иодацетамид, имид, например малеинимид, винилсульфон или дисульфид. Такие исходные материалы можно получать из коммерческих источников (например, от Nektar, ранее Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, США) или их можно получать из коммерчески доступных исходных материалов с использованием общепринятых химических методик. Конкретные молекулы PEG включают 20К метокси-PEG-амин (получаемый от Nektar, ранее Shearwater; Rapp Polymere; и SunBio) и M-PEG-SPA (получаемый от Nektar, ранее Shearwater).

Настоящее изобретение также относится к выделенной ДНК, кодирующей молекулу антителя, описанную в настоящем описании.

В следующем аспекте предусматривается вектор, содержащий указанную ДНК.

Общие способы, посредством которых можно конструировать векторы, способы трансфекции и способы культивирования хорошо известны специалистам в данной области. В этом отношении приводится ссылка на "Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F. M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, New York and the Maniatis Manual produced by Cold Spring Harbor Publishing.

В следующем аспекте предусматривается клетка-хозяин, содержащая указанный вектор и/или ДНК.

Для экспрессии последовательностей ДНК, кодирующих молекулу по настоящему изобретению, можно использовать любую подходящую клетку-хозяина/векторную систему. Можно использовать бактериальные, например *E. coli*, и другие микробные системы или также можно использовать системы для экспрессии в эукариотической клетке-хозяине, например клетке млекопитающих. Подходящие клетки-хозяева млекопитающих включают CHO, клетки миеломы или гибридомные клетки.

Настоящее изобретение также относится к способу получения молекулы антителя, как описано в настоящем описании, включающему культивирование клетки-хозяина, содержащей вектор (и/или ДНК) по настоящему изобретению, в условиях, пригодных для направления экспрессии белка с ДНК, кодирующей молекулу антителя по настоящему изобретению, и выделение молекулы антителя.

Для получения продуктов, содержащих как тяжелые, так и легкие цепи, клеточную линию можно трансфицировать двумя векторами, причем первый вектор кодирует полипептид легкой цепи и второй вектор кодирует полипептид тяжелой цепи. Альтернативно можно использовать один вектор, причем вектор включает последовательности, кодирующие полипептиды легкой цепи и тяжелой цепи.

Молекулы антители по настоящему изобретению экспрессируются на подходящих уровнях из клеток-хозяев, что делает их подходящими для коммерческой обработки.

Антители могут быть специфичным в отношении любого антителя-мишени. Антиген может представлять собой связанный с клеткой белок, например белок клеточной поверхности на клетках, таких как бактериальные клетки, клетки дрожжей, Т-клетки, эндотелиальные клетки или опухолевые клетки, или он может представлять собой растворимый белок. Представляющие интерес антигены также могут представлять собой любой имеющий медицинское значение белок, такой как белки, активируемые во время заболевания или инфекции, например рецепторы и/или их соответствующие лиганды. Конкретные примеры белков клеточной поверхности включают молекулы адгезии, например интегрины, такие как β 1-интегрины, например VLA-4, E-селектин, P-селектин или L-селектин, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11a, CD11b, CD18, CD19, CD20, CD23, CD25, CD33, CD38, CD40, CD40L, CD45, CDW52, CD69, CD134 (OX40), ICOS, BCMP7, CD137, CD27L, CDCP1, CSF1 или CSF1-рецептор, DPCR1, DPCR1, dudulin2, FLJ20584, FLJ40787, HEK2, KIAA0634, KIAA0659, KIAA1246, KIAA1455, LTBP2, LTK, MAL2, MRP2, нектинподобный 2, NKCC1, PTK7, RAIG1, TCAM1, SC6, BCMP101, BCMP84, BCMP11, DTD, карциноэмбриональный антиген (CEA), глобулин молочного жира человека (HMFG1 и 2), антигены МНС класса I и МНС класса II, KDR и VEGF, PD-1, DC-SIGN, TL1A, DR3, рецептор A IL-7, и когда это целесообразно, их рецепторы.

Растворимые антигены включают интерлейкины, такие как IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-13, IL-14, IL-16 или IL-17, такие как IL17A и/или IL17F, вирусные антигены, например антигены респираторного синцитиального вируса или цитомегаловируса, иммуноглобулины, такие как IgE, интерфероны, такие как интерферон α , интерферон β или интерферон γ , фактор некроза опухоли TNF (ранее известный как фактор некроза опухоли- α и обозначаемый в настоящем описании как TNF или TNF α), фактор некроза опухоли- β , колониестимулирующие факторы, такие как G-CSF или GM-CSF, и тромбоцитарные факторы роста, такие как PDGF- α и PDGF- β , WISP-1 и, когда это целесообразно, их рецепто-

ры. Другие антигены включают бактериальные антигены клеточной поверхности, бактериальные токсины, вирусы, такие как вирус гриппа, EBV, HerA, B и C, агенты биологического оружия, радионуклиды и тяжелые металлы и яды и токсины змей и пауков.

В одном из вариантов осуществления антитело можно использовать для функционального изменения активности представляющего интерес антигена. Например, антитело может нейтрализовывать, осуществлять антагонизм или осуществлять агонизм активности указанного антигена, прямо или непрямо.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к способу получения асимметричного смешанного антитела по настоящему изобретению, включающему стадии взятия симметричного антитела (т.е. антитело, где обе тяжелых цепи являются одинаковыми/идентичными), содержащего первую последовательность тяжелой цепи или ее фрагмент, как определено в настоящем описании, и смешение указанного антитела *in vitro* со вторым симметричным антителом, содержащим вторую последовательность тяжелой цепи или ее фрагмент, которая отличается от указанной первой последовательности тяжелой цепи в условиях, способствующих обмену тяжелыми цепями между двумя антителами, и, необязательно, выделение асимметричного смешанного антитела.

Условия *in vitro*, способствующие динамическому обмену, включают восстанавливающие условия. Подходящие восстановители включают GSH, 2-меркаптоэтанол, 2-меркаптоэтиламин, TBP, TCEP, цистеин-HCl и DTT.

Подходящие концентрации восстановителей находятся в диапазоне 0,01-10 mM, таком как от 0,5 до 5 mM. Кроме того, восстановление можно осуществлять с использованием окислительно-восстановительных буферов, иными словами, различных относительных соотношений окисленных и восстановленных вариантов реагентов, таких как, например, GSH:GSSG и Cys:ди-Cys.

Подходящие условия включают соотношения антител, которые находятся в диапазоне от 0,5:5 до 5:05, таком как 1:1 или 1:2.

Подходящие температуры включают от 15 до 40°C, такие как 37°C.

Восстанавливающие условия можно выбирать так, чтобы они находились между восстановительной стабильностью гомодимеров и гетеродимеров.

В альтернативном варианте осуществления антитела по изобретению получают с использованием смешанной клеточной культуры, например, происходит ~50% обмен. Это может приводить приблизительно к 1-2 г/л желаемого биспецифического антитела.

В одном из вариантов осуществления предусматривается асимметричное антитело, полученное или получаемое способом, описанным в настоящем описании, и состав, содержащий его, в частности, для применения для лечения.

Молекулы антитела по настоящему изобретению подходят для лечения и/или профилактики патологического состояния.

Таким образом, предусматривается антитело в соответствии с настоящим изобретением для применения для лечения путем введения его терапевтически эффективного количества, например, в фармацевтическом составе. В одном из вариантов осуществления антитело по изобретению вводят местно в легкие, например, путем ингаляции.

Антитела, предусматриваемые в рамках настоящего изобретения, являются подходящими для лечения заболеваний или нарушений, включающих воспалительные заболевания и нарушения, иммунные заболевание и нарушения, фиброзные нарушения и злокачественные опухоли.

Термин "воспалительное заболевание" или "нарушение" и "иммунное заболевание или нарушение" включает ревматоидный артрит, псориатический артрит, болезнь Стилла, болезнь Макла-Уэлса, псориаз, болезнь Крона, язвенный колит, SLE (системная красная волчанка), астму, аллергический ринит, атопический дерматит, рассеянный склероз, васкулит, сахарный диабет типа I, трансплантацию и реакцию "трансплантат против хозяина".

Термин "фибротическое нарушение" включает идиопатический фиброз легких (IPF), системный склероз (или склеродермию), фиброз почек, диабетическую нефропатию, IgA-нефропатию, гипертензию, заболевание почек конечной стадии, перитонеальный фиброз (непрерывный амбулаторный перитонеальный диализ), цирроз печени, связанную со старением дегенерацию желтого пятна (ARMD), ретинопатию, реактивный фиброз сердца, образование рубца, келоиды, ожоги, изъязвления кожи, ангиопластику, хирургическую операцию коронарного шунтирования, артропластику и хирургическую операцию по удалению катаракты.

Термин "злокачественная опухоль" включает злокачественное новообразование, которое возникает из эпителия, находится в коже или, более часто, в выстилках органов организма, например молочной железы, яичника, предстательной железы, легкого, почки, поджелудочной железы, желудка, мочевого пузыря или кишечника. Злокачественные опухоли имеют тенденцию инфильтрировать в соседнюю ткань и распространяться (метастазировать) в отдаленные органы, например в кость, печень, легкое или головной мозг.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической или диагностической композиции, содержащей антитело по настоящему изобретению в комбинации с одним или несколькими из фармацевтически приемлемых эксципиентов, разбавителей или носителей. Таким образом, предусматривается

применение антитела по изобретению для получения лекарственного средства. Композиция обычно представляют в качестве части стерильной фармацевтической композиции, которая обычно включает фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению, кроме того, может содержать фармацевтически приемлемый адъювант.

Настоящее изобретение также относится к способу получения фармацевтической или диагностической композиции, включающему добавление или смешение антитела по настоящему изобретению с одним или несколькими из фармацевтически приемлемого эксципиента, разбавителя или носителя.

Антитело по изобретению может представлять собой единственный активный ингредиент в фармацевтической или диагностической композиции или оно может быть дополнено другими активными ингредиентами, включая другие ингредиенты в виде антител, например антитела против TNF, против IL-1 β , против Т-клеток, против IFN γ или против LPS, или ингредиенты не в виде антител, такие как ксантины. Другие подходящие активные ингредиенты включают антитела, способные индуцировать толерантность, например антитела против CD3 или антитела против CD4.

В следующем варианте осуществления антитело или композицию по изобретению используют в комбинации с другим фармацевтически активным средством, например кортикостероидом (таким как флукаризона пропионат) и/или бета-2-агонистом (таким как сальбутамол, сальметерол или формотерол), или ингибиторами роста и пролиферации клеток (такими как рапамицин, циклофосфамид, метотрексат), или альтернативным ингибитором CD28 и/или CD40. В одном из вариантов осуществления ингибитор является низкомолекулярным. В другом варианте осуществления ингибитор представляет собой антитело, специфичное к мишени.

Удобно, чтобы фармацевтические композиции содержали терапевтически эффективное количество антитела по изобретению. Термин "терапевтически эффективное количество", как используют в рамках изобретения, относится к количеству лекарственного средства, требуемому для лечения, смягчения или предупреждения заданного заболевания или состояния, или для проявления поддающегося обнаружению терапевтического или профилактического эффекта. Терапевтически эффективное количество можно оценивать первоначально либо в анализах культур клеток, либо в моделях на животных, обычно у грызунов, кроликов, собак, свиней и приматов. Также для определения соответствующего диапазона концентраций и пути введения можно использовать модель на животных. Затем такую информацию можно использовать для определения подходящих доз и путей введения у человека.

Точное терапевтически эффективное количество для человека будет зависеть от тяжести болезненного состояния, общего состояния здоровья индивидуума, возраста, массы тела и пола индивидуума, рациона, времени и частоты введений, комбинации(ий) лекарственных средств, реакций чувствительности и устойчивости/ответа на терапию. Это количество можно определять с помощью стандартного экспериментирования и его определение осуществляется по мнению лечащего врача. Как правило, терапевтически эффективное количество составляет от 0,01 до 50 мг/кг, например от 0,1 до 20 мг/кг. Фармацевтические композиции удобно представлять в единичных дозированных формах, содержащих заданное количество активного вещества по изобретению на дозу.

Композиции можно вводить пациенту по отдельности или их можно вводить в комбинации (например, одновременно, последовательно или по отдельности) с веществами, лекарственными средствами или гормонами.

Доза, в которой вводят антитело по настоящему изобретению, зависит от природы состояния, подвергаемого лечению, например степени имеющегося заболевания/состояния, и от того, используют ли молекулу профилактически или для лечения существующего состояния.

Частота дозирования зависит от времени полужизни антитела и длительности его эффекта. Если антитело обладает коротким временем полужизни (например, 2-10 ч), может быть необходимым введение одной или нескольких доз в сутки. Альтернативно, если антитело обладает длительным временем полужизни (например, 2-15 суток), может быть необходимым введение дозировки один раз в сутки, один раз в неделю или даже один раз в 1 или 2 месяца.

Фармацевтически приемлемый носитель сам по себе не должен индуцировать продукцию антител, вредоносных для индивидуума, которому вводят композицию, и он не должен быть токсичным. Подходящие носители могут представлять собой крупные медленно метаболизирующиеся макромолекулы, такие как белки, полипептиды, липосомы, полисахариды, полимолочные кислоты, полиглицоловые кислоты, полимерные аминокислоты, сополимеры аминокислот и неактивные вирусные частицы.

Можно использовать фармацевтически приемлемые соли, например соли минеральных кислот, такие как гидрохлориды, гидробромиды, фосфаты и сульфаты, или соли органических кислот, такие как ацетаты, пропионаты, малонаты и бензоаты.

Фармацевтически приемлемые носители в терапевтических композициях, кроме того, могут содержать жидкости, такие как вода, солевой раствор, глицерин и этанол. Кроме того, в таких композициях могут присутствовать вспомогательные вещества, такие как смачивающие вещества, или эмульгаторы, или pH-буферные вещества. Такие носители позволяют составление фармацевтических композиций в качестве таблеток, пилюль, драже, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, взвесей и суспензий для прогла-

тивания пациентом.

Подходящие формы для введения включают формы, подходящие для парентерального введения, например путем инъекции или инфузии, например путем болюсной инъекции и непрерывной инфузии. Когда продукт предназначен для инъекции или инфузии, он может иметь форму суспензии, раствора или эмульсии в масляном или водном носителе, и он может содержать средства для составления, такие как суспендирующие средства, консерванты, стабилизирующие и/или диспергирующие средства. Альтернативно молекула по изобретению может быть в сухой форме для восстановления перед применением соответствующей стерильной жидкостью.

После составления композиции по изобретению можно вводить прямо индивидууму. Индивидуумами, подвергаемыми лечению, могут быть животные. Однако в одном или нескольких вариантах осуществления композиции адаптированы для введения человеку.

В составах по настоящему изобретению является подходящим, чтобы значение pH конечного состава не было сходным со значением изоэлектрической точки антитела, например, если pH состава меньше 7, тогда может быть пригодной рI 8-9 или выше. Без связи с теорией полагают, что это может в конечном итоге обеспечить конечный состав с увеличенной стабильностью, например, антитело остается в растворе.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить любым путем, включая, но ими не ограничиваясь, пероральный, внутривенный, внутримышечный, внутриартериальный, интрамедуллярный, интратекальный, внутрижелудочковый, трансдермальный, чрескожный (например, см. WO 98/20734), подкожный, внутрибрюшинный, интраназальный, энтеральный, местный, сублингвальный, интравагинальный или ректальный пути. Также для введения фармацевтических композиций по изобретению можно использовать безыгольные шприцы. Как правило, терапевтические композиции можно получать в качестве инъектируемых составов, либо в качестве жидких растворов, либо в качестве суспензий. Также можно получать твердые формы, подходящие для растворения или суспендирования в жидких носителях перед инъекцией.

Прямую доставку композиций, как правило, проводят путем инъекции, подкожно, внутрибрюшинно, внутривенно или внутримышечно, или доставку осуществляют в интерстициальное пространство ткани. Также композиции можно вводить в очаг повреждения. Введение дозы можно осуществлять по схеме с однократной дозой или по схеме с многократными дозами.

Будет понятно, что активный ингредиент в композиции представляет собой антитело. Само по себе оно является чувствительным к деградации в желудочно-кишечном тракте. Таким образом, если композицию вводят через желудочно-кишечный тракт, то композиция должна содержать средства, которые защищают антитела от деградации, но которые высвобождают антитело после всасывания из желудочно-кишечного тракта.

Подробное обсуждение фармацевтически приемлемых носителей доступно в Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).

В одном из вариантов осуществления предусматривается состав в качестве состава для местного введения, в том числе путем ингаляции.

Подходящие ингалируемые препараты включают ингалируемые порошки, аэрозоли в отмеренной дозе, содержащие газ-пропеллент, или ингалируемые растворы, свободные от газов-пропеллентов. Ингалируемые порошки по изобретению, содержащие активное вещество, могут состоять только из упомянутых выше активных веществ или смесей упомянутых выше активных веществ с физиологически приемлемым эксципиентом.

Эти ингалируемые порошки могут включать моносахариды (например, глюкоза или арабиноза), дисахариды (например, лактоза, сахароза, мальтоза), олиго- и полисахариды (например, декстраны), полиспирты (например, сорбит, маннит, ксилит), соли (например, хлорид натрия, карбонат кальция) или их смеси друг с другом. Подходящим является использование моно- или дисахаридов, использование лактозы или глюкозы, в частности, но не исключительно, в форме их гидратов.

Для частиц для депонирования в легких требуется размер частиц менее 10 мкм, такой как 1-9 мкм, например от 0,1 до 5 мкм, в частности от 1 до 5 мкм. Размер частиц активного ингредиента (такого как антитело) имеет первостепенную важность.

Газы-пропелленты, которые можно использовать для получения ингалируемых аэрозолей, известны в данной области. Подходящие газы-пропелленты выбраны из углеводородов, таких как н-пропан, н-бутан или изобутан и галогенуглеводороды, такие как хлорированные и/или фторированные производные метана, этана, пропана, бутана, циклопропана или циклобутана. Упомянутые выше газы-пропелленты можно использовать сами по себе или в качестве их смесей.

Особенно подходящими газами-пропеллентами являются галогенированные производные алканов, выбранные из TG11, TG12, TG134a и TG227. Из упомянутых выше галогенированных углеводородов TG134a (1,1,1,2-тетрафторэтан) и TG227 (1,1,1,2,3,3,3-гептафторпропан) и их смеси являются особенно подходящими.

Содержащие газы-пропелленты ингалируемые аэрозоли также могут содержать другие ингредиенты, такие как сорастворители, стабилизаторы, сурфактанты (поверхностно-активные вещества), антиок-

сиданты, смазывающие вещества и средства для коррекции pH. Все эти ингредиенты известны в данной области.

Содержащие газ-пропеллент ингалируемые аэрозоли по изобретению могут содержать вплоть до 5 мас.% активного вещества. Аэрозоли по изобретению содержат, например, от 0,002 до 5 мас.%, от 0,01 до 3 мас.%, от 0,015 до 2 мас.%, от 0,1 до 2 мас.%, от 0,5 до 2 мас.% или от 0,5 до 1 мас.% активного ингредиента.

Альтернативно местное введение в легкие также можно осуществлять путем введения жидкого раствора или суспензионного состава, например, с использованием устройства, такого как небулайзер, например небулайзер, подсоединенный к компрессору (например, небулайзер Pari LC-Jet Plus(R), подсоединенный к компрессору Pari Master(R), изготовленному Pari Respiratory Equipment, Inc., Richmond, Va.).

Антитело по изобретению можно доставлять диспергированным в растворителе, например, в форме раствора или суспензии. Его можно суспендировать в соответствующем физиологическом растворе, например солевом растворе или другом фармакологически приемлемом растворителе или забуференном растворе. Забуференные растворы, известные в данной области, могут содержать от 0,05 до 0,15 мг эдета дианатрия, от 8,0 до 9,0 мг NaCl, от 0,15 до 0,25 мг полисорбата, от 0,25 до 0,30 мг безводной лимонной кислоты и от 0,45 до 0,55 мг цитрата натрия на 1 мл воды, так чтобы достигалось значение pH приблизительно от 4,0 до 5,0. В суспензии можно использовать, например, лиофилизированные молекулы.

Терапевтические суспензии или составы растворов также могут содержать один или несколько эксципиентов. Эксципиенты хорошо известны в данной области и включают буферы (например, цитратный буфер, фосфатный буфер, ацетатный буфер и бикарбонатный буфер), аминокислоты, мочевины, спирты, аскорбиновую кислоту, фосфолипиды, белки (например, сывороточный альбумин), EDTA, хлорид натрия, липосомы, маннит, сорбит и глицерин. Растворы или суспензии могут быть инкапсулированы в липосомы или биodeградируемые микросферы.

Состав, главным образом, может быть предоставлен, по существу, в стерильной форме с использованием стерильных процессов изготовления.

Это может включать получение и стерилизацию путем фильтрации забуференного растворителя/раствора, используемого для составления, асептическое суспендирование молекулы в стерильном забуференном растворе растворителя и распределение состава в стерильную тару способами, известными специалистам в данной области.

Распыляемый состав по настоящему изобретению может быть предоставлен, например, в качестве единичных доз (например, запаянные пластиковые контейнеры или флаконы), упакованных в обертки из фольги. Каждый флакон содержит единичную дозу в объеме, например, 2 мл, буферного растворителя/раствора.

Полагают, что антитело по настоящему изобретению является особенно подходящим для доставки путем распыления.

"Содержащий" в контексте настоящего описания означает "включающий".

Когда это технически приемлемо, варианты осуществления изобретения можно комбинировать.

"Асимметричный" и "асимметричный смешанный" используют в настоящем описании взаимозаменяемо.

Далее изобретение описано с помощью следующих примеров, которые являются только иллюстративными и ни в коем случае не должны истолковываться как ограничивающие объем настоящего изобретения.

Примеры

1. Мутагенез тяжелой цепи IgG4 и получение векторов с единичным мутантным геном тяжелой цепи IgG4.

Аминокислотные мутации вносили с использованием набора Quickchange® Lightning Multi Site Directed Mutagenesis (SDM) kit или набора Quickchange® II DSM kit (приобретенные в Stratagene®) (каталожные номера 210516 и 200521 соответственно) в соответствии с инструкциями изготовителя.

Мутации подтверждали секвенированием ДНК. Получали тяжелые цепи IgG4 для антител 1-47, представленных в следующей таблице

Номер антитела	Мутации тяжелой цепи (Нумерация Kabat)	Домен C _H 1 и шарнирная область, SEQ ID NO:	C _H 1, шарнирная область, C _H 2 и C _H 3, SEQ ID NO:
1	C127S	296	306
2	C127S, C239S	33	59
3	C127S, C242S	34	60
4	C127S, C242S, C239S	297	307
5	G230C	298	308
5P	G230C, S241P	299	309
6	C127S, G230C, C239S	12	38
7	C127S, G230C, C242S	13	39
8	C127S, G230C, C239S, C242S	14	40
9	G230C, C239S	300	310
10	G230C, C242S	301	311
11	G230C, C239S, C242S	302	312
12	C239S	303	313
13	C242S	304	314
15	C127S, G230C	15	41
16	C127S, G230C, S241P	16	42
17	IgG4 человека дикого типа	2	-
18	S241P	-	-
19	IgG1 человека дикого типа	1	-
28	C127S Y229C	17	43
28P	C127S Y229C, S241P	36	62
29	C127S Y229C C239S	18	44
30	C127S Y229C C242S	19	45
31	C127S Y229C C239S C242S	20	46
32	C127S K228C	21	47
33	C127S K228C C239S	22	48
34	C127S K228C C242S	23	49
35	C127S K228C C239S C242S	24	50
36	C127S S227C	25	51
37	C127S S227C C239S	26	52
38	C127S S227C C242S	27	53
39	C127S S227C C239S C242S	28	54
44	C127S G230C P238PAAA	29	55
44P	C127S G230C P238PAAA, S241P	37	63
45	C127S G230C P238PAAA C239S	30	56
46	C127S G230C P238PAAA C242S	31	57
47	C127S G230C P238PAAA C239S C242S	32	58
48	C127S, S227P, Y229S, G230C, P237D, P238KTHT, S241P	35	61
49	C127S G230C P238PA		
50	C127S G230C P238PAA S241P		
51	C127S, G230C, P238PAAAA		
52	C127S, G230C, P238PAAAAA		
55	C127S, G230C, P238PTHT		
56	C127S, G230C, P237D, P238KTHT		
57	C127S, G230C, P238PGGG		
60	C127S, S227P, G230C		
62	C127S, Y229S, G230C		
64	C127S, S227P, Y229S, G230C		
65	C127S, S227P, Y229S, G230C, P237D, P238KTHT		
66	C127S, G230C, P237D, P238KTH		
67	C127S, G230C, P237D, P238KT		
68	C127S, G230C, P237D, P238K		
69	C127S, G230C P237D, P238KAAA		
71	C127S, S227P, G230C, P237D, P238KTHT		
73	C127S, Y229S, G230C, P237D, P238KTHT		

Другие полученные антитела описаны в таблице выше.

Тяжелую цепь антитела 48 (последовательность ID NO: 266) получали способом ПЦР и клонированием ферментов рестрикции. Продукт ПЦР получали с помощью прямого олигонуклеотида, кодирующего последовательность верхней и центральной шарнирной области IgG1 и участок рестрикции BglII, и обратного олигонуклеотида, кодирующего фермент рестрикции DraIII. Затем фрагмент ПЦР расщепляли с помощью упомянутых выше ферментов и лигировали в вектор с единичным геном hG4, содержащий соответствующую вариабельную область.

2. Экспрессия мутантных IgG4-антител.

Все мутантные ДНК трансфицировали в клетки CHO-K1. Клетки (2×10^8 клеток/мл) ресуспендировали в 1 мл солевого раствора Earle's Balance (Sigma) и смешивали с 400 мкг ДНК (200 мкг ДНК тяжелой цепи и 200 мкг ДНК легкой цепи каппа). Аликвоты объемом 800 мкл переносили в 0,4-см кюветы (Biorad). Для культуры объемом 500 мл шесть кювет подвергали электропорации при следующих параметрах: 1 мс, 9,6 А; 10 мс, 0 А; 40 мс, 3,2 А. Трансфицированные клетки инкубировали в течение 24 ч при встряхивании при 140 об/мин в увлажненной среде с 5% CO₂ при 37°C и, начиная с 2 суток после трансфекции, продолжали инкубировать при 32°C в течение 10-13 суток. На 4 сутки после трансфекции к культуре добавляли 1,6 мл 1 М бутирата натрия. После достижения клетками 40% жизнеспособности и вплоть до 13 суток супернатант собирали. Культуры центрифугировали в течение 45 мин при 4000 об/мин. Супернатант пропускали через 0,22-мкм фильтр Stericup (Millipore) для очистки.

3. Очистка мутантных IgG4-антител.

Супернатанты (200-500 мл) очищали с использованием 5-мл колонки HiTrap MabSelect SuRe с белком А (GE Healthcare, Amersham, Великобритания). Образцы получали путем добавления 1/50 от объема супернатанта 2 М Tris-HCl pH 8,5. Образцы загружали в колонку при 1 мл/мин. Колонку промывали посредством PBS, pH 7,4. Для элюирования образцов 0,1 М цитрат натрия, pH 3,4, пропускали через колонку при 1 мл/мин и фракции объемом 0,5 мл собирали. Пиковые фракции нейтрализовывали добавлением 0,125 мл 2 М Tris-HCl, pH 8,5, в каждую фракцию. УФ-детекцию проводили при 280 нм.

4. Охарактеризация очищенных мутантных IgG4-антител.

Анализ SDS PAGE.

Неочищенный супернатант центрифугировали при 1200 об/мин в течение 5 мин и количественно определяли на ОСТЕТ. Образцы антител (25-30 нг) получали добавлением соответствующих количеств антитела, 4× буфера для загрузки (Invitrogen) и 2 мкл 100 мМ NEM. Доводили до общего объема 20 мкл с использованием dH₂O. Затем образцы кипятили в течение 3 мин при 100°C и наносили на 1,5-мм гель с 4-20% Tris-глицином с 15 лунками. Разделение на гелях проводили при 150 В в течение 1,5 ч в 1× буфере Tank. Антитела переносили на нитроцеллюлозную мембрану с использованием системы для сухого переноса iBlot, настроенной на перенос в течение 8 мин. Мембрану инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре (к.т.) в PBS-TM на вращающейся платформе, а затем проводили инкубацию с конъюгированным с HRP антителом кролика против Fc IgG человека (Jackson ImmunoResearch) или конъюгированным с HRP антителом козы против легкой цепи каппа человека (Bethyl) в течение 1 ч при встряхивании при к.т. После этого следовало 3 промывания по 5 мин в каждом случае с помощью PBS-T. Блоты проявляли с использованием набора усиленного металлом субстрата DAB в соответствии с инструкциями изготовителя (Pierce).

Результаты анализа с использованием иммуноблоттинга представлены на фиг. 7, 8, 9 и 10. На фиг. 7-10 Н означает тяжелую цепь и L означает легкую цепь, H2L2 представляет собой молекулу целого антитела, содержащую две тяжелые цепи и две легких цепи, и HL представляет собой половинную молекулу, содержащую одну тяжелую цепь и одну легкую цепь.

На фиг. 7 представлен анализ с использованием иммуноблоттинга для антител 15, 16, 6, 7, 8, 17, 18, 19, 5, 5P, 9, 10, 11, 1, 2, 3, 4, 12, 13 и 14. На фиг. 7 можно видеть, что антитела демонстрируют высокий уровень H2L2, за исключением антител 4, 8 и 14, которые демонстрируют отсутствие или очень мало H2L2 вследствие присутствия обеих мутаций в шарнирной области C239S и C242S. Однако антитела 4, 8 и 14 могут образовывать H2L2 посредством образования нековалентных связей между тяжелыми цепями. Мутант 3 также демонстрирует мало H2L2, в этом мутанте сохранен C239, однако он неспособен образовывать дисульфидные связи между тяжелыми цепями в шарнирной области, предварительно вследствие эффективного образования дисульфидной связи между С-концевым цистеином легкой цепи (LC) и C239 шарнирной области. Также можно видеть, что антитела, которые содержат мутацию C239S, но не C242S (антитела 2, 6, 9 и 12), демонстрируют сниженное образование HL по сравнению с антителами, которые не содержат ни C239S, ни C242S, или антителами, которые содержат C242S, но не C239S. Антитела 5P и 16, которые содержат мутацию S241P, также демонстрируют сниженное образование HL. Сравнение мутантов 2 и 3 демонстрирует степень "вытягивания" С-концевого цистеина легкой цепи для образования дисульфидной связи с тяжелой цепью, оказалось, что цистеин легкой цепи более эффективно связывается с C239, чем с C242, в тяжелой цепи.

На фиг. 8 представлен анализ с использованием иммуноблоттинга для антител 15, 6, 7, 8, 28, 29, 30, 31, 17, 19, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 и 39. На фиг. 8 можно видеть, что антитела демонстрируют высо-

кий уровень H2L2, за исключением антител 8, 31, 35 и 39, которые демонстрируют отсутствие или очень мало H2L2 вследствие присутствия мутаций C239S и C242S в шарнирной области и, таким образом, отсутствия образования дисульфидных связей между двумя тяжелыми цепями. Однако антитела 8, 31, 35 и 39 могут образовывать H2L2 путем образования нековалентных связей между тяжелыми цепями. Также можно видеть, что антитела, которые содержат мутацию C239S, но не C242S (антитела 6, 29, 33 и 37), демонстрируют сниженное образование HL по сравнению с антителами, которые не содержат ни C239S, ни C242S, или с антителами, которые содержат C242S, но не C239S. Мутант 15 способен образовывать дисульфидную связь между легкой цепью и G230C в C_H1 и дисульфидные связи между тяжелыми цепями, что, таким образом, приводит к полностью собранному и связанному дисульфидной связью белку. Более того, сравнение мутантов 15(C127S G230C), 28(C127S Y229C), 32(C127S K228C) и 36(C127S S227C) демонстрирует, что положение внесенного цистеина в верхней шарнирной области увеличивает образование дисульфидных связей между LC-HC. G230 и Y229 являются особенно предпочтительными положениями для внесения цистеина. Мутант 28 (C127S Y229C) демонстрирует низкий уровень HL и H2 и, таким образом, обладает низкой гетерогенностью дисульфидных связей.

На фиг. 9 представлен анализ с использованием иммуноблоттинга для антител 15, 6, 7, 8, 44, 45, 46, 47, 17 и 19. На фиг. 9 можно видеть, что антитела обладают высоким уровнем H2L2, за исключением 8 и 47, которые демонстрируют отсутствие или очень мало H2L2 вследствие присутствия мутаций C239S и C242S в шарнирной области, и, таким образом, между двумя тяжелыми цепями не образуется дисульфидных связей. Однако антитела 8 и 47 могут образовывать H2L2 путем образования нековалентных связей между тяжелыми цепями. Можно видеть, что антитела, которые содержат мутацию C239S, но не C242S (антитела 6 и 45), демонстрируют сниженное образование HL по сравнению с антителами, которые не содержат ни C239S, ни C242S, или антителами, которые содержат C242S, но не C239S. В частности, мутант 44 демонстрирует, что вставка трех аминокислот в верхней шарнирной области также может снижать образование HL и H2 и, таким образом, обладает более низкими уровнями гетерогенности дисульфидной связи, чем сравнимый мутант 15.

На фиг. 10 представлен анализ с использованием иммуноблоттинга для антител 48, 17, 18 и 19. На фиг. 10 можно видеть, что антитело 48 демонстрирует высокий уровень H2L2 и очень мало HL. Мутант 48 содержит последовательность верхней шарнирной области IgG1 EPKSCDKTHT SEQ ID NO: 319 вместо последовательности верхней шарнирной области IgG4 вместе с мутацией центральной шарнирной области S241P. Таким образом, мутант 48 имеет последовательность верхней и центральной шарнирной области EPKSCDKTHTCPPCP SEQ ID NO: 320. Мутант 48 демонстрирует более низкие уровни гетерогенности дисульфидных связей по сравнению с антителом IgG4 дикого типа 17 и приблизительно эквивалентные низкие уровни гетерогенности дисульфидной связи по сравнению с мутантом S241P IgG4 18 и антителом IgG1 дикого типа 19.

Анализ ThermoFluor.

Термостабильность очищенных mAb анализировали в анализе ThermoFluor с использованием SY-PRO® Orange для мониторинга процесса термического разворачивания белков. Добавляли вместе 5 мкл mAb при 1 мг/мл, 5 мкл 30× красителя и 40 мкл PBS. 10 мкл смеси распределяли в четырех экземплярах в 384-луночный оптический планшет для ПЦР и анализировали на системе 7900HT Fast Real-Time PCR System (Agilent Technologies UK Ltd, Wokingham UK). Эта система ПЦР содержит устройство для нагревания для точного контроля температуры, установленной на 20-99°C; полупроводниковая светочувствительная матрица одновременно проводит мониторинг изменений флуоресценции в лунках.

На фиг. 11, 12, 13, 14 и 15 представлены результаты анализа термостабильности мутантов антитела IgG4 по сравнению с антителами IgG1 и IgG4 дикого типа.

Сравнение мутанта 15 с IgG4 дикого типа (мутант 17) демонстрирует увеличение T_m Fab вследствие измененного расположения дисульфидных связей. Сравнение мутанта 15 и 28 демонстрирует дополнительное увеличение T_m Fab для мутанта 28, содержащего мутацию Y229C, по сравнению с мутантом 15, содержащим мутацию G230C. Сравнение мутанта 15 и 44 демонстрирует, что T_m Fab мутанта G230C можно далее увеличивать путем встраивания трех аминокислот в верхнюю шарнирную область. Сравнение мутантов 17 и 18 демонстрирует, что мутация средней шарнирной области S241P не увеличивает T_m Fab, даже несмотря на то, что она значительно уменьшает образование HL. Мутант 48 также демонстрирует значительно увеличенную T_m Fab по сравнению как с IgG4 дикого типа (мутант 17), так и с мутантом 15.

На фиг. 15 представлено общее ранжирование термостабильностей выбранных мутантов IgG4 в соответствии с настоящим изобретением. Все из мутантов 48, 44, 44P, 46, 45, 6, 29, 30, 28, 28P, 31, 8, 47 и 15 демонстрируют значительно более высокие величины T_m Fab по сравнению с IgG4 дикого типа (мутант 17) и S241P IgG4 дикого типа (мутант 18).

5. Обмен Fab-плечами.

а) Обмен тяжелыми цепями *in vitro*.

Первое IgG4-антитело и второе IgG4-антитело, каждое из которых обладает различной специфичностью к антигену, смешивали в молярном соотношении 1:1 в общей концентрации 100 мкг/мл в фос-

фатно-солевом буфере (PBS) (в mM: 150 NaCl, 10 NaH₂PO₄; pH 7,4). Для обеспечения восстановления дисульфидной связи образцы добавляли восстановленным глутатионом (GSH; Sigma) до конечной концентрации 0, 0,5 или 5 mM. В начале эксперимента (t=0 ч) отбирали аликвоту смеси, гасили ее N-этилмалеимидом (NEM; Sigma) до конечной концентрации 10 mM (для инактивации потенциально реакционноспособных тиольных групп) и инкубировали с остальной смесью в течение 16 ч при 37°C (t=16 ч). После инкубации образец при t=16 ч гасили, как описано выше.

Комбинации первого и второго исследованных антител представлены в следующей таблице:

Антитело 1	Антитело 1 (мутации по сравнению с IgG4 дикого типа)	Антитело 2
IgG1 wt (дикий тип)	-	IgG4 wt (дикий тип)
IgG4 wt (дикий тип)	-	IgG4 wt (дикий тип)
IgG4 P	S241P	IgG4 wt (дикий тип)
мутант IgG4 28	C127S Y229C	IgG4 wt (дикий тип)
мутант IgG4 28 P	C127S Y229C S241P	IgG4 wt (дикий тип)
мутант IgG4 44	C127S G230C P238PAAA	IgG4 wt (дикий тип)
мутант IgG4 44P	C127S G230C P238PAAA, S241P	IgG4 wt (дикий тип)
мутант IgG4 48	C127S, S227P, Y229S, G230C, P237D, P238KTNT, S241P	IgG4 wt (дикий тип)
мутант IgG4 65	C127S, S227P, Y229S, G230C, P237D, P238KTNT	IgG4 wt (дикий тип)
IgG4	IgG4 дикого типа (S241)	S241G
IgG4		S241A
IgG4		S241T
IgG4		S241P
IgG4		C127C и Y229C
IgG4	IgG4 S241G	S241A
IgG4		S241T
IgG4	IgG4 S241T	S241A
IgG4		S241A
IgG4	IgG4 дикого типа (S241)	C239S
IgG4		C242S
IgG4		C239C и C242C
IgG4		C127C и Y229C
IgG4	IgG4 S241P	C127C и Y229C
IgG4		S241G
IgG4		S241A
IgG4		S241T
IgG4		C239C и C242C
IgG4		C239C и C242C
IgG4	IgG4 C127S и Y229C	S241G
IgG4		S241A
IgG4		S241T
IgG4		C239C и C242C
IgG4	IgG4 C239C и C242C	S241G
IgG4		S241A
IgG4		S241T
IgG4		C239C и C242C
IgG4		C239S
IgG4		C242S
IgG4		C242S
IgG4		C242S

Обмен тяжелыми цепями между антителами 1 и 2 в таблице выше обеспечивает асимметричные антитела с тяжелой цепью из каждого из соответствующих антител.

b) Выявление и количественное определение обмена тяжелыми цепями *in vitro*.

Присутствие функционально активных биспецифических антител определяли с использованием сэндвич-анализа MSD, реакционные образцы после гашения, полученные согласно примеру 5 а), подвергнутые серийному разведению в 1% BSA в PBS (PB), предварительно инкубировали с 1 мкг/мл биотинилированного антигена 1 (антиген первого антитела) в PB в течение 1 ч при к.т. при встряхивании (200 об/мин), а затем переносили в предварительно заблокированные покрытые стрептавидином планшеты для MSD с PB (Meso Scale Diagnostics). После инкубации в течение 1 ч при к.т. при встряхивании лунки промывали три раза посредством PBS/0,1% Tween-20, а затем инкубировали с 1 мкг/мл сульфомеченого антигена 2 (антиген второго антитела) в PB. После инкубации планшеты промывали, как описано выше,

и сигналы выявляли и измеряли с использованием коммерческого буфера для считывания и устройства Image Sector 6000 соответственно. Фоновые величины, полученные в контрольных параллельных реакциях, в которых биотинилированный антиген был заменен небитинилированной альтернативой, вычитали из величин всех сигналов. Для всех вычислений использовали дублированные величины по меньшей мере из 3 независимых экспериментов. Чем более высоким является сигнал MSD, тем более высоким является уровень обмена тяжелыми цепями, который произошел.

На фиг. 16 представлен обмен тяжелыми цепями через 16 ч, где первое антитело выбрано из IgG1 дикого типа, IgG4 дикого типа и различных мутантных антител и второе антитело представляет собой IgG4 дикого типа при двух концентрациях GSH. На фигурах показано, что мутанты имеют меньший обмен, чем антитела IgG4 дикого типа, и значительно больший обмен, чем антитело IgG1 дикого типа. Это является преимуществом, поскольку обмен можно использовать для получения асимметричных антител по настоящему изобретению *in vitro*, которые *in vivo* обладают меньшей подверженностью обмену, чем антитела IgG4 дикого типа. В некоторых случаях увеличение концентрации восстановителя, такого как GSH, увеличивает величину наблюдаемого обмена.

В полном соответствии с литературой (Labrijn 2011, Lewis 2009, Stubenrauch 2010, Labrijn 2009) авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что мутация S241P в центральной шарнирной области IgG4 является инструментом для предупреждения обмена Fab-плечами (фиг. 16). Также можно видеть, что мутантные биспецифические антитела по настоящему изобретению демонстрируют меньший обмен Fab-плечами, чем было показано при 0,5 mM GSH, что в 100 раз превышает физиологическую концентрацию GSH 4-6 мкМ в плазме (Zilmer, et al, 2005. Drug Design Reviews). Таким образом, можно получать биспецифические антитела *in vitro* путем обмена Fab-плечами в восстанавливающих условиях, которые могут иметь значительно сниженный обмен Fab-плечами *in vivo* по сравнению с IgG4 wt.

На фиг. 17 показано, что мутант с глицином в положении 241 может без труда обмениваться с мутантами IgG4 либо с аланином, либо с треонином, в этом положении. IgG4 с аланином в положении 241 обменивается в некоторой степени в большей степени с мутантом с треонином в этом положении, чем с мутантом с глицином в этом положении. Аналогично мутант IgG4 с треонином в положении 241 продемонстрировал сниженную активность в реакции с S241G по сравнению с симметричным анализом. Обмен с S241A IgG4 был сходным с симметричным анализом. В общем, это указывает на то, что IgG4 S241T обменивается на сходных уровнях с IgG4 WT и обменивается с большей вероятностью по сравнению с мутантами S241A и S241G.

Аффинность антитела.

Аффинность выбранных мутантных IgG4-антител по настоящему изобретению в отношении растворимого цитокина-мишени можно измерять с помощью BIAcore™. Формат анализа представляет собой улавливание IgG на поверхности с антителом против Fc с последующим титрованием растворимого цитокина.

Термин " k_d " (s^{-1}) относится к константе скорости диссоциации для взаимодействия антитело-антиген. Указанную величину также обозначают как величина k_{off} .

Термин " k_a " ($M^{-1} s^{-1}$), как используют в рамках изобретения, относится к константе скорости ассоциации для взаимодействия антитело-антиген.

Термин " K_D " (M) или " K_D " (nM), как используют в рамках изобретения, относится к равновесной константе диссоциации для взаимодействия антитело-антиген.

Анализ с использованием эксклюзионной (SEC) ВЭЖХ.

Приблизительно 50 мкг очищенного антитела анализировали с помощью ВЭЖХ с использованием колонки S200. Для анализа использовали Ab 1-19. Этот результат показывает, что связанный нековалентными связями H2L2 образуется несмотря на изменения расположения DSB в молекуле IgG4 человека.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Асимметричное антитело, обладающее способностью снижать "обмен Fab-плечами" по сравнению с IgG4 дикого типа, содержащее

две тяжелые цепи или два их фрагмента, каждая из которых содержит, по меньшей мере, переменную область, шарнирную область и домен C_{H1} ,

где первая тяжелая цепь или ее фрагмент принадлежит классу IgG4; причем в указанном антителе:

а) цистеин межцепочечной связи в положении 127 по системе нумерации Кэбат в домене C_{H1} заменен на аминокислоту, не содержащую тиол;

б) одна или несколько аминокислот, расположенных в верхней шарнирной области, заменены на цистеин,

вторая тяжелая цепь или ее фрагмент отличается по аминокислотной последовательности от указанной первой тяжелой цепи, по меньшей мере, в участке, находящемся вне переменной области; и

одна или несколько аминокислот в верхней шарнирной области первой тяжелой цепи в положениях 227, 228, 229 и 230 по системе нумерации Кэбат заменены на цистеин.

2. Асимметричное антитело по п.1, где участок, находящийся вне варибельной области, представляет собой константную область.
3. Асимметричное антитело по п.1 или 2, где глицин в положении 230 по системе нумерации Кэбат заменен на цистеин.
4. Асимметричное антитело по любому из пп.1-3, где тирозин в положении 229 по системе нумерации Кэбат заменен на цистеин.
5. Асимметричное антитело по любому из пп.1-4, где лизин в положении 228 по системе нумерации Кэбат заменен на цистеин.
6. Асимметричное антитело по любому из пп.1-5, где серин в положении 227 по системе нумерации Кэбат заменен на цистеин.
7. Асимметричное антитело по любому из пп.1-6, где цистеин в положении 239 и цистеин в положении 242 по системе нумерации Кэбат в первой тяжелой цепи заменены на аминокислоту, не содержащую тиол.
8. Асимметричное антитело по любому из пп.1-6, где цистеин в положении 239 по системе нумерации Кэбат в первой тяжелой цепи заменен на аминокислоту, не содержащую тиол.
9. Асимметричное антитело по любому из пп.1-6, где цистеин в положении 242 по системе нумерации Кэбат в первой тяжелой цепи заменен на аминокислоту, не содержащую тиол.
10. Асимметричное антитело, обладающее способностью снижать "обмен Fab-плечами" по сравнению с IgG4 дикого типа, содержащее две тяжелые цепи, каждая из которых содержит, по меньшей мере, варибельную область, шарнирную область и домен C_H1 , где первая тяжелая цепь или ее фрагмент отличается тем, что принадлежит классу IgG4 и имеет:
 - а) цистеин межцепочечной связи в положении 127 по системе нумерации Кэбат, замененный на аминокислоту, не содержащую тиол;
 - б) цистеин в положении 239 или цистеин в положении 242 по системе нумерации Кэбат, замененный на аминокислоту, не содержащую тиол; и
 вторая тяжелая цепь или ее фрагмент отличается по аминокислотной последовательности от указанной первой тяжелой цепи, по меньшей мере, в участке, находящемся вне варибельной области.
11. Асимметричное антитело по любому из пп.1-10, где аминокислота, не содержащая тиол, представляет собой серин.
12. Асимметричное антитело по любому из предшествующих пунктов, где аминокислота в положении остатка 241 по системе нумерации Кэбат заменена на пролин.
13. Асимметричное антитело по п.12, где аминокислота, не содержащая тиол, представляет собой серин.
14. Асимметричное антитело по любому из предшествующих пунктов, где три аминокислоты в первой тяжелой цепи вставлены между аминокислотами 226-243 по системе нумерации Кэбат.
15. Асимметричное антитело по п.14, где три аминокислоты в первой тяжелой цепи вставлены между положениями 238 и 239 по системе нумерации Кэбат.
16. Асимметричное антитело по п.15, где между положениями 238 и 239 по системе нумерации Кэбат вставлены три остатка аланина.
17. Асимметричное антитело по п.15, где между положениями 238 и 239 первой тяжелой цепи по системе нумерации Кэбат встроены треонин, гистидин и еще один треонин.
18. Асимметричное антитело по любому из предшествующих пунктов, где серин в положении 241 первой тяжелой цепи по системе нумерации Кэбат заменен на пролин.
19. Асимметричное антитело по любому из предшествующих пунктов, где в первой тяжелой цепи глицин в положении 230 заменен на цистеин, серин в положении 227 заменен на пролин, тирозин в положении 229 заменен на серин, пролин в положении 237 заменен на аспарагиновую кислоту, пролин в положении 238 заменен на лизин, аминокислотная последовательность треонин-гистидин-треонин встроена между положениями 238 и 239 и серин в положении 241 заменен на пролин.
20. Асимметричное антитело по любому из предшествующих пунктов, где одна или несколько тяжелых цепей или их фрагментов содержат домен C_H2 и/или домен C_H3 .
21. Асимметричное антитело по любому из предшествующих пунктов, где каждая тяжелая цепь содержит варибельную область и две варибельные области являются идентичными.
22. Асимметричное антитело по любому из предшествующих пунктов, где каждая тяжелая цепь содержит варибельную область и обе эти области различны.
23. Асимметричное антитело по любому из предшествующих пунктов, где антитело является биспецифическим.
24. Асимметричное антитело по любому из предшествующих пунктов, где шарнирная область в

первой тяжелой цепи или фрагменте тяжелой цепи отличается от шарнирной области во второй тяжелой цепи или фрагменте тяжелой цепи.

25. Асимметричное антитело по любому из предшествующих пунктов, где шарнирная область в каждой тяжелой цепи или фрагменте тяжелой цепи отличается по аминокислотной последовательности и/или по длине.

26. Асимметричное антитело по любому из пп.1-23, где шарнирная область в первой тяжелой цепи или фрагменте тяжелой цепи идентична шарнирной области во второй тяжелой цепи или фрагменте тяжелой цепи.

27. Асимметричное антитело по любому из пп.1-23, где шарнирная область в каждой тяжелой цепи или фрагменте тяжелой цепи имеет одну и ту же аминокислотную последовательность.

28. Асимметричное антитело по любому из пп.1-27, где одна тяжелая цепь или каждая тяжелая цепь содержит верхнюю шарнирную область и центральную область длиной от 12 до 17 аминокислот.

29. Асимметричное антитело по п.28, где одна тяжелая цепь или каждая тяжелая цепь содержит верхнюю шарнирную область и центральную шарнирную область длиной 15 аминокислот.

30. Асимметричное антитело по любому из предшествующих пунктов, где вторая тяжелая цепь принадлежит классу IgG4 или классу IgG1.

31. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотидную последовательность, которая кодирует антитело по любому из пп.1-30.

32. Клетка-хозяин для получения асимметричного антитела по любому из пп.1-30, содержащая вектор по п.31.

33. Применение антитела по любому из пп.1-30 для лечения заболевания или нарушения, в патологический механизм которых вовлечены антигены, которые связываются антителом по любому из пп.1-30.

34. Применение по п.33, где заболевание или нарушение выбрано из группы, состоящей из ревматоидного артрита, псориатического артрита, болезни Стилла, болезни Макла-Уэлса, псориаза, болезни Крона, язвенного колита, SLE (системной красной волчанки), астмы, аллергического ринита, атопического дерматита, рассеянного склероза, васкулита, сахарного диабета I типа, трансплантации и реакции "трансплантат против хозяина", идиопатического фиброза легких (IPF), системного склероза (или склеродермии), фиброза почек, диабетической нефропатии, IgA-нефропатии, гипертензии, заболевания почек конечной стадии, перитонеального фиброза (непрерывный амбулаторный перитонеальный диализ), цирроза печени, связанной со старением дегенерации желтого пятна (ARMD), ретинопатии, реактивного фиброза сердца, образования рубца, келоидов, ожогов, изъязвлений кожи, ангиопластики, хирургической операции коронарного шунтирования, артропластики и хирургической операции по удалению катаракты, злокачественной опухоли молочной железы, яичника, предстательной железы, легкого, почки, поджелудочной железы, желудка, мочевого пузыря, кишечника, кости, печени и головного мозга.

35. Способ получения антитела по любому из пп.1-30, включающий стадии:

обеспечения симметричным антителом, содержащим первую тяжелую цепь или ее фрагмент, принадлежащие классу IgG4, и имеющим:

а) цистеин межцепочечной связи в положении 127 по системе нумерации Кэбат в домене C_H1, замененный на аминокислоту, не содержащую тиол;

б) одну или несколько аминокислот, расположенных в верхней шарнирной области и замененных на цистеин; и одну или несколько аминокислот, расположенных в верхней шарнирной области первого антитела в положениях 227, 228, 229 и 230 по системе нумерации Кэбат и замененных на цистеин; и

смешивания указанного антитела *in vitro* со вторым симметричным антителом, содержащим вторую тяжелую цепь или ее фрагмент, которая отличается по аминокислотной последовательности от указанной первой тяжелой цепи, по меньшей мере, в участке, находящемся вне варибельной области, в восстанавливающих условиях в присутствии подходящего восстанавливающего реагента, такого как GSH, 2-меркаптоэтанол, 2-меркаптоэтиламин, TBP, TCEP, цистеин-HCl и DTT или окислительно-восстановительный буфер, и

выделение асимметричного антитела, полученного в результате указанного смешивания;

причем концентрация восстанавливающего агента составляет 0,01-10 мМ.

СН1 и шарнирная область IgG1 дикого типа

(A) STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVDKRV(E) PKSCDKTHTCPPCPAPELGGP (SEQ ID NO:1)

СН1 и шарнирная область IgG4 дикого типа

(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNH
KPSNTKVDKRV(E) SKYGPPCPSCPAPEFLGGP (SEQ ID NO:2)

Константная область легкой цепи каппа Ig дикого типа

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKKHYACEVT
HQLLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:66)

Фиг. 1a

Легкая цепь к человека	C _κ FNRGEC (SEQ ID NO:3)	
Тяжелая цепь	C _{H1} (N-концевая)	ВЕРХНЯЯ ЦЕНТРАЛЬНАЯ НИЖНЯЯ
IgGγ1 человека	LAPSSKSTS (SEQ ID NO:4)	EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:5) APELLGGP
IgGγ2 человека	LAPCSRSTS (SEQ ID NO:6)	ERR CCVECPPCP APPVA GP
IgGγ3 человека	LAPCSRSTS (SEQ ID NO:8)	ELKTPLGDTTHT CPRCP (EPKSCDTPPCPRCP) APELLGGP
IgGγ4 человека	LAPCSRSTS ↑ C127 (SEQ ID NO:10)	ESKYGPP CPSCP APEFLGGP ↑ ↑ ↑ G230 C239 C242 (SEQ ID NO:11)
Тяжелая цепь	C _{H1} (N-концевая)	Шарнирная область
IgD человека	ITSGGRHPK (SEQ ID NO:67)	(E) SPKQAQSSVPTAQPQAEGLAKATTAPATTRNT (SEQ ID NO:68)
Тяжелая цепь	C _{H1} (N-концевая)	C _{H1} (C-концевая)
IgM человека	LVSCENSPS (SEQ ID NO:69)	EKNVPLP (SEQ ID NO:70) C _{H2} (N-концевая) (V) IAELEPPKVS (SEQ ID NO:71)

Фиг. 1b

	СН1	ШАРНИРНАЯ ОБЛАСТЬ															
Нумерация EU для IgG1	131	216	217	218	221			222	223	224	225	226	227	228	229	230	
Нумерация Kabat для IgG1	127	226	227	228	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	
Нумерация IMGT для IgG1	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
Остатки IgG1 wt	S	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	
Нумерация EU для IgG4	131	216	217	218	219	220	224	225	-	-	-	226	227	228	229	230	
Нумерация Kabat для IgG4	127	226	227	228	229	230	237	238	-	-	-	239	240	241	242	243	
Нумерация IMGT для IgG4	10	1	2	3	4	5	6	7				8	9	10	11	12	
Остатки IgG4 wt	C	E	S	K	Y	G	P	P	-	-	-	C	P	S	C	P	
Мутации IgG4	S		C или P	C	C или S	C	D или A	K или A	A или T или G	A или H или G	A или T или G	S		P	S		

Фиг. 2a

	СН1	ШАРНИРНАЯ ОБЛАСТЬ						
Нумерация Kabat	127	226	227	228	229	230	232	233
Нумерация IMGT для IgG3	10	1	2	3	4	5	6	7
Остатки IgG3 wt	C	E	L	K	T	P	L	G
Мутации IgG3	S	C	C	C	C	C	C	C

Фиг. 2b

	СН1					СН2		
Нумерация Kabat для IgM	127	223	223A	223B	223C	243G	243H	243I
Нумерация IMGT для IgM	10	121	122	123	124	1.5	1.4	1.3
Остатки IgM wt	C	V	P	L	P	V	I	A
Мутации IgM	S	C	C	C	C	C	C	C

Фиг. 2с

	СН1	Шарнирная область						
Нумерация Kabat для IgD	128	227	228	229	230	231	232	233
Нумерация IMGT для IgD	11	1	2	3	4	5	6	7
Остатки IgD wt	C	E	S	P	K	A	Q	A
Мутации IgD	S	C	C	C	C	C	C	C

Фиг. 2d

	АНТИТЕЛА																		
Мутации	G4	G1	1	2	3	4	5	5P	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
C127S			*	*	*	*			*	*	*							*	*
G230C							*	*	*	*	*	*	*	*				*	*
C239S				*		*			*		*	*		*	*		*		
S241P								*											*
C242S					*	*				*	*		*	*		*	*		

Фиг. 3а

	АНТИТЕЛА																		
Положение Сус НС	G4	G1	1	2	3	4	5	SP	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
127	LC						LC	LC				LC	LC	LC	LC	LC			
230							HC	HC	LC	LC	LC	HC	HC	HC				HCsusLC	HCsusLC
230 (G4)		LC																	
233 (G1)																			
239	HC	HC	LCsusHC		LC		HC	HC		HC			HC			HC		HCsusLC	HCsusLC
242	HC	HC	LCsusHC	LC			HC	HC	HC			HC			HC			HCsusLC	HCsusLC

Фиг. 3b

	АНТИТЕЛА																		
Мутации G4	G4	G1	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	44	45	46	47	
C127S			*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
S227C											*	*	*	*					
K228C							*	*	*	*									
Y229C			*	*	*	*													
G230C															*	*	*	*	
P238PAAA															*	*	*	*	
C239S				*		*		*		*		*		*		*		*	
S241P																			
C242S					*	*			*	*			*	*			*	*	

Фиг. 4а

	АНТИТЕЛА																	
Поло- жение Сус НС	G4	G1	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	44	45	46	47
127	LC																	
227											LC _{cont} HC	LC	LC	LC				
228							LC или HC	LC	LC	LC								
229 (G4)			LC или HC	LC	LC	LC												
230 (G4)		LC													LC _{cont} HC	LC	LC	LC
233 (G1)																		
239	HC	HC	HC или LC		HC		HC или LC		HC		HC _{cont} LC		HC		HC _{cont} LC		HC	
242	HC	HC	HC или LC	HC			HC или LC	HC			HC _{cont} LC	HC			HC _{cont} LC	HC		

Фиг. 4b

(Ab 6) (SEQ ID NO:12)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT~~TK~~TYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPPSPSCPAPEFLGGF

(Ab 7) (SEQ ID NO:13)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT~~TK~~TYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPPCPSSPAPEFLGGF

(Ab 8) (SEQ ID NO:14)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT~~TK~~TYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPPSPSSPAPEFLGGF

(Ab 15) (SEQ ID NO:15)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT~~TK~~TYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPPCPSCPAPEFLGGF

(Ab 16) (SEQ ID NO:16)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT~~TK~~TYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPPCPECPAPEFLGGF

(Ab 28) (SEQ ID NO:17)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT~~TK~~TYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKCGPPCPSCPAPEFLGGF

(Ab 29) (SEQ ID NO:18)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT~~TK~~TYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKCGPPSPSCPAPEFLGGF

(Ab 30) (SEQ ID NO:19)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT~~TK~~TYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKCGPPCPSSPAPEFLGGF

(Ab 31) (SEQ ID NO:20)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT~~TK~~TYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKCGPPSPSSPAPEFLGGF

(Ab 32) (SEQ ID NO:21)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT~~TK~~TYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SCYGPPCPSCPAPEFLGGF

(Ab 33) (SEQ ID NO:22)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT~~TK~~TYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SCYGPPSPSCPAPEFLGGF

(Ab 34) (SEQ ID NO:23)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT~~TK~~TYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SCYGPPCPSSPAPEFLGGF

(Ab 35) (SEQ ID NO:24)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT~~TK~~TYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SCYGPPSPSSPAPEFLGGF

(Ab 36) (SEQ ID NO:25)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT~~TK~~TYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) CKYGFPCSPCAPEFLGGF

(Ab 37) (SEQ ID NO:26)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT~~TK~~TYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) CKYGFPPSPSCPAPEFLGGF

(Ab 38) (SEQ ID NO:27)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) CKYGPPCPSSPAPEFLGGP

(Ab 39) (SEQ ID NO:28)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) CKYGPPSPSPAPEFLGGP

(Ab 44) (SEQ ID NO:29)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPPAAACSPSPAPEFLGGP

(Ab 45) (SEQ ID NO:30)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPPAAASPSPAPEFLGGP

(Ab 46) (SEQ ID NO:31)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPPAAACFSSPAPEFLGGP

(Ab 47) (SEQ ID NO:32)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPPAAASPSPAPEFLGGP

(Ab 2) (SEQ ID NO:33)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYGPPSPSCPAPEFLGGP

(Ab 3) (SEQ ID NO:34)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYGPPCPSSPAPEFLGGP

(Ab 48) (SEQ ID NO:35)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) PKSCDKTHTCPCPAPEFLGGP

(Ab 28P) (SEQ ID NO:36)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKCGPPCPCPAPEFLGGP

(Ab 44P) (SEQ ID NO:37)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPPAAACPPCPAPEFLGGP

(Ab 1) (SEQ ID NO:296)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYGPPCPCSPAPEFLGGP

(Ab 4) (SEQ ID NO:297)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYGPPSPSSPAPEFLGGP

Ab5 (SEQ ID NO:298)

(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPPCPCSPAPEFLGGP

Ab5P (SEQ ID NO:299)

(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPPCPCCPAPEFLGGP

Ab9 (SEQ ID NO:300)

(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPPSPCSPAPEFLGGP

Ab10 (SEQ ID NO:301)

(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPPCPSSPAPEFLGGP

Ab11 (SEQ ID NO:302)

(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPPSPSSPAPEFLGGP

Ab12 (SEQ ID NO:303)

(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYGPPSPSCPAPEFLGGP

Ab13 (SEQ ID NO:304)

(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYGPPCPSSPAPEFLGGP

Ab14 (SEQ ID NO:305)

(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYGPPSPSSPAPEFLGGP

Фиг. 5

IgG4 CH2 и CH3: (SEQ ID NO:64)

SVFLFPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVTLVHQLDQLNGKEYCKVKVSNKG
LPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSR
WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

IgG4 CH2 IgG1 CH3: (SEQ ID NO:65)

SVFT,PPPKPKDPT,MTSRTPFVTCVVVVDSQRNPFVQGFNYYVYVGHNAKTKPRFRQFNSTYRVVSU,TVI,HQDWT,NGKFYKCKVSNKG
LPSSIEKTSIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNNYVSLTCLVKGFQSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDGSGFFLYSKLTVDKSR
YQQSNVVFSCSMHEALHNHYTQKSLSLPGK

(Ab 6) (SEQ ID NO:38)

(A) STKGPSVFLPAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVTSWNSGALTSGVHTTFAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQKTYTCNVHD
KPSNTKVDKVR (E) SKVCPSPSPSCPAPFELGKGLVPPKPKDLMTSLRTEPVTCTVVDVSDQEDPEVGFQNWYVDGVEVHNAAKTKPRRE
QFNSTYRVSGLTVLHQDWLNGKEYKCKFLNGKSLSPELTISGAKGQPREPOVTVLPSQEEMFNQVSLTCLVKLGKFPSPDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSGDFFLYSLRSLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNNHYTKQSLSLGK

(Ab 7) (SEQ ID NO:39)

(A) STKGPSVFPLPAPSRSSTSESTAALGCLVKDYPPEPVTVSNWNGALTSGVHTPPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSSLGTKTKYTCNVHD
KPSNTKVDKVR(E) SKYCPCKSPAPAEFLGGPSVFLFPKKPKDLMTLSRTPEVTVVVDVQSDQDEPQVFNWYVDGVEVHNAKTKFREE
QFNSTYRVSVSLTVLHDWNLGKPKYCSVNLGKPSLIEIKSAGKQPREPQVTVLPPSEQEMTKNQVSLTKVLVGKFPSPDIANVEWS
NGQPENNYKTTTPVLDSGDSFLYSLRTVCKSRWQEGNVFCSVMHEALHNHYTKQSLSLSLGK

(Ab 8) (SEQ ID NO:40)

(A) STKGPSVFPLPAPSRSSTSESTAALGCLVKDYPFPEPVTVSNWNGALTSGVHTFPFVQLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTKTKYTCNVHD
KPSNTDKVKVR(E) SKYCPSPSPGPAPEFLGGPSVFLFPKKPKDLMTSLRSTPFCVVVDVQSDQPEVGFQNWYVDGVEVHNATKTPREE
NQFNSTYRVSVSLTVLHDWNLGKGYEYCKSVNKLPSSEIKTSKAGQPREPQVTVLPSEQEMTKNQVSLTCLVKGPSPIADIAEWES
GFGPENNYKTTTPVLDSGDSFLYSLRTYDKKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTKQSLSLSLGK

(Ab 15) (SEQ ID NO:41)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESAALGLCLVKDYFPEPVTVSWNGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTPVSSSLGKTITYCNVDH
KPSNTKYDDKVR (E) SKYCPPCSPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTVCVVVDVSQEDPEVFQNWYDGVVHNAKTKPREEE
QFNSTYRVSVSLTQLHQLDNLNGEYKCYKSNKGLPSSIEKTSKAGQPREPQVITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
WGHPENNYTKTTPPVLDSGDSGFFLYSRLTVDSKRSQEGNFGVSMVHEALNNHYTKQSLSLSLG

(Ab 16) (SEQ ID NO:42)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSEIAALGLCKVDYFPPEVTVTSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTKTYTCNVHD
KPSNTYTKDKRV (E) SKYCPPCPCPAEFLGGPSVFLFPKPKDLTMSIRTPETVTVVVDVSDQDEPEVGFNWYVDGVEVHNAKTKFREE
QFNSTYRVSVSLVLDHQDLWLGKYEKKYCKNSKGLPSSIEKTSKAGQPREPQVTLTPPSQEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
WGQENPNYKTTPTPLDSDGSGFFLYSRITVDKSRWQEGNVFSCASVMEHAENHNYTKQSLSLSLG

(Ab 28) (SEQ ID NO:43)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESAALGLCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGKTITYTCNVHD
KPSNTYTKVDKVR (E) SKGCGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPKPKDLMISRTPEVTVTVVVDVSQEDPEVGFNYYVDGVEVHNAKTFRREE
QFNSTYRVSVSLTVLHQDLNGLYKCYKSLNSKLPISSEIKTSKAKGQPREPVTVLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
QNGPENNYTKTTPPVLDSGDSGFFLYKRLTVDKSRWQEGNFGVPSVMEALHNHYTKQSLLSLGK

(Ab 29) (SEQ ID NO:44)

(A) STKGPSVFPPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPEVTVSNWNGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTPSSSLGTKITYCNVHD
KPSNTYVDKVRV (E) SKCGPSSPCPAEPFLGGSPVFLFPKKPDLTMSITSEPTVTVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAAKTKPREE
QNSTYRVSVSLTVLDHDLWGKGYFKVCKNSIAGKLPSSIETKISAKGQPREPQVTVLPDSQEAMTKNQVSLTCLVKGGFYPYSDIAWEWS
QNPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNYHTQKSLTSLGK

(Ab 30) (SEQ ID NO:45)

(A) STKGPSVFPPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTTTPAVLQSSGLYSLSVWTVPSSSLGKTITYTCMVND
KPSNTYVDKVRV (E) SKGCPPEKSGPAPEFLGCGSPVFLPPKPKDLMISTPREPTVTVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNATKTPREE
QNFTSYRVSLSVTLVLHQDLNKGCKEYKCKVSNLKGPPSTIEIKSGAKGQPREPQVTLTPSQEEMTKNQVSLTCLVLGGKPSPIADIAWEWS
NQGNPENNYKTTTPPVLDSGGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNNHYTKQSLSLGK

(Ab 31) (SEQ ID NO:46)

(A) STKGPSVFPPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPEVTVSWNSGALTSGVHTFPAIVLQSSGLYSLSVVTPSSSLGTKITYTCNVHD
KPSNTYTKVDKVR (E) SKGCGPPSPSPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI STPREQTVTVVDVDSQEDPEVGFNWIYDGVVHNAAKTKFREE
QFNSTYRVSVSLTVLHQLDWLNGYKRYCKSLNSKGLPSEIETISKAKGQPREPVTVLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWES
NGQPENNYTKTTPVLDSDGSGFFLYSKRVTVDKSRWGGQVGNVSGSMVHEALHNHYTQKSLSLSLG

(Ab 32) (SEQ ID NO:47)

(A) STKGPSVFLPAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGKTGYTCNVDH
KPSNTKYDKRV (E) SCVGGPCPCSPAPEFLGGPSVFLFPKPKDLMISTPEVTVCVVVDVSQDEPEVGFQNNYVDGVEVHNAKTKFREE
QNGSYTVKRVSVLTLDHQLNGKLYSKRNVKNSKGLPSISIEKTSKAKGQFREPGVTVLTFPSQEGMTKNQVSLTGKGFYFSDIAVEWES
QNGPENNKYTTLPVLDSGDSFFLYKCVLTVDKSRQEGNVFSCSVMEALHNHYTKQSLSLSGE

(Ab 33) (SEQ ID NO:48)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGLCKVDFPEPEVTVSWNSGALTSGVHTTFAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGKTITYCNVDH
KPSNTYTKDKVR (E) SCYGGPSPSCPAPFELGGPSVFLPPKPKDTLMTSRPEPTVTVVVDVQSDQPEVGFNYYVDGVEVHNAKTKFREE
QFNSTYKVSFVLTVHDLWLNGYKRYKSWNKGLPSSEIKTSKAGQPREPQVTLTPPSQEQEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
QGNQPNNTYKTTTPVLDSGSGFLYSLRTVDSKRQEGWVFNQSGHMEALHNHYTQKSLSLGLG

(Ab 34) (SEQ ID NO:49)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHFFPAVLQSSGLYSSVVTVPSSSLGTQKTYTCNVHD
KPSNTYRVDKRV (E) SCYGVPPCPSPSPAPEFLGGPSVFLFPKPKDITLMSRTEPVTVCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVYSLVTLVLDHQDMLGKGYCKYKCVNSKGLPSSIIEKTSKASKQPREPVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSDSGFFLYSLRTVDKSRQEGVFSQSVMHAEALHNHYTQKSLSLSLG

(Ab 35) (SEQ ID NO:50)

(A) STKGPSVFLPAPSRSTSESTAALGLCKLVDFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTGYTCNVHD
KPSNTYTKDKVR (E) SCYGGWSPSPAPAEFLGGPSVFLFPKPKDLMTISRPTEVTVVVDVSDQDEPEVGFNYYVDGVEVHNAKTKFREE
QNGSYTTPVVLVLHQLDQDLNGFLKYSKNSKGLPSSIEKTSKAGQPREPQVTVLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
QQNPENNYKTTSPVLVSDSGSLFYKRLTVDKSRQEGVFNQSSVMEALHNHYTKQSLLSLGLG

(Ab 36) (SEQ ID NO:51)

(A) STKGPSVFPLPAPSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAIVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGKTITYCNVDH
KPSNTVKDKVR (E) CKYGGPCPCPAPEFLGGPSVFLFPKPKDLMISTPREPTVTVVDSDQEDPEVGFQNNYVDGVEVHNAKTKFREE
QNNSTYRVSVSLVTLHDQLNGHLYKRYLNKNSKGLPSIEKTSKAGQPREPQVYVTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSPDAVWEWS
QNNQENNYKVVTPVLDSGDSFFLYSKRLTVDKSRQEGNFKVPSQMEALHNHYTKQSLSLSLG

(A) STKGPSVFPPLAPSSRSTSESAALGLCKLVDFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKTYTCNVDH
KPSNTKRVKRVV(L) CKYQDSSPSCPAEFLGGSPVFLFPKKPKDTLMSIRTPPEVTCVVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVGVHNAKTKPREQ
GNTSTYRVKSVSLV(L)HLQDPLWQVCKYCKVSKGFKGLPSSIEKTIKAWKQGNTPQVTVLTPSQEEMTKNQVSLTCKYLKKGFYPSDIAVEV
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

(A) STKGPSVFPPLAPSSRSTSESAALGLCKVDYFPPEVPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTTKTYTCNVDH
KPSNTYKRVKDVV(L) CKYQGPCPPSSPAPEFLGGPSVFLFPKKPKDTLMSIRTPREPTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREQ
GNTSTYKRVSVSLT(L)KQDHWLNGKCYCKVKNGLKPSLSEIKTSKAKQGPPEVPTVTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEVDS
NGQPENNYKTTTPVLDSDSGSFYLSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

(A) STKGPSVFPPLAPSSRSTSEEEAALGLCKVDYFPEPEVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYLSGVVTVPSSSLGTKTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV(E) LKQGWPPSPSPAPEFLGGPSVFLFPKPKDTLMIISRTPECTVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVVHNAKTKPREE
QFNSTYRVRSVLT(V)CHYDGGKVEYCKVKNGLPSSIEKTIKSAKQGPPEPVYTLPPSQEEMTKNQSLKCYKFGNPSDAIVAEWS
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

(A) STKGPSVFPPLAPSSRSTSEES AALGCLVKDYDPEEPVTYVSWNSGALTSGVHTTTPAVALQSSGLYSLSVVTPSSSLGTKTYTCNVDH
KPSNTQDKDRV (E) SKYCPAAACPCSPAPEFLGGPSVFLFPFKPKDTLMISRTPEVTVVDDVDEQDEPQVFNWYVDGVGVHNAKTKP
REEQFNSTYRVSVLTFLHQDHMDKEYCKYVSNRGLPSSEIKATIGKQPREPVVITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVGKFPYSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

(A) STKGPSVFLPLAPSSRSTSEES AALGCLVKDYDPEPEVTYVSWNSGALTSGVHTTTPAVALQSSGLYSLSVSVTVPPSSSLGTKTYTCNVDH
KPSNTQVDDKRV (E) SKYCPAAASPCSPAPEFLGGPSVFLFPKPKDLMISRTPEVTYCVVVDVDSQDEPQVFNWYDGVGEVHNATKP
RNEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVKSNRGLPSSEIAKIGQPREPVVITPPSQEEMTKNQVSLTVDGVGGVYVCSNLY
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTTPAVLQSSGLYLSSSVTVTPSSSLGTTKTYTCNVDH
KPSNTGQDKRV (E) SKYCPAAACPPSPAPEFLGGSPSVLFPPKPKDLMIRSTPEVTVVVDQSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REQFNSTYRVSVSLTVLHQDGLGKEYKCLVNSKGLPSSIEKISKAGKQPREPOVTVLTPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSSFFLYSLKTVDKSRWQEGNVFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

(A) STKGPSVFPLAPSSRSSTSESTAALGCLVKDYFPEPEVTVSWNSGALTSGVHTTFAVLQSSGLYLSSSVTVTPSSSLGTTKTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPAAASPSSPAPEFLGGGPSVLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVQSDPEVQFNWYVDGVVHNAKTKP
REEQFNSTIRRVSVTLVHLDQWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKATSKAGQPRHPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQGVNFSCSVMHEALHSHYQTKLSLSLGK

(A) STKGPSVFPFLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEEPVTVSNNGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTKTTCNVHD
KPSNTYTKVDRV(E)LTGQWPLSPGCPAEFLGGGSPVFLFPKPKDITLMSIPREPTVTVVVDVSDQEDPEVGFQNWYVDGVEVHNAATKTPREE
QFNSTYRVS(L)TLVHGDPLNGKCYRKLSSNKGRLSPSEIKTSKAKQSPREPQVTLTPPSQEMTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWES
QNPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVPSSMHEALHNHYTKQLSLSLGEM

(A) STKGPSVFPPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPEVTVSWNSGALTSGVHTFPAIVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGKTITYCNVDH
KPSNTYTKVDKR (E) SKLGGPPCPSPAPFELGGPSVFLFPKPKDITLMSITPREQTVTVVDVSDQDEPEVGQFNWYDGVVHNAKTKPREE
QFNSTYRVSVSLTVLHQDLWGLNGEYKCKVSNKGLPSSIEKTSKAKGQPREPVTVVTPPSQEMTKNQVSLTCKGKGFYPIADIAEWES
NQPNENNYKTHPPVLDSDGSGFFLYSRILTVDKSRQWGBNGVTFSCVSMHEALNNHYTKQLSLSLGLG

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTTTPAVQLQSGLYSSVVTPVSSSLGKTITYTCNVHD
KPSNTTKVDKVR (E) PKSCDKTHHTCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVQEDDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQGNKYIVRVSVLTFLQLQHDWLGFLYKCRVSKNGKLPSSIEKISKAKGQPREPVYLTLPSSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQGNPENNYKTTTPVLDSGLGFFLYSRLLTVDSRWQGVNMFCSVMHEALHSHYQKSLSLGK

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGKTITYCNVDH
KPSNTKVDKRR (E) SKCGPPCPCPAPEFLGGPSVFLPPKPKDTLMI SRTPEVTVVVDVSDQEDPEVGFNWYVDGVEVHNAAKTFRPEE
QNGNSYRVSVSLVTLHQDWLNGKEYKCKSLKNGLPSSGIEITISKAKGQPREPVTVLTPPSQEMTKNQVSLTCKLGKGYFSPSIDIAEWES
QQNPENNYKTTTPVLDSGDSFLVLRITVDSKRSSENVFCTSSMHEALHNHYTQKSLSLSLG

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSEIAALGCLVKDYFPEPTVTSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYGLSSSVTVTPSSSLGKTYTCNVLD
KPSNTKVDKRR (E) SKYCPAAAA CPCPAEFLGGSPVSPPEKTKTLMIRSTPEVTCVVDVDSQEDPEVGFNNWVDGVEVHNNAKTP
REQENSTYRVYVSLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEPTIKSAKQGRPEQYVLTVPSSQEAMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPPENNYKTTTPVLDHGSNNFFLYSRLLTVDKSRWQEGNVFSCSMVHAELHNNHYTKQSLSLGK

(A) STKGPSVFLAPSSRSTSE¹TAALGCLVKDYFPEPTVTTWNSGALTSGVHTFPAIVLQSSGLYSLSVVTVTPSSSLGTTKTYTCNVHD
KPSNTYKDKVR (E) SKYGPCCPC¹PAPEFLGGPSVFLFPFKKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVGQFNWYVDGVEVHNAATKTPREE
QNGSYRVSVLTVLQHDMLNGKEYIKRSLKNGLPSIEKTSKAKGQRPQVTVLTPPSGEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAEVESW
QQNPENNYKTTTPVLDSDGDTGKYSLRTVDKSGQEGNVFSSGMHEALHNYTKQSLSLSLG

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTTTPFAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTTKTYTCNVHD
KPSNTKVKDKRV (B) SKYGPSPSPSSPAPEFLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEQVTVCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVGVHNAKTKPREEE
QNSTYTRVSVSLTGLQDWLNGKEYIKCKVSNKGLPSSIEKTSISKAKGRPREQVTVLTPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYTKTTPVLIHDSGFGFLYSRI.TVDKSRVQKQGNVFPSCSVMEHA1.HNHYTKQST1.S1.S1.GK

(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYPPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGKTITYTCNVHD
KPSNTYKRRV (E) SKYCPCCPCPAPEFLGGPSVFLFPKPKDITLMI STPEVTVVVDVSDQEDPEVGFNWYDGVGVHNAATKTPREE
NQNPENNYKTPPVLDSDGSEFFLYSKLVTKNKLSPSLDITISKAKQPREQVTVLPSSQEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
QFG

Ab5P (SEQ ID NO:309)
(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQKTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPSPSPAPAEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVHLQDNLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLGK

Ab9 (SEQ ID NO:310)
(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQKTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPSPSPAPAEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVHLQDNLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLGK

Ab10 (SEQ ID NO:311)
(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQKTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPSPSPAPAEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVHLQDNLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLGK

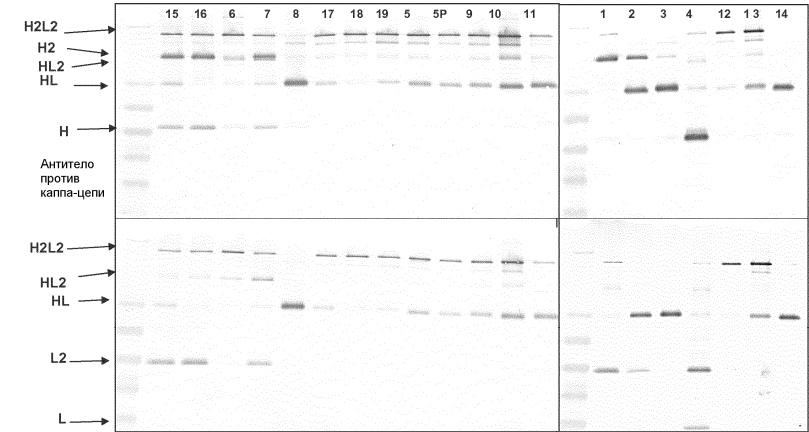
Ab11 (SEQ ID NO:312)
(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQKTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPSPSPAPAEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVHLQDNLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLGK

Ab12 (SEQ ID NO:313)
(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQKTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPSPSPAPAEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVHLQDNLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLGK

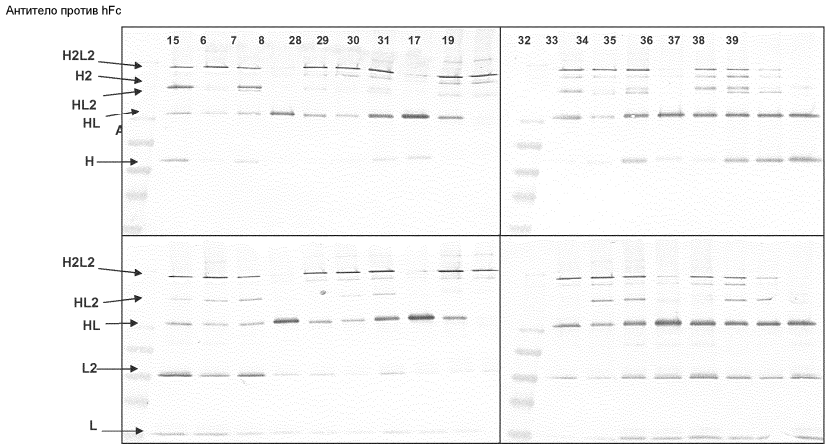
Ab13 (SEQ ID NO:314)
(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQKTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPSPSPAPAEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVHLQDNLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLGK

Ab14 (SEQ ID NO:315)
(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQKTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPSPSPAPAEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVHLQDNLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLGK

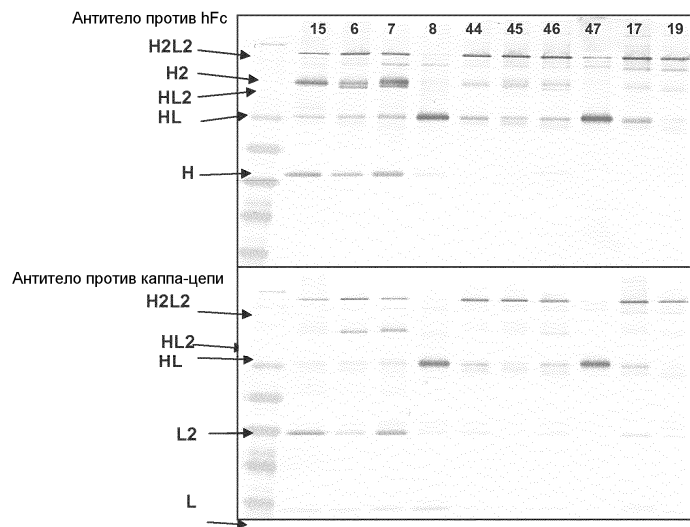
Фиг. 6



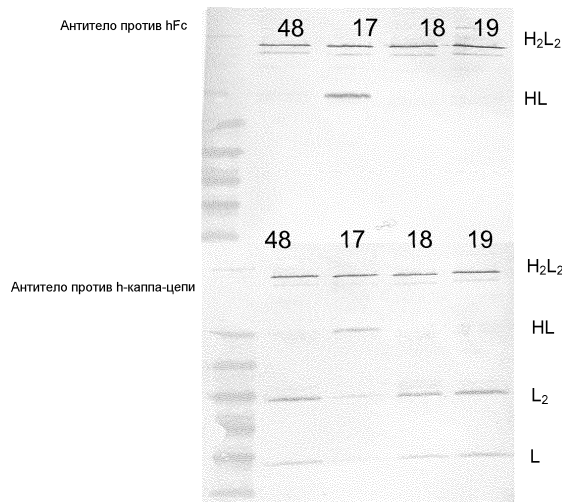
Фиг. 7



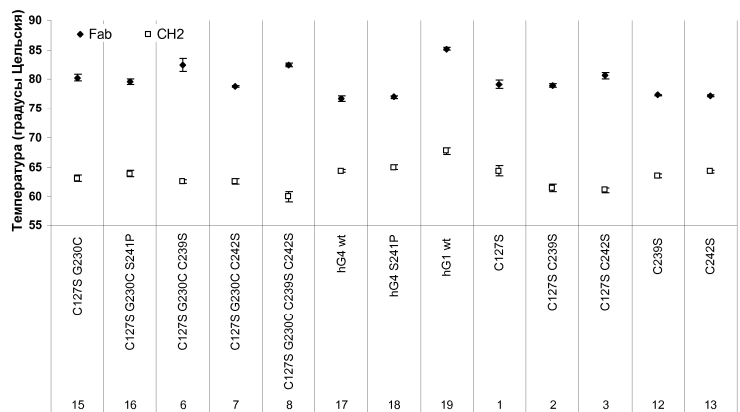
Фиг. 8



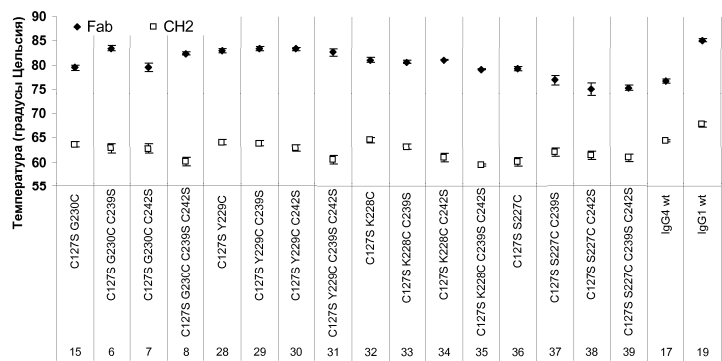
Фиг. 9



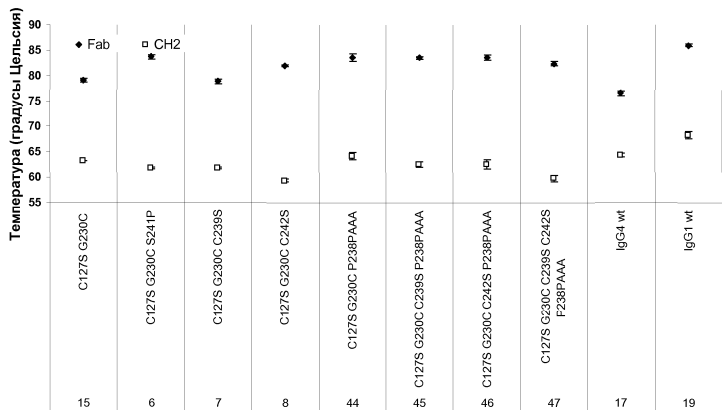
Фиг. 10



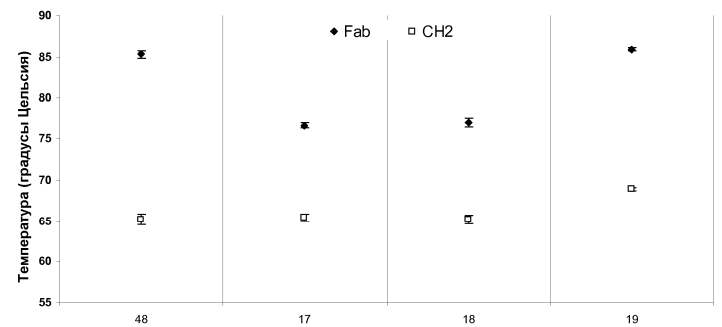
Фиг. 11



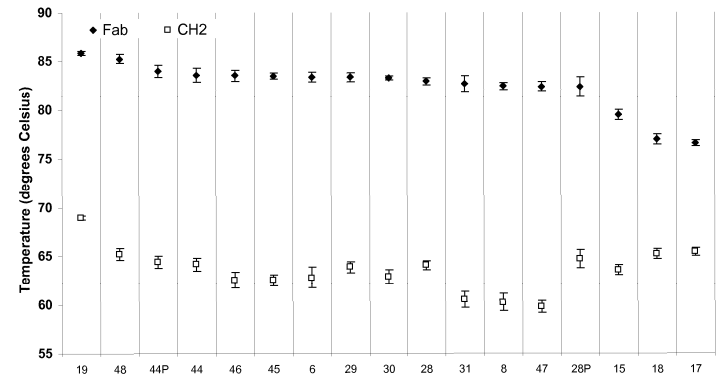
Фиг. 12



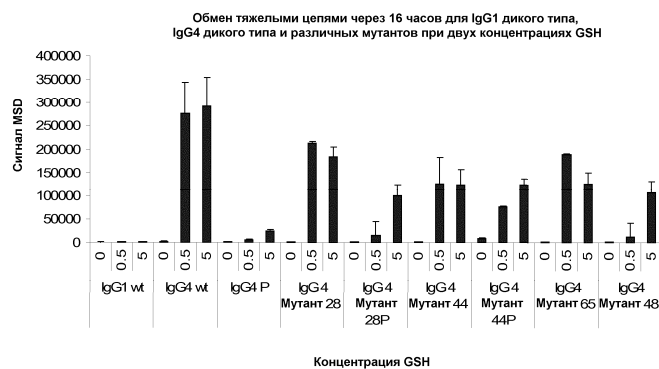
Фиг. 13



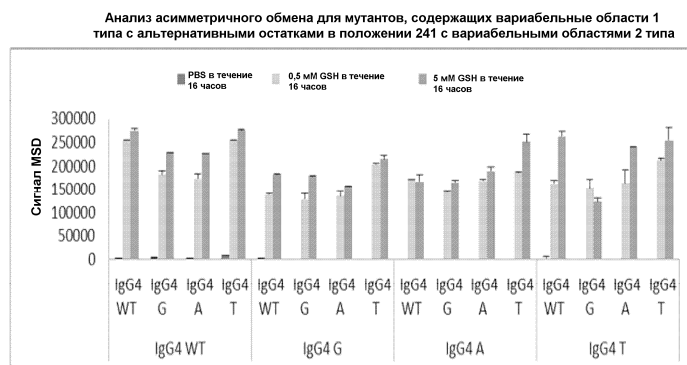
Фиг. 14



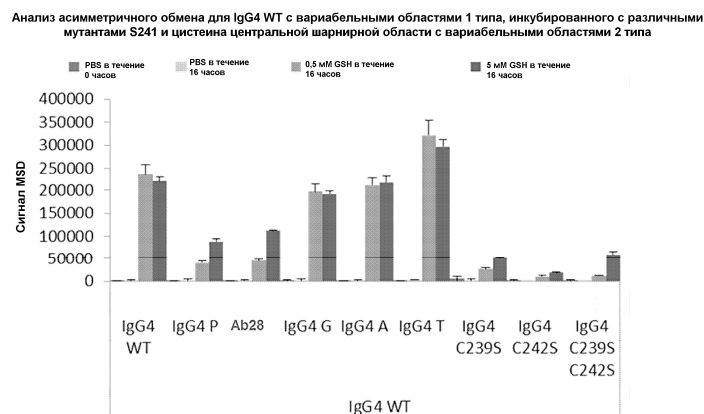
Фиг. 15



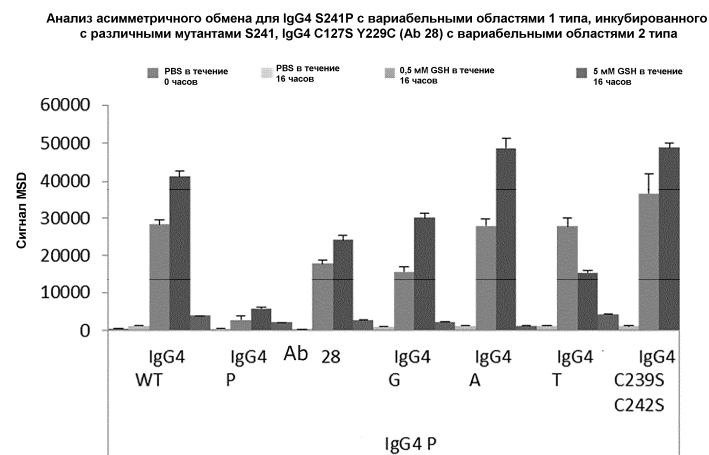
Фиг. 16



Фиг. 17

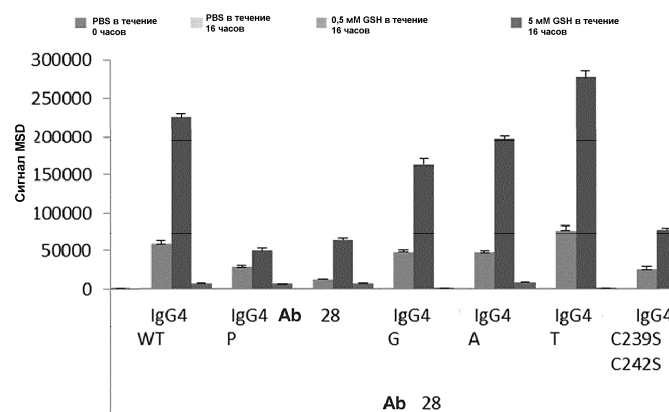


Фиг. 18



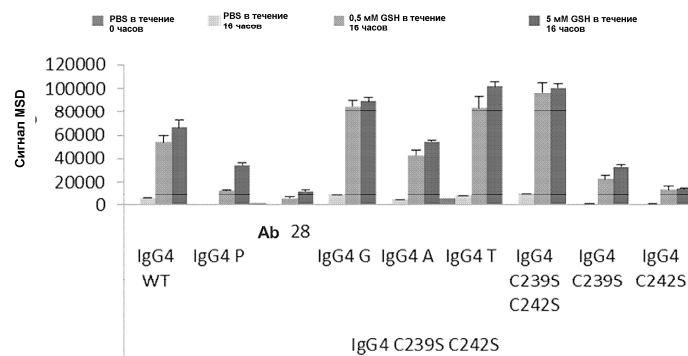
Фиг. 19

Анализ асимметричного обмена для IgG4 C127S Y229C (номер 28) с переменными областями 1 типа, инкубированного с различными мутантами S241 и IgG4 WT с переменными областями 2 типа



Фиг. 20

Анализ асимметричного обмена двойных мутантов шарнирной области с переменными областями 1 типа, инкубированных с множеством мутантов с переменными областями 2 типа



Фиг. 21



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2