

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **033766**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.11.22

(21) Номер заявки
201400568

(22) Дата подачи заявки
2012.11.09

(51) Int. Cl. **C07K 16/18** (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(54) АЛБУМИНСВЯЗЫВАЮЩИЕ АНТИТЕЛА И ИХ СВЯЗЫВАЮЩИЕ ФРАГМЕНТЫ

(31) **61/558,559**

(32) **2011.11.11**

(33) **US**

(43) **2014.12.30**

(86) **PCT/EP2012/072335**

(87) **WO 2013/068571 2013.05.16**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЮСБ БАЙОФАРМА СПРЛ (BE)

(72) Изобретатель:
**Адамс Ралф, Бхатта Паллави, Сэм
Филип Хейвуд, Хамфриз Дейвид Пол
(GB)**

(74) Представитель:
**Веселицкая И.А., Кузенкова Н.В.,
Веселицкий М.Б., Каксис Р.А.,
Белоусов Ю.В., Куликов А.В.,
Кузнецова Е.В. (RU)**

(56) **WO-A1-2011036460**

WO-A1-2010035012

WO-A2-2011006915

**LUCY J. HOLT ET AL.: "Anti-serum albumin domain antibodies for extending the half-lives of short lived drugs", PROTEIN ENGINEERING, DESIGN AND SELECTION, OXFORD JOURNAL, LONDON, GB, vol. 21, 1 January 2008 (2008-01-01), pages 283-288, XP007911765, ISSN: 1741-0126, DOI: 10.1093/PROTEIN/GZM067 [retrieved on 2008-04-02] the whole document
WO-A2-2010096418**

(57) В заявке описано связывающее сывороточный альбумин антитело или его фрагмент, содержащее/содержащий вариабельный домен тяжелой цепи, который имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, и/или содержащее/содержащий вариабельный домен легкой цепи, который имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4, в частности содержащее/содержащий вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, которые имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 3, или вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, которые имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 4. В заявке описаны также полинуклеотиды, кодирующие антитела или фрагменты, векторы, которые их содержат, и клетки-хозяева, обладающие способностью экспрессировать полинуклеотиды. В заявке описаны также фармацевтические композиции, содержащие антитела или фрагменты, и терапевтическое применение любого из них.

B1**033766****033766****B1**

Настоящее изобретение относится к новым альбуминсвязывающим антителам и их фрагментам. Указанные антитела можно применять, например, для удлинения времени полужизни в сыворотке лекарственных средств или белков, конъюгированных с ними. Описаны также способы получения указанных молекул и содержащие их фармацевтические композиции.

Высокая специфичность и аффинность антител делает их идеальными диагностическими и терапевтическими агентами, прежде всего для модуляции белка: белковых взаимодействий. Успехи в области технологии получения рекомбинантных антител позволили получать фрагменты антител, такие как Fv-, Fab-, Fab'- и F(ab')₂-фрагменты и другие фрагменты антител. Указанные молекулы меньшего размера сохраняют антигенсвязывающую активность полных антител и могут также обладать улучшенной способностью проникать в ткани и улучшенными фармакокинетическими свойствами по сравнению с полными молекулами иммуноглобулинов. Фактически фрагменты антител могут представлять собой универсальные терапевтические агенты, о чем свидетельствует успешное создание в настоящее время таких продуктов, как ReoPro® и Lucentis®. Хотя очевидно, что указанные фрагменты обладают целым рядом преимуществ по сравнению с полными иммуноглобулинами, они имеют также недостаток, которым является повышенная скорость клиренса из сыворотки, поскольку у них отсутствует Fc-домен, который обеспечивает пролонгированное время жизни *in vivo* (Medasan и др., J. Immunol. 158, 1997, сс. 2211-2217).

Средства увеличения времени полужизни фрагментов антител, таких как Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ и другие фрагменты антител, известны. Одним из подходов является конъюгация фрагмента с молекулами полимеров. Так, короткое время полужизни Fab'-, F(ab')₂-фрагментов в кровотоке животных можно удлинять путем конъюгации с полиэтиленгликолем (ПЭГ; см., например, WO 98/25791, WO 99/64460 и WO 98/37200). Другим подходом является модификация фрагмента антитела путем конъюгации с агентом, который взаимодействует с FcRn-рецептором (см., например, WO 97/34631). Еще один подход к удлинению времени полужизни заключается в применении полипептидов, которые связываются с сывороточным альбумином (см., например, Smith и др., Bioconjugate Chem. 12, 2001, сс. 750-756; EP 0486525; US 6267964; WO 04/001064; WO 02/076489 и WO 01/45746). Сывороточный альбумин представляет собой белок, очень широко распространенный как в сосудистых, так и во внесосудистых компартментах, время полужизни которого у человека составляет примерно 19 дней (Peters, Adv Protein Chem. 37, 1985, сс. 161-245). Этот показатель близок к времени полужизни IgG1, составляющему примерно 21 день (Waldeman и Strober, Progr. Allergy, 13, 1969, сс. 1-110).

Описаны связывающиеся с сывороточным альбумином единичные вариabельные домены антител, а также их применение в качестве конъюгатов для удлинения времени полужизни лекарственных средства, включая представляющие собой лекарственные средства NCE (новая химическая субстанция), белки и пептиды (см., например, Holt и др., Protein Engineering, Design & Selection, т. 21, 5, сс. 283-288, WO 04003019, WO 2008/096158, WO 05118642, WO 2006/0591056 и WO 2011/006915). Другие антитела к сывороточному альбумину и их применение в форматах мультиспецифических антител описаны в WO 2009/040562, WO 2010/035012 и WO 2011/086091. В частности, ранее описаны два вариabельных домена, обозначенных как 645gH1 и 645gL1, последовательности которых представлены в настоящем описании в SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10.

В настоящем изобретении предложены улучшенные альбуминсвязывающие антитела, выведенные из указанных последовательностей. Преимуществом антител, представленных в настоящем описании, является то, что их аффинность сопоставима с аффинностью исходного антитела, и, кроме того, они могут обладать одним или несколькими свойствами, которые позволяют применять их в терапевтическом продукте, например пониженной иммуногенностью, повышенной стабильностью, улучшенной экспрессией или т.п.

Предпочтительно антитела, предлагаемые в изобретении, связываются с человеческим сывороточным альбумином.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, связываются с сывороточным альбумином обезьян циномогус, мышинным сывороточным альбумином и/или крысиным сывороточным альбумином.

Одним из вариантов осуществления настоящего изобретения является альбуминсвязывающее антитело или его фрагмент, которое/который содержит вариabельную область тяжелой цепи, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

Одним из вариантов осуществления настоящего изобретения является альбуминсвязывающее антитело или его фрагмент, которое/который содержит вариabельную область легкой цепи, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4.

Одним из вариантов осуществления настоящего изобретения является альбуминсвязывающее антитело или его фрагмент, которое/который содержит вариabельную область тяжелой цепи, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, и вариabельную область легкой цепи, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения вариabельная область тяжелой цепи содержит цистеин в положении 44 тяжелой цепи и имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения переменная область легкой цепи содержит цистеин в положении 100 легкой цепи и имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4.

Переменные области антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, можно включать в любой приемлемый формат антитела. К указанным антителам относятся полные антитела и их функционально активные фрагменты или производные. Таким образом, указанные альбуминсвязывающие антитела могут представлять собой полные молекулы антител, имеющие полноразмерные тяжелые и легкие цепи, или их фрагменты, и могут представлять собой (но, не ограничиваясь только ими) Fab, модифицированный Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, антитела в виде единичных переменных доменов, scFv, двух-, трех- или четырехвалентные антитела, бис-scFv, димерные (диабоды), тримерные (триабоды), тетрамерные (тетрабоды), трибоды, DVD-Ig, DART, BiTE и эпитопсвязывающие фрагменты любого из указанных выше форматов (см., например, Holliger и Hudson, *Nature Biotech.* 23(9), 2005, сс. 1126-1136; Aclair и Lawson, *Drug Design Reviews - Online* 2(3), 2005, сс. 209-217). Методы создания и производства указанных фрагментов антител хорошо известны в данной области (см., например, Verma и др., *Journal of Immunological Methods*, 216, 1998, сс. 165-181). Мультивалентные антитела могут содержать несколько специфичностей или могут являться моноспецифическими (см., например, WO 92/22853, WO 99/37791 и WO 05/113605). Другие мультивалентные/мультиспецифические форматы включают форматы, описанные в WO 2009/040562, WO 2010/035012 и WO 2011/086091, в том числе Fab-Fv и Fab-dsFv, которые проиллюстрированы в настоящем описании на фиг 1А и 1Б соответственно.

Домены константных областей молекулы антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, если они присутствуют, можно выбирать, учитывая предполагаемую функцию молекулы антитела, и, в частности эффекторные функции, которые могут требоваться. Например, домены константной области могут представлять собой домены человеческого IgA, IgD, IgE, IgG или IgM. В частности, можно применять домены константной области человеческого IgG, прежде всего изотипов IgG1 и IgG3, когда требуются эффекторные функции антитела. В альтернативном варианте, когда не требуются эффекторные функции антитела, можно применять изотипы IgG2 и IgG4. Как должно быть очевидно, можно применять также варианты последовательностей указанных доменов константных областей. Например, можно применять молекулы IgG4, в которых серин в положении 241 заменен на пролин, описанные у Angal и др., *Molecular Immunology*, 30(1), 1993, сс. 105-108. Специалисту в данной области также должно быть очевидно, что антитела можно подвергать различным посттрансляционным модификациям. Тип и степень указанных модификаций часто зависят от линии клеток-хозяев, применяемой для экспрессии антитела, а также от условий культивирования. Указанные модификации могут включать вариации гликозилирования, окисления метионина, формирования дикетопиперазина, изомеризации аспартата и деаминарования аспарагина. Часто встречающейся модификацией является потеря карбоксиконцевого основного остатка (такого как лизин или аргинин) под действием карбоксипептидаз (как это описано у Harris R.J., *Journal of Chromatography* 705, 1995, сс. 129-134).

В одном из вариантов осуществления изобретения тяжелая цепь антитела содержит CH1-домен и легкая цепь антитела содержат CL-домен либо каппа-, либо лямбда-цепи.

Как должно быть очевидно, указанные альбуминсвязывающие антитела или их фрагменты можно при необходимости конъюгировать с любыми другими антителами или их фрагментами, другими белками, такими как ферменты, гормоны, цитокины, пептиды или другие молекулы или лекарственные средства. Альбуминсвязывающие антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, наиболее предпочтительно следует применять для удлинения времени полужизни в сыворотке указанных конъюгированных с ними субстанций.

В одном из примеров альбуминсвязывающее антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, связывают, ковалентно или нековалентно, с выбранным терапевтическим или диагностическим соединением. Приемлемые терапевтические соединения могут включать, например, агонисты или антагонисты рецепторов, ингибиторы ферментов, хелаторы металлов, противовирусные агенты, противогрибковые агенты, сердечно-сосудистые лекарственные средства и химиотерапевтические лекарственные средства.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения альбуминсвязывающее антитело или его фрагмент, предлагаемое/предлагаемый в настоящем изобретении, сливают или конъюгируют со вторым антителом или его фрагментом, которое/который связывается с представляющим интерес антигеном.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения представляющий интерес антиген, с которым связывается второе антитело или фрагмент антитела, может представлять собой ассоциированный с клеткой белок, например белок клеточной поверхности, находящийся на клетках, таких как бактериальные клетки, дрожжевые клетки, Т-клетки, эндотелиальные клетки или опухолевые клетки, или может представлять собой растворимый белок. Представляющие интерес антигены могут представлять собой также любые приемлемые для медицинских целей белки, такие как белки, повышающая регуляция которых имеет место в процессе болезни или инфекции, например рецепторы и/или соответствующие им лиганды. Конкретными примерами белков клеточной поверхности являются молекулы адгезии, например интегрины, такие как β 1-интегрины, например VLA-4, Е-селектин, Р-селектин или L-селектин, CD2,

CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11a, CD11b, CD18, CD19, CD20, CD23, CD25, CD33, CD38, CD40, CD45, CDW52, CD69, CD134 (OX40), ICOS, BCMP7, CD137, CD27L, CDCP1, DPCR1, дудулин2, FLJ20584, FLJ40787, HEK2, KIAA0634, KIAA0659, KIAA1246, KIAA1455, LTBP2, LTK, MAL2, MRP2, нектинподобный белок 2, NKCC1, PTK7, RAIG1, TCAM1, SC6, BCMP101, BCMP84, BCMP11, DTD, карциноэмбриональный антиген (CEA), человеческий глобулин молочного жира (HMFG1 и 2), антигены ГКГС класса I и ГКГС класса II и VEGF, и при необходимости 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-16 или IL-17, 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 опухолей- α , фактор некроза опухолей- β , колониестимулирующие факторы, такие как G-CSF или GM-CSF, и тромбоцитарные факторы роста, такие как PDGF- α и PDGF- β , и при необходимости их рецепторы. Другие антигены включают поверхностные антигены бактериальных клеток, бактериальные токсины, вирусы, такие как вирус гриппа, EBV, HerA, B и C, биотеррористические агенты, радионуклиды и тяжелые металлы, а также яды и токсин змей и пауков.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения антитело или его фрагмент можно применять для функционального изменения активности представляющего интерес антигена. Например, антитело может непосредственно или опосредованно обладать нейтрализующим, антагонистическим или агонистическим действием в отношении активности указанного антигена.

Антитело или его фрагмент, конъюгированное/конъюгированный с альбуминсвязывающим антителом, предлагаемым в настоящем изобретении, можно получать из любых видов, но предпочтительно его выводят из моноклонального антитела, полностью человеческого антитела или гуманизированного антитела. Фрагмент антитела, предназначенный для применения согласно настоящему изобретению, можно выводить из молекулы иммуноглобулина любого класса (например, IgG, IgE, IgM, IgD или IgA) или подкласса и можно получать из любых видов, включая, например, мышей, крыс, акул, кроликов, свиней, хомяков, верблюдов, лам, коз или человека.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения антитело представляет собой Fab- или Fab'-фрагмент, который является фрагментом моноклонального, полностью человеческого, гуманизированного или химерного антитела. Согласно одному из вариантов осуществления изобретения Fab- или Fab'-фрагменты антитела являются полностью человеческими или гуманизированными.

Моноклональные антитела можно получать с помощью любого метода, известного в данной области, такого как метод гибридом (Kohler и Milstein, *Nature*, 256, 1975, сс. 495-497), метод триом, метод человеческих В-клеточных гибридом (Kozbor и др., *Immunology Today*, 4, 1983, с. 72) и метод EBV-гибридом (Cole и др., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, изд-во Alan R Liss, Inc., 1985, сс. 77-96).

Антитела, предназначенные для применения согласно настоящему изобретению, можно создавать с помощью основанных на использовании антител индивидуальных лимфоцитов, путем клонирования и экспрессии кДНК переменных областей иммуноглобулинов, которые вырабатываются индивидуальными лимфоцитами, отобранными по признаку производства специфических антител, например, с помощью методов, описанных у Babcook J. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(15), 1996, сс. 7843-78481; в WO 92/02551, WO 2004/051268 и WO 2004/106377.

Гуманизированные антитела представляют собой молекулы антител из видов, кроме человека, которые имеют один или несколько гиперпеременных участков (CDR) из видов, кроме человека, и каркасный участок из молекулы человеческого иммуноглобулина (см., например, US 5585089).

Антитела, предназначенные для применения согласно настоящему изобретению, можно создавать также с помощью различных известных в данной области методов фагового дисплея, которые включают методы, описанные у Brinkman и др., *J. Immunol. Methods*, 182, 1995, сс. 41-50; Ames и др., *J. Immunol. Methods*, 184, 1995, сс. 177-186, Kettleborough и др., *Eur. J. Immunol.*, 24, 1994, сс. 952-958; Persic и др., *Gene*, 187, 1997, сс. 9-18; Burton и др., *Advances in Immunology*, 57, 1994, сс. 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; US 5223409; US 5403484; US 5580717; US 5427908; US 5750753; US 5821047; US 5571698; US 5427908; US 5516637; US 5780225; US 5658727; US 5733743 и US 5969108. Кроме того, для создания гуманизированных антител можно использовать трансгенных мышей или другие организмы, включая другие виды млекопитающих.

Полностью человеческими являются антитела, в которых переменные области и константные области (если присутствуют) как тяжелых, так и легких цепей все имеют человеческое происхождение или практически идентичны последовательностям человеческого происхождения, но необязательно получены из того же самого антитела. Примерами полностью человеческих антител могут являться антитела, полученные, например, с помощью описанных выше методов фагового дисплея, и антитела, полученные с использованием мышей, в которых мышиные гены переменных и/или константных областей иммуноглобулина заменены их человеческими копиями, например, согласно описанному, в целом, в EP 0546073 B1, US 5545806, US 5569825, US 5625126, US 5633425, US 5661016, US 5770429, EP 0438474 B1 и EP 0463151 B1.

Исходный продукт для фрагмента антитела, например Fab или Fab', предназначенного для применения согласно настоящему изобретению, можно получать из любого полного антитела, прежде всего полного моноклонального антитела, с помощью любых приемлемых методов ферментативного расщепления и/или разложения, например путем обработки пепсином. В альтернативном или дополнительном варианте исходный материал для антитела можно получать с помощью методов рекомбинантной ДНК, включающих манипуляцию и повторную экспрессию ДНК, которая кодирует переменные и/или константные области антитела. При необходимости можно применять стандартные методы молекулярной биологии для модификации, добавления или делеции аминокислот или доменов. Имеющие любые изменения переменные или константные области все еще подпадают под понятия "переменных" и "константных" областей, применяемых в контексте настоящего описания.

Исходный материал для фрагмента антитела можно получать из любых видов, включая, например, мышей, крыс, кроликов, хомяков, верблюдов, лам, коз или человека. Части фрагментов антител можно получать из более чем одного вида, например фрагменты антител могут быть химерными. В одном из примеров константные области получают из одного вида, а переменные области из другого. Исходный материал для фрагмента антитела может также быть модифицирован. В другом примере переменную область фрагмента антитела создавали с использованием методов конструирования рекомбинантной ДНК. Указанные сконструированные версии включают версии, созданные, например, из встречающихся в естественных условиях переменных областей антител с помощью инсерций, делеций или замен, затрагивающих аминокислотные последовательности встречающихся в естественных условиях антител. Конкретные примеры такого типа включают сконструированные домены переменных областей, содержащие по меньшей мере один CDR и необязательно одну или несколько аминокислот каркасного участка из одного антитела, а остальной домен переменной области из второго антитела. Методы создания и производства указанных фрагментов антител хорошо известны в данной области (см. например, Boss и др., US 4816397; Cabilly и др., US 6331415; Shrader и др., WO 92/02551; Ward и др., Nature, 341, 1989, с. 544; Orlandi и др., Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 86, 1989, с. 3833; Riechmann др., Nature, 322, 1988, с. 323; Bird и др., Science, 242, 1988, с. 423; Queen и др., US 5585089; Adair, WO 91/09967; Mountain и Adair, Biotechnol. Genet. Eng. Rev, 10, 1992, сс. 1-142; Verma и др., Journal of Immunological Methods, 216, 1998, сс. 165-181).

В одном из примеров альбуминсвязывающий переменный домен, предлагаемый в настоящем изобретении, сливают с однодоменным антителом или dAb. Единичные переменные домены, известные также как однодоменные антитела или dAb, предназначенные для применения согласно настоящему изобретению, можно создавать с помощью методов, известных в данной области, включая методы, описанные в WO 2005/118642, у Ward и др., Nature, 341, 1989, сс. 544-546 и Holt и др., Trends in Biotechnology, 21, 2003, сс. 484-490. В одном из вариантов осуществления изобретения однодоменное антитело, предназначенное для применения согласно настоящему изобретению, представляет собой переменный домен тяжелой цепи (VH) или переменный домен легкой цепи (VL). Каждый домен легкой цепи может относиться либо к каппа-, либо лямбда-подгруппе. Методы выделения доменов VH и VL описаны в данной области, см., например, EP 0368684 и Ward и др., выше. Указанные домены можно выводить из любых приемлемых видов или исходных материалов для антител. В одном из вариантов осуществления изобретения однодоменное антитело можно получать из организма грызунов, человека или других видов. В одном из вариантов осуществления изобретения однодоменное антитело является гуманизированным.

В одном из вариантов осуществления изобретения однодоменное антитело выводят из фаговой дисплейной библиотеки, используя методы, описанные, например, в WO 2005/118642, у Jespers и др., Nature Biotechnology, 22, 2004, сс. 1161-1165 и Holt и др., Trends in Biotechnology, 21, 2003, сс. 484-490. Предпочтительно указанные однодоменные антитела являются полностью человеческими, но их можно выводить также из других видов. В одном из вариантов осуществления изобретения единичный переменный домен является химерным, т.е. его каркасный участок имеет человеческое или практически человеческое происхождение, а CDR-участок(ки) имеет(ют) происхождение из видов, кроме человека. Как должно быть очевидно, последовательность однодоменного антитела после ее выделения можно модифицировать для улучшения характеристик однодоменного антитела, например растворимости, как описано у Holt и др., выше.

В контексте настоящего описания понятие "практически человеческий" подразумевает, что сохраняются человеческие особенности исходного материала, которые могут удовлетворять требованиям с позиции иммуногенности. Понятие "практически человеческий материал" может включать материал, в котором одна аминокислота в последовательности каркасного участка добавлена, удалена в результате делеции или замены другой аминокислотой.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения dAb имеет человеческую последовательность, полученную на основе дисплея scFv-фага или из трансгенных мышей линии HumouseTM или VelocimouseTM или из гуманизированных последовательностей грызунов.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения dAb получают из человеческой последовательности или гуманизированной последовательности грызунов, верблюдов или акул. Указанное dAb предпочтительно должно быть гуманизированным. В одном из примеров однодоменное антитело

представляет собой VHH-домен на основе иммуноглобулинов верблюдовых, описанных в EP 0656946. В одном из примеров верблюдов или лам иммунизируют представляющим интерес антигеном и отбирают образцы крови с соответствующим титром. Ген, кодирующий dAb, можно клонировать с использованием одноклеточной ПЦР или В-клетку(и), кодирующую(ие) dAb, можно иммортализировать путем трансформации EBV или путем слияния с клетками иммортальной линии.

В одном из примеров один или несколько переменных доменов антител, предлагаемых в настоящем изобретении, встраивают в мультвалентный формат антител согласно методу, описанному в WO 2009/040562, WO 2010/035012 или WO 2011/086091. Указанные форматы могут быть моноспецифическими, биспецифическими или триспецифическими. Таким образом, в одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения представляющие собой антитело слитые белки, предлагаемые в изобретении, представляют собой транслируемые слитые белки, т.е. генетические слияния, последовательность каждого из которых кодируется экспрессионным вектором. В альтернативном варианте компоненты представляющего собой антитело слитого белка можно сливать химическими путями, т.е. посредством химической конъюгации или химического перекрестного сшивания. Указанные химические пути известны в данной области.

Примеры указанных транслируемых слитых белков с дисульфидными мостиками и без них проиллюстрированы на фиг. 1А и 1Б.

Таким образом, одним из вариантов осуществления изобретения является представляющий собой мультиспецифическое антитело слитый белок, который содержит Fab- или Fab'-фрагмент антитела, обладающий специфичностью в отношении представляющего интерес антигена, в котором указанный фрагмент слит по меньшей мере с одной последовательностью единичного переменного домена, специфического в отношении человеческого сывороточного альбумина, имеющего последовательность (SEQ), которая представлена в SEQ ID NO: 1, 2, 3 или 4.

В одном из примеров переменные домены альбуминсвязывающих антител, предлагаемых в настоящем изобретении, сливают с фрагментами антител, такими как Fab'-фрагменты, которые несут нативную или модифицированную шарнирную область. Если фрагмент антитела, предназначенный для применения при получении указанного слитого белка, предлагаемого в изобретении, представляет собой Fab'-фрагмент, то указанный фрагмент, как правило, удлиняет С-конец тяжелой цепи на одну или несколько аминокислот. Таким образом, предлагаемое в изобретении слияние, представляющее собой антитело, может содержать Fab'-фрагмент, слитый в результате трансляции (или химически слитый) со связывающей альбумин переменной областью, непосредственно или через линкер. Кроме того, примеры приемлемых Fab'-фрагментов антител включают описанные в WO 2005/003170 и WO 2005/003171.

В другом примере фрагменты антител представляют собой Fab-фрагменты. Таким образом, предлагаемое в изобретении слияние, представляющее собой антитело, может содержать Fab-фрагмент, слитый в результате трансляции (или химически слитый) с линкерной последовательностью, которая, в свою очередь, слита в результате трансляции (или химически слита) с одной или несколькими связывающими альбумин переменными областями. Предпочтительно Fab-фрагмент представляет собой Fab-фрагмент, который заканчивается на межцепочечных остатках цистеина, что описано в WO 2005/003169.

Согласно настоящему изобретению каждый переменный домен антитела к альбумину, слитый с Fab- или Fab'-фрагментом, может быть слит непосредственно или через линкер.

В контексте настоящего описания подразумевается, что понятие "непосредственно слитый" относится к тому факту, что "последняя" аминокислота Fab или Fab' сцеплена с помощью пептидной связи с "первой" аминокислотой единичного переменного домена альбуминсвязывающего антитела, предлагаемого в настоящем изобретении (или, как очевидно, наоборот).

Примеры линкерных областей, которые можно применять для связывания переменного домена с Fab или Fab', включают (но, не ограничиваясь только ими) гибкие линкерные последовательности и жесткие линкерные последовательности. Гибкие линкерные последовательности включают описанные у Huston и др., PNAS 85, 1988, сс. 5879-5883; Wright и Deonarain, Mol. Immunol., 44(11), 2007, сс. 2860-2869; Alfthan и др., Prot. Eng., 8(7), 1995, сс. 725-731; Luo и др., J. Biochem., 118(4), 1995, сс. 825-831; Tang и др., J. Biol. Chem. 271(26), 1996, сс. 15682-15686 и у Turner и др., JMM 205, 1997, сс. 42-54 (см. репрезентативные примеры в табл. 1).

Таблица 1

Гибкие линкерные последовательности

SEQ ID NO:	Последовательность
21	SGGGGSE
22	DKTHTS
23	(S)GGGGS
24	(S)GGGSGGGGS
25	(S)GGGSGGGSGGGGS
26	(S)GGGSGGGSGGGSGGGGS
27	(S)GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
28	AAAGSG-GASAS
29	AAAGSG-XGGGS-GASAS
30	AAAGSG-XGGGSXGGGS-GASAS
31	AAAGSG- XGGGSXGGGSXGGGS-GASAS
32	AAAGSG- XGGGSXGGGSXGGGSXGGGS-GASAS
33	AAAGSG-XS-GASAS
34	PGGNRGTTRRRPATTTGSSPGPTQSHY
35	ATTTGSSPGPT
36	ATTTGS
-	GS
37	EPSPGPISTINSPPSKESHKSP
38	GTVAAPSVFIFPPSD
39	GGGGIAPSMVGGGGS
40	GGGGKVEGAGGGGGS
41	GGGGSMKSHDGGGGS
42	GGGGLITIVGGGGS
43	GGGGVVPSLPGGGGS
44	GGEKSIPGGGGS
45	RPLSYRPPFPFGFSPVRP
46	YPRSIYIRRRHPSPSLTT
47	TPSHLSHILPSFGLPTFN
48	RPVSPFTFRLSNSWLPA
49	SPA AHFPR SIPRPGPIRT
50	APGPSAPSHRSLPSRAFG
51	PRNSIHFLHPLLVAPLGA
52	MPSLSGVLQVRYLSPDDL
53	SPQYPSPLTLTPPHPSL
54	NPSLNPPSYLHRAPSRIS
55	LPWRTSLLPSLPLRRRP
56	PPLFAKGPVGLLSRSFPP
57	VPPAPVVSLRSAHARPPY
58	LRPTPRVRSYTCCPTP-
59	PNVAHVLPLLTPWDNLR
60	CNLLPLCARSPAVRTFP

(S) является необязательным в последовательностях 23-27.

Примеры жестких линкерных последовательностей включают пептидные последовательности GA-PAPAAPAPA (SEQ ID NO: 61), PPPP (SEQ ID NO: 62) и PPP.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения последовательность шарнирной области антитела или ее часть применяют в качестве линкера, например указанную выше шарнирную последовательность. Как правило, Fab'-фрагменты антитела, предназначенные для применения согласно настоящему изобретению, несут нативную или модифицированную шарнирную область. Указанные шарнирные области применяют в качестве встречающегося в естественных условиях линкера к фрагменту альбумин-связывающего варибельного домена. Нативная шарнирная область представляет собой шарнирную область, ассоциированную в норме с C_H1-доменом молекулы антитела. Модифицированная шарнирная область представляет собой любую шарнирную область, которая отличается по длине и/или составу от нативной шарнирной области. Указанные шарнирные области могут включать шарнирные области из любого другого вида, например шарнирные области человека, мышей, крыс, кроликов, хомяков, верблюдов, лам или коз. Другие модифицированные шарнирные области могут содержать полную шарнирную область, выведенную из антитела другого класса или подкласса по сравнению с C_H1-доменом. Так, например, C_H1-домен из класса γ 1 можно присоединять к шарнирной области из класса γ 4. В альтернативном варианте модифицированная шарнирная область может содержать часть встречающейся в естественных условиях шарнирной области или повторяющуюся единицу, где каждая единица в повторе выведена из встречающейся в естественных условиях шарнирной области. В следующем альтернативном варианте встречающуюся в естественных условиях шарнирную область можно изменять путем замены одного или нескольких остатков цистеина или других остатков на нейтральные остатки, такие как аланин, или путем замены находящихся в соответствующем положении остатков на остатки цистеина. С помощью таких

путей количество остатков цистеина в шарнирной области можно повышать или снижать. Помимо этого можно контролировать другие характеристики шарнирной области, такие как расстояние остатка(ов) цистеина от межцепочечной цистеина легких цепей, расстояние между остатками цистеина в шарнирной области и состав других аминокислот в шарнирной области, которые могут влиять на свойства шарнирной области, такие как гибкость, например можно включать в шарнирную область остатки глицина для повышения вращательной гибкости или можно включать остатки пролина для снижения гибкости. В альтернативном варианте в шарнирную область можно включать комбинации заряженных или гидрофобных остатков для придания способности к мультимеризации (см., например, у Richter и др., Prot. Eng. 14(10), 2001, сс. 775-783 применение заряженных или ионных "хвостов", например, кислотных "хвостов", в качестве линкеров, и у Kostelny и др., J. Immunol. 5(1), 1992, сс. 1547-1553 применение последовательностей лейциновых молний). Другие модифицированные шарнирные области могут быть полностью синтетическими и их можно создавать для обеспечения требуемых свойств, таких как длина, состав и гибкость.

К настоящему времени описан целый ряд модифицированных шарнирных областей, например, в US 5677425, US 6642356, WO 99/15549, WO 2005/003170, WO 2005/003169, WO 2005/003170, WO 98/25971 и WO 2005/003171, и они включены в настоящее описание в качестве ссылки. Указанные шарнирные области, как правило, расположены за СН1-областью, но они могут также быть включены на конец константной области фрагмента легкой каппа-цепи или лямбда-цепи (см. примеры в табл. 2).

Таблица 2

Последовательности шарнирных линкеров

SEQ ID NO:	Последовательность
63	DKTHTCAA
64	DKTHTCPPCPA
65	DKTHTCPPCPATCPPCPA
66	DKTHTCPPCPATCPPCPATCPPCPA
67	DKTHTCPPCPAGKPTLYNSLVMSDTAGTCY
68	DKTHTCPPCPAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY
69	DKTHTCCVECPCPA
70	DKTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPA
71	DKTHTCPSCPA

Вариабельные домены антител, предлагаемых в настоящем изобретении, представляют собой комплементарную VH/VL-пару, которая совместно связывает антиген, т.е. они представляют собой комплементарную VH/VL-пару, которая обладает одинаковой специфичностью связывания. Фактически они представляют собой VH/VL-пару, выведенную из одного и того же антитела.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения VH-домен сливают с С-концом константной области тяжелой цепи (СН1), а VL домен сливают с С-концом константной области легкой цепи (С-каппа или С-лямбда).

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения VH и VL связывают дисульфидным мостиком, который, вероятно, придает дополнительную стабилизацию конструкции, что может оказаться целесообразным.

Согласно одному или нескольким вариантам осуществления изобретения дисульфидный мостик между константными областями тяжелых и легких цепей, например, в Fab, например, между СН-доменом и CL- или СК-доменом, отсутствует, например, в результате замены одного или нескольких остатков цистеина, который(ые) формирует(ют) мостик. Указанный один или указанные несколько остатков цистеина может(гут) быть заменен(ы), например, остатком серина.

Согласно одному или нескольким вариантам осуществления изобретения межцепочечный дисульфидный мостик между тяжелой и легкой цепью, т.е. между СН-доменом и CL- или СК-доменом, присутствует.

Одним из примеров настоящего изобретения является представляющий собой биспецифическое антитело слитый белок, который содержит

тяжелую цепь, содержащую в направлении от N-конца первый вариабельный домен тяжелой цепи (V_{H1}), СН1-домен и второй вариабельный домен тяжелой цепи (V_{H2}),

легкую цепь, содержащую в направлении от N-конца первый вариабельный домен легкой цепи (V_{L1}), CL-домен и второй вариабельный домен легкой цепи (V_{L2}),

в котором указанные тяжелые и легкие цепи расположены так, что V_{H1} и V_{L1} образуют первый антигенсвязывающий сайт, а V_{H2} и V_{L2} образуют второй антигенсвязывающий сайт,

где антиген, связывающийся со вторым антигенсвязывающим сайтом, представляет собой человеческий сывороточный альбумин, второй вариабельный домен тяжелой цепи (V_{H2}) имеет последовательность SEQ ID NO: 1, и второй вариабельный домен легкой цепи (V_{L2}) имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения альбуминсвязывающие вариабельные области тяжелой и легкой цепей сцеплены дисульфидным мостиком. Таким образом, одним из примеров

настоящего изобретения является представляющий собой биспецифическое антитело слитый белок, который содержит

тяжелую цепь, содержащую в направлении от N-конца первый переменный домен тяжелой цепи (V_H1), $CH1$ -домен и второй переменный домен тяжелой цепи (V_H2),

легкую цепь, содержащую в направлении от N-конца первый переменный домен легкой цепи (V_L1), CL -домен и второй переменный домен легкой цепи (V_L2),

в котором указанные тяжелые и легкие цепи расположены так, что V_H1 и V_L1 образуют первый антигенсвязывающий сайт, а V_H2 и V_L2 образуют второй антигенсвязывающий сайт,

где антиген, связывающийся со вторым антигенсвязывающим сайтом, представляет собой человеческий сывороточный альбумин,

в котором второй переменный домен тяжелой цепи (V_H2) имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, и второй переменный домен легкой цепи (V_L2) имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, и

второй переменный домен тяжелой цепи (V_H2) и второй переменный домен легкой цепи (V_L2) сцеплены дисульфидным мостиком.

Одним из примеров настоящего изобретения является представляющий собой мультиспецифическое антитело слитый белок, который содержит

тяжелую цепь, содержащую в направлении от N-конца первый переменный домен тяжелой цепи (V_H1), $CH1$ -домен, второй переменный домен тяжелой цепи (V_H2) и третий переменный домен тяжелой цепи (V_H3),

легкую цепь, содержащую в направлении от N-конца первый переменный домен легкой цепи (V_L1), CL -домен, второй переменный домен легкой цепи (V_L2) и третий переменный домен легкой цепи (V_L3),

в котором указанные тяжелые и легкие цепи расположены так, что V_H1 и V_L1 образуют первый антигенсвязывающий сайт и V_H2 и V_L2 образуют второй антигенсвязывающий сайт, и V_H3 и V_L3 образуют третий антигенсвязывающий сайт,

где антиген, связывающийся со вторым или третьим антигенсвязывающим сайтом, представляет собой человеческий сывороточный альбумин, и

в котором второй или третий переменный домен тяжелой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, и второй или третий переменный домен легкой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4.

Как должно быть очевидно, между одним или несколькими доменами, указанными выше, могут присутствовать линкеры. В частности, линкер может находиться между CL и V_L2 и $CH1$ и V_H2 и, если он присутствует, то линкер может находиться между V_L2 и V_L3 и V_H2 и V_H3 . Приемлемые линкеры описаны выше. Дополнительные линкеры представлены на фиг. 2(д) и (е), SEQ ID NO: 5 и 6.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения антитело представляет собой scFv. Согласно одному из вариантов осуществления изобретения антитело представляет собой scFv, в котором переменные домены (VH и VL) сцеплены с помощью линкера, представленного в SEQ ID NO: 17.

Переменные домены антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, связываются с альбумином с аффинностью, достаточной для удлинения времени полужизни конъюгата, такого как Fab или Fab', *in vivo*. Из литературы известно связывание с альбумином с аффинностью, характеризующейся величиной, меньшей или равной 2,5 мкМ, может удлинять время полужизни *in vivo* (Nguyen A. и др., Protein Engineering, Design & Selection, 19(7), 2006, сс. 291-297). В одном из примеров пара переменных доменов антитела, предлагаемая в настоящем изобретении, характеризуется высокой аффинностью связывания, например 3 нМ (наномолярная). В одном из примеров связывание однодоменных антител с антигеном характеризуется аффинностью, находящейся в наномолярном или микромолярном диапазоне. Аффинность можно измерять с помощью любого приемлемого метода, известного в данной области, включая метод поверхностного плазмонного резонанса с использованием встречающегося в естественных условиях или рекомбинантного сывороточного альбумина.

Предпочтительно связывание альбуминсвязывающего антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, с человеческим сывороточным альбумином характеризуется аффинностью, составляющей примерно 1 мкМ или менее. Согласно одному из вариантов осуществления связывание антитела характеризуется аффинностью, составляющей примерно 500 нМ или менее. Согласно одному из вариантов осуществления связывание антитела характеризуется аффинностью, составляющей примерно 200 нМ или менее. Согласно одному из вариантов осуществления связывание антитела характеризуется аффинностью, составляющей примерно 100 нМ или менее. Согласно одному из вариантов осуществления связывание антитела характеризуется аффинностью, составляющей примерно 50 нМ или менее. Согласно одному из вариантов осуществления связывание антитела характеризуется аффинностью, составляющей примерно 20 нМ или менее. Согласно одному из вариантов осуществления связывание антитела характеризуется аффинностью, составляющей примерно 10 нМ или менее. Согласно одному из вариантов осуществления связывание антитела характеризуется аффинностью, составляющей примерно 5 нМ или менее. Согласно одному из вариантов осуществления связывание антитела характеризуется аффинностью,

составляющей примерно 2 нМ или менее. Согласно одному из вариантов осуществления связывание антитела характеризуется аффинностью, составляющей примерно 1 нМ или менее. Как должно быть очевидно, аффинность антител, предлагаемых в настоящем изобретении, можно изменять с помощью любого приемлемого метода, известного в данной области. Таким образом, настоящее изобретение относится также к вариантам молекул антител, предлагаемых в настоящем изобретении, которые обладают повышенной аффинностью к альбумину. Такие варианты можно получать с помощью различных протоколов созревания аффинности, включая мутацию CDR (Yang и др., *J. Mol. Biol.*, 254, 1995, сс. 392-403), перестановку цепи (Marks и др., *Bio/Technology*, 10, 1992, сс. 779-783), применение штаммов-мутаторов *E. coli* (Low и др., *J. Mol. Biol.*, 250, 1996, сс. 359-368), перестановку ДНК (Patten и др., *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8, 1997, сс. 724-733), фаговый дисплей (Thompson и др., *J. Mol. Biol.*, 256, 1996, сс. 77-88) и ПЦР, предназначенную для получения гибридных молекул ДНК (Cramer и др., *Nature*, 391, 1998, сс. 288-291). У Vaughan и др. (выше) обсуждены указанные методы созревания аффинности.

Настоящее изобретение относится также к выделенной последовательности ДНК, кодирующей альбуминсвязывающее антитело или слитый белок, предлагаемый в настоящем изобретении. Последовательности ДНК, предлагаемые в настоящем изобретении, могут содержать синтетическую ДНК, например, полученную с помощью химического процесса, кДНК, геномную ДНК или любую их комбинацию.

Последовательности ДНК, которые кодируют предлагаемые в изобретении слитые белки, представляющие собой антитела с двойной специфичностью, можно получать с помощью методов, известных специалистам в данной области. Например, последовательности ДНК, кодирующие часть или все фрагменты антитела, линкеры и/или dAb, можно синтезировать при необходимости из определенных последовательностей ДНК или на основе соответствующих аминокислотных последовательностей.

Для получения последовательностей ДНК, кодирующих предлагаемый в настоящем изобретении слитый белок, представляющий собой антитело с двойной специфичностью, можно применять стандартные методы молекулярной биологии. Требуемые последовательности ДНК можно синтезировать полностью или частично с использованием методов синтеза олигонуклеотидов. При необходимости можно применять сайтнаправленный мутагенез и полимеразную цепную реакцию (ПЦР).

Настоящее изобретение относится также к клонирующему или экспрессионному вектору, содержащему одну или несколько последовательностей ДНК, предлагаемых в настоящем изобретении. Таким образом, изобретение относится к клонирующему или экспрессионному вектору, содержащему одну или несколько последовательностей ДНК, которая(ые) кодирует(ют) предлагаемый в настоящем изобретении слитый белок, представляющий собой антитело с двойной специфичностью. В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения клонирующий или экспрессионный вектор содержит одну последовательность ДНК, кодирующую полный слитый белок, представляющий собой антитело с двойной специфичностью. Таким образом, клонирующий или экспрессионный вектор содержит кодирующие транскрипционные единицы ДНК в такой последовательности, чтобы в результате трансляции продуцировался слитый белок.

Фактически, как должно быть очевидно специалистам в данной области, слитый белок, предлагаемый в изобретении, может иметь альбуминсвязывающий вариабельный домен на N-конце или на С-конце, и поэтому кодирующая альбуминсвязывающий домен транскрипционная единица ДНК может быть первой или последней соответственно в последовательности ДНК, кодирующей трансляционное слияние. Таким образом, трансляционное слияние может содержать N-концевой вариабельный домен и С-концевой Fab или Fab'. Кроме того, трансляционное слияние может содержать N-концевой Fab или Fab' и С-концевой альбуминсвязывающий вариабельный домен.

Как должно быть очевидно, тяжелую цепь антитела или легкую цепь антитела или его фрагмента можно включать в один и тот же вектор или в разные векторы. Согласно одному из вариантов осуществления изобретения один вектор может нести трансляционное слияние, содержащее тяжелую цепь, а другой вектор может нести трансляционное слияние, содержащее легкую цепь.

ДНК-код фрагмента антитела, входящего в трансляционное слияние, предлагаемое в изобретении, можно включать в вектор в виде транскрипционной единицы в конфигурации, известной специалисту в данной области, например транскрипционная единица может содержать код легкой цепи, за которой расположен код тяжелой цепи или наоборот (см., в частности, Humphreys и др., *Protein Expression and Purification*, 26, 2002, сс. 309-320).

Предпочтительно вектор, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит соответствующую лидерную последовательность, такую как лидерная последовательность антитела. Такие лидерные последовательности хорошо известны в данной области.

Общие методы, с помощью которых можно конструировать векторы, методы трансфекции и методы культивирования хорошо известны специалистам в данной области. В этой связи следует упомянуть в качестве ссылки "Current Protocols in Molecular Biology", под ред. F. M. Ausubel, изд-во Wiley Interscience, New York, 1999 и руководство Maniatis Manual, опубликованное изд-м Cold Spring Harbor Publishing.

Изобретение относится также к клетке-хозяину, содержащей один или несколько клонирующих или экспрессионных векторов, которые содержат одну или несколько последовательностей ДНК, кодирующих предлагаемый в настоящем изобретении слитый белок, представляющий собой антитело с двойной

специфичностью. Любую приемлемую систему клетка-хозяин/вектор можно применять для экспрессии последовательностей ДНК, кодирующих слитый белок, представляющий собой антитело с двойной специфичностью. Можно применять бактериальные, например *E. coli*, и другие микробные системы или можно применять также эукариотические системы, например можно применять экспрессионные системы на основе клеток-хозяев млекопитающих. Приемлемые клетки-хозяева из млекопитающих включают клетки NS0, CHO, миеломы или гибридомы. Таким образом, согласно одному из вариантов осуществления изобретения слитый белок, предлагаемый в настоящем изобретении, экспрессируют в *E. coli*. Согласно другому варианту осуществления изобретения слитый белок, предлагаемый в настоящем изобретении, экспрессируют в клетках млекопитающих.

Настоящее изобретение относится также к способу получения альбуминсвязывающего антитела или слитого белка, заключающемуся в том, что культивируют клетку-хозяина, содержащую вектор, предлагаемый в настоящем изобретении, в условиях, пригодных для запуска экспрессии белка с последовательности ДНК, которая кодирует указанное альбуминсвязывающее антитело. Изобретение относится также к способам выделения альбуминсвязывающего антитела.

После получения альбуминсвязывающего антитела, предлагаемое в настоящем изобретении, при необходимости можно очищать, используя любой приемлемый метод, известный в данной области. Например, можно применять (но, не ограничиваясь только ими) хроматографические методы, такие как ионообменная хроматография, гель-фильтрация, хроматография на белке G или основанная на гидрофобном взаимодействии хроматография.

Размер антитела или представляющего собой антитело слитого белка можно подтверждать общепринятыми методами, известными в данной области, такими как гель-фильтрация и ДСН-ПААГ в невосстанавливающих условиях. Указанные методики можно применять, например, для подтверждения того, что белок не димеризован и/или не в нем не имеет место потеря участка. Если обнаружены димеры, а требуется гомогенный мономерный продукт, то мономерный представляющий собой антитело слитый белок можно очищать от димерных видов с помощью общепринятых хроматографических методик, описанных выше. Согласно настоящему изобретению применение усовершенствованных переменных областей, представленных в SEQ ID NO: 1-4, позволяет получать продукт с большим содержанием мономеров.

Антитела, конъюгаты и слитые белки, предлагаемые в изобретении, можно применять для лечения заболеваний или нарушений, таких как воспалительные заболевания и нарушение, иммунное заболевание и нарушение, фиброзные нарушения и различные виды рака.

Под понятие "воспалительное заболевание" или "нарушение" и "иммунное заболевание или нарушение" подпадают ревматоидный артрит, псориатический артрит, болезнь Стилла, болезнь Макла-Уэльса, псориаз, болезнь Крона, неспецифический язвенный колит, SLE (системная красная волчанка), астма, аллергический ринит, атопический дерматит, рассеянный склероз, васкулит, сахарный диабет типа I, трансплантация и болезнь "трансплантат против хозяина".

Под понятие "фиброзное нарушение" подпадают идиопатический легочный фиброз (IPF), системный склероз (или склеродерма), фиброз почки, диабетическая нефропатия, IgA-нефропатия, гипертония, конечная стадия болезни почек, перитонеальный фиброз (постоянный амбулаторный перитонеальный диализ), цирроз печени, возрастная дегенерация желтого пятна (ARMD), ретинопатия, реактивный сердечный фиброз, рубцевание, келоиды, ожоги, кожные язвы, пластическая операция на сосудах, операция по коронарному шунтированию, артропластика и операция по удалению катаракты.

Под понятие "рак" подпадают злокачественные новообразования, возникающие из эпителия, присутствующие в коже или наиболее часто в выстилке органов тела, например в: молочной железе, яичнике, предстательной железе, легком, почке, поджелудочной железе, желудке, мочевом пузыре или кишечнике. У рака имеется тенденция к проникновению в соседнюю ткань и распространению (метастазы) в отдаленные органы, например в кость, печень, легкое или головной мозг.

Таким образом, следующим объектом изобретения является фармацевтическая композиция, которая содержит антитело, слияние или конъюгат антитела, предлагаемое/предлагаемый в изобретении, в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями, эксципиентами или разбавителями. Также предложено применение представляющего собой антитело слитого белка, предлагаемого в изобретении, для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения заболевания или нарушения. Наиболее предпочтительно заболевание или нарушение представляет собой воспалительное заболевание или нарушение.

Фармацевтические композиции, предлагаемые в изобретении, могут иметь форму, пригодную для орального, трансбуккального, парентерального, подкожного, назального, местного, офтальмического или ректального введения, или форму, пригодную для введения путем ингаляции или инсуффляции.

При необходимости, например, если однодоменное антитело или антитела представляющего собой антитело слитого белка связывается(ются) с альбумином, то может потребоваться предварительно приготовить слитый белок с двойной специфичностью в сочетании с человеческим или рекомбинантным сывороточным альбумином с помощью пригодного метода, известного в данной области.

Если фармацевтическая препаративная форма является жидкой, например представляет собой рас-

твор или суспензию, то препаративная форма может содержать также альбумин, например человеческий сывороточный альбумин, в частности рекомбинантный альбумин, такой как рекомбинантный человеческий сывороточный альбумин. Приемлемые количества могут составлять менее 2 мас.% в пересчете на всю препаративную форму, в частности менее 1, 0,5 или 0,1 мас.%. Это может способствовать стабилизации представляющего собой антитело компонента в препаративной форме. Фармацевтическая композиция может быть лиофилизирована для последующего восстановления с помощью водного растворителя.

Одним из вариантов осуществления изобретения является содержащий стандартную дозу контейнер, такой как пузырек, содержащий лиофилизированное "антитело", предлагаемое в изобретении.

Предназначенные для орального введения фармацевтические композиции могут иметь форму, например, таблеток, лепешек или капсул, приготовленных с помощью общепринятых методов в сочетании с фармацевтически приемлемыми эксципиентами, такими как связующие вещества (например, предварительно желатизированный кукурузный крахмал, поливинилпирролидон или гидроксипропилметилцеллюлоза); наполнители (например, лактоза, микрокристаллическая целлюлоза или вторичный кислый фосфат кальция); замасливатели (например, стеарат магния, тальк или кремнезем); разрыхлители (например, картофельный крахмал или гликолят натрия) или смачивающие агенты (например, натрийлаурилсульфат). На таблетки можно наносить покрытие с помощью методов, хорошо известных в данной области. Жидкие препараты, предлагаемые для орального введения, могут иметь форму, например, растворов, сиропов или суспензий, или они могут присутствовать в виде сухого продукта, предназначенного для восстановления водой или другим приемлемым ранее указанным наполнителем. Указанные жидкие препараты можно получать общепринятыми путями с использованием фармацевтически приемлемых добавок, таких как суспендирующие агенты, эмульгаторы, неводные наполнители или консерванты. Препараты могут также при необходимости содержать забуферивающие соли, корригенты, красители или подслащивающие вещества.

Препараты для орального введения можно приготавливать в форме с контролируемым высвобождением действующего вещества.

Предназначенные для трансбуккального введения композиции могут иметь форму таблеток или лепешек, приготовленных общепринятым образом.

Антитела, слияние и/или конъюгаты, предлагаемые в изобретении, можно приготавливать для парентерального введения путем инъекции, например болюсной инъекции или инфузии. Предназначенные для инъекции препаративные формы могут присутствовать в виде стандартной дозы лекарственного средства, например, в стеклянных ампулах или мультидозовых контейнерах, например стеклянных пузырьках. Предназначенные для инъекции композиции могут иметь такие формы, как суспензии, растворы или эмульсии в маслянистых или водных наполнителях, и могут содержать предназначенные для приготовления препаративной формы агенты, такие как суспендирующие, стабилизирующие агенты, консерванты и/или диспергирующие агенты. Альтернативно этому, действующее вещество может находиться в порошкообразной форме, предназначенной для восстановления перед применением с помощью приемлемого наполнителя, например стерильной свободной от пирогенов воды.

Помимо описанных выше препаративных форм антитела, предлагаемые в изобретении, можно приготавливать в форме препаратов в виде депо. Указанные препаративные формы длительного действия можно вводить путем имплантации или путем внутримышечной инъекции.

Для назального введения или введения путем ингаляции соединения, предлагаемые в настоящем изобретении, может оказаться удобным вводить в форме аэрозольного спрея, входящего в находящиеся под давлением упаковки или распылитель, с использованием приемлемого пропеллента, например дихлордифторметана, фтортрихлорметана, дихлортетрафторэтана, диоксида углерода или другого пригодного газа или смеси газов.

При необходимости композиции могут присутствовать в упаковке или диспенсерном устройстве, которое может содержать одну или несколько стандартных доз лекарственного средства, включающих действующее вещество. Упаковка или диспенсерное устройство может быть снабжено инструкциями по применению.

Для местного применения соединения, предлагаемые в настоящем изобретении, может оказаться удобным приготавливать в форме приемлемой мази, содержащей действующее вещество, суспендированное или растворенное в одном или нескольких фармацевтически приемлемых носителях. Конкретными носителями являются, например, минеральное масло, жидкий вазелин, пропиленгликоль, полиоксипропилен, полиоксипропилен, эмульгирующий воск и вода. Альтернативно этому, соединения, предлагаемые в настоящем изобретении, можно приготавливать в форме приемлемого лосьона, который содержит действующее вещество, суспендированное или растворенное в одном или нескольких фармацевтически приемлемых носителях. Конкретными носителями являются, например, минеральное масло, сорбитанмоностеарат, полисорбат 60, сложные цетиловые эфиры воска, цетеариловый спирт, бензиловый спирт, 2-октилдодеканол и вода.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения препаративная форма представляет собой препаративную форму для местного применения, включая ингаляцию.

Приемлемые предназначенные для ингаляции препараты включают порошки для ингаляций, аэрозоли с дозирующим устройством, содержащие газы-пропелленты, или растворы для ингаляций без газообразных пропеллентов. Предлагаемые в настоящем изобретении порошки для ингаляций, содержащие действующее вещество, могут состоять только из вышеуказанных действующих веществ или смеси вышеуказанных действующих веществ с физиологически приемлемым эксципиентом.

Указанные порошки для ингаляций могут включать моносахариды (например, глюкозу или арабинозу), дисахариды (например, лактозу, сахарозу, мальтозу), олиго- и полисахариды (например, декстраны), многоатомные спирты (например, сорбит, маннит, ксилит), соли (например, хлорид натрия, карбонат кальция) или их смеси друг с другом. Предпочтительно применяют моно- или дисахариды, в частности лактозу или глюкозу можно применять (но, не ограничиваясь только указанным) в форме их гидратов.

Для отложения частиц в легких требуется, чтобы размер частиц составлял менее 10 мкм, в том числе 1-9 мкм, например от 0,1 до 5 мкм, в частности от 1 до 5 мкм. Наиболее важным является размер частиц действующего вещества (такого как антитело или его фрагмент).

Газы-пропелленты, которые можно применять для приготовления предназначенных для ингаляции аэрозолей, хорошо известны в данной области. Приемлемые газы-пропелленты выбирают из углеводородов, таких как н-пропан, н-бутан или изобутан, и галогенуглеводородов, таких как хлорированные и/или фторированные производные метана, этана, пропана, бутана, циклопропана или циклобутана. Вышеуказанные газы-пропелленты можно применять индивидуально или в виде их смесей.

Наиболее предпочтительными газами-пропеллентами являются галогенированные алкановые производные, выбранные из TG 11, TG 12, TG 134a и TG227. Из вышеуказанных галогенированных углеводородов наиболее предпочтительными являются TG134a (1,1,1,2-тетрафторэтан) и TG227 (1,1,1,2,3,3,3-гептафторпропан), а также их смеси.

Предназначенные для ингаляции аэрозоли, содержащие газ-пропеллент, могут содержать также другие ингредиенты, такие как сорастворители, стабилизаторы, поверхностно-активные вещества (детергенты), антиоксиданты, замасливатели и агенты для регулирования значения pH. Все указанные ингредиенты известны в данной области.

Предлагаемые в изобретении аэрозоли, содержащие газ-пропеллент, которые предназначены для ингаляции, могут содержать действующее вещество в концентрации вплоть до 5 мас.%. Аэрозоли, предлагаемые в изобретении, содержат например, действующее вещество в концентрации 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.%.

Альтернативно этому для местного внесения в легкое можно применять также препаративную форму в виде жидкого раствора или суспензии, например, с использованием такого устройства, как распылитель, например распылитель, соединенный с компрессором (например, распылитель Pari LC-Jet Plus(R), соединенный с компрессором Pari Master(R), изготовленный на фирме Pari Respiratory Equipment, Inc., Ричмонд, шт. Вирджиния).

Различные форматы антитела, предлагаемого в изобретении, можно вводить в виде дисперсии в растворителе, например в форме раствора или суспензии. Его можно суспендировать в соответствующем физиологическом растворе, например соляном растворе или другом фармакологически приемлемом растворителе, или забуференном растворе. Забуференные растворы, известные в данной области, могут содержать динатрия эдетат в количестве от 0,05 до 0,15 мг, NaCl в количестве от 8,0 до 9,0 мг, полисорбат в количестве от 0,15 до 0,25 мг, безводную лимонную кислоту в количестве от 0,25 до 0,30 мг и цитрат натрия в количестве от 0,45 до 0,55 мг на 1 мл воды, при этом значение pH составляет примерно от 4,0 до 5,0. Можно применять, например, суспензию лиофилизированного антитела.

Препаративные формы терапевтических суспензий или растворов могут содержать также 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), ЭДТК, хлорид натрия, липосомы, маннит, сорбит и глицерин. Растворы или суспензии можно капсулировать в липосомы или биоразлагаемые микросферы. Препаративную форму следует, как правило, получать в практически стерильной форме с использованием стерильных процессов изготовления.

Они могут включать получение и стерилизацию фильтрацией забуференного растворителя/раствора, применяемого в препаративной форме, асептическое суспендирование антитела в стерильном забуференном растворителе/растворе и диспергирование препаративной формы в стерильных емкостях с использованием методов, известных обычным специалистам в данной области.

Распыляемую препаративную форму, представленную в настоящем описании, можно готовить, например, в виде единичных стандартных доз (например, в запечатанных пластиковых контейнерах или флаконах), упакованных в оболочку из фольги. Каждый флакон содержит стандартную дозу в объеме, например, 2 мл, в растворителе/забуференном растворе.

Различные форматы антител, указанных в настоящем описании, можно вводить с помощью распыления.

Для офтальмического применения соединения, предлагаемые в настоящем изобретении, может ока-

заться удобным приготавливать в форме микронизированных суспензий в изотоническом с отрегулированным значением pH стерильном соляном растворе с добавлением консерванта, такого как бактерицидный или фунгицидный агент, например нитрат фенилртути, бензалконийхлорид или ацетат хлоргексидина, или без консерванта. Альтернативно этому, для офтальмического применения соединения можно приготавливать в форме мази, такой как вазелин.

Для ректального применения соединения, предлагаемые в настоящем изобретении, может оказаться удобным приготавливать в форме суппозитория. Их можно приготавливать путем смешения действующего вещества с приемлемым не вызывающим раздражения эксципиентом, который является твердым при комнатной температуре, но расплавляется в прямой кишке с высвобождением активного компонента. Указанные продукты включают, например, кокосовое масло, пчелиный воск и полиэтиленгликоли.

Количество соединения, предлагаемого в изобретении, которое требуется для профилактики или лечения конкретного состояния, должно варьироваться в зависимости от выбранного соединения и состояния пациента, подлежащего лечению. Однако, как правило, суточные дозы могут варьировать от примерно 10 нг/кг до 1000 мг/кг, как правило, от 100 нг/кг до 100 мг/кг, например примерно от 0,01 до 40 мг/кг веса тела при оральном или трансбуккальном введении, примерно от 10 нг/кг до 50 мг/кг веса тела при парентеральном введении и от примерно 0,05 до примерно 1000 мг, например от примерно 0,5 до примерно 1000 мг при назальном введении или введении путем ингаляции или инсуффляции.

Предпочтительные отличительные признаки каждого варианта осуществления изобретения являются такими же, как для каждого из других вариантов осуществления изобретения с соответствующими изменениями. Все публикации, включая (но, не ограничиваясь только ими) патенты и заявки на патент, процитированные в настоящем описании, включены в него в качестве ссылки так, если бы каждая индивидуальная публикация полностью была специально и индивидуально включена в настоящее описание в качестве ссылки.

Следует иметь в виду, что в контексте настоящего описания под понятием "содержащий" подразумевается также "включающий".

Варианты осуществления изобретения можно объединять, если это технически возможно.

Указанные в настоящем описании варианты осуществления изобретения содержат определенные отличительные признаки/элементы. Описание распространяется также на отдельные варианты осуществления изобретения, которые состоят или в основном состоят из указанных отличительных признаков/элементов.

Ниже настоящее изобретение дополнительно описано с помощью примеров, которые даны только с целью иллюстрации и никоим образом не ограничивают объем настоящего изобретения.

Перечень чертежей:

На чертежах показаны:

на фиг. 1 А- схематичное изображение Fab-Fv;

на фиг. 1Б- схематичное изображение Fab-dsFv;

на фиг. 2-5 - последовательности, предлагаемые в настоящем изобретении;

на фиг. 6 - данные о связывании меченой с помощью AlexaFluor 488 конструкции Fab-dsFv A26 с активированными человеческими CD4⁺OX40⁺-Т-клетками;

на фиг. 7 - данные о титрах (в мкг/мл) конструкций антител, полученных при кратковременной экспрессии в НЕК293-клетках;

на фиг. 8 - результаты анализа с помощью ДСН-ПААГ стабилизированных дисульфидными мостиками Fab scFv;

на фиг. 9 - объединенные в таблицу данные об аффинности связывания с человеческим сывороточным альбумином различных конструкций;

на фиг. 10 - объединенные в таблицу данные об аффинности связывания с антигеном Fab различных конструкций;

на фиг. 11 - данные о титрах (в мкг/мл) конструкций антител, полученных при кратковременной экспрессии в СНО-клетках;

на фиг. 12 - результаты анализа с помощью ДСН-ПААГ различных конструкций;

на фиг. 13 - данные о термостабильности различных конструкций, экспрессируемых в СНО-клетках.

Манипуляции с ДНК и общие методы.

Для трансформаций использовали компетентные штаммы *E. coli* и стандартные методы их культивирования. Ферменты, осуществляющие рестрикцию и модификацию ДНК, получали от фирм Roche Diagnostics Ltd. и New England Biolabs. Для получения препаратов плазмид использовали наборы для очистки плазмид Maxi Plasmid (фирма QIAGEN, каталожный № 12165). Реакции секвенирования ДНК осуществляли с помощью набора для секвенирования с использованием терминирующих реакций ABI Prism Big Dye (каталожный № 4304149) и осуществляя процесс с помощью автоматического секвенатора (фирма Applied Biosystems). Данные анализировали с использованием программы Sequencher (фирма Genecodes). Олигонуклеотиды получали от фирмы Sigma или Invitrogen. Гены, кодирующие исходные последовательности V-области, конструировали путем автоматического синтеза с помощью DNA2.0 и

модифицировали для создания трансплантированных версий с помощью сайтнаправленного мутагенеза с использованием олигонуклеотидов. Концентрацию Fab-Fv определяли, используя метод ЖХВР на основе белка G.

Пример 1. Создание и анализ различных гуманизированных трансплантатов антитела 645 в A26Fab-645dsFv.

Ранее были описаны Fab-dsFv-формат антител (фиг. 1Б) и гуманизированное антитело к альбумину, обозначенное как "645gH1gL1" в WO 2010/035012. Ранее авторы настоящего изобретения описали также создание гуманизированного антагонистического антитела к OX40, обозначенного как "A26" в WO 2010/096418. Было описано создание нового улучшенного гуманизированного трансплантата антитела "645", обозначенного как 645dsgH5gL4, и создание молекулы антитела Fab-dsFv, включающей указанный трансплантат, встроенный в Fv-компонент, и варибельные области "A26", встроенные в Fab-компонент.

Последовательности 645gH1 и gL1 представлены на фиг. 3(а) и (б), SEQ ID NO: 9 и 10.

Конструирование плазмид A26Fab-645dsFv(gH1gL1) и A26Fab-645dsFv(gH5gL4).

Общую кодирующую область легкой цепи A26Fab-645dsFv(gL1) (SEQ ID NO: 12) клонировали в экспрессионном векторе млекопитающих фирмы UCB под контролем промотора HCMV-MIE и полиА-последовательности. Варибельную область легкой цепи 645dsFv(gL1) (SEQ ID NO: 10) мутировали с получением 645dsFv(gL4) (SEQ ID NO: 4) с использованием метода перекрывающей ПЦР. Общую кодирующую область тяжелой цепи A26Fab-645dsFv(gH1) (SEQ ID NO: 11) клонировали в экспрессионном векторе млекопитающих фирмы UCB под контролем промотора HCMV-MIE и полиА-последовательности. Варибельную область тяжелой цепи 645dsFv(gH1) (SEQ ID NO: 9) мутировали с получением 645dsFv(gH5) (SEQ ID NO: 2) с использованием метода перекрывающей ПЦР. Правильность конструкций подтверждали секвенированием.

Экспрессия в клетках млекопитающих A26Fab-645dsFv(gH1gL1) и A26Fab-645dsFv(gH5gL4).

Клетки линии HEK293 трансфектировали несущими тяжелую и легкую цепи плазмидами, используя реагент для трансфекции фирмы Invitrogen 293fectin, согласно инструкциям производителя. В целом, метод состоял в следующем: 25 мкг плазмиды тяжелой цепи и 25 мкг плазмиды легкой цепи инкубировали с 100 мкл 293fectin и 1700 мкл среды Optipro в течение 20 мин при КТ. Затем смесь добавляли к 50×10^6 HEK293-клеток в 50 мл суспензии и инкубировали в течение 6 дней при встряхивании при 37°C. Через 6 дней супернатант собирали центрифугированием при 1500×g в течение 10 мин для удаления клеток и затем стерилизовали фильтрацией через фильтры с размером пор 0,22 мкм.

Очистка на белке G A26Fab-645dsFv(gH1gL1) и A26Fab-645dsFv(gH5gL4).

Примерно 50 мл супернатантов после фильтрации через фильтры с размером пор 0,22 мкм концентрировали до объема ~2 мл, используя концентраторы типа Amicon Ultra-15 с мембранами, верхняя граница отсекающей молекулярной массы которых составляла 10 кДа, и центрифугировали при 4000×g в качающемся роторе. 1,8 мл концентрированного супернатанта вносили со скоростью 1 мл/мин на 1-мл колонку, заполненную сефарозой Gammabind Plus (фирма GE Healthcare), уравновешенную 20 мМ фосфатом, 40 мМ NaCl, pH 7,4. Колонку отмывали 20 мМ фосфатом, 40 мМ NaCl, pH 7,4, и связанный продукт элюировали 0,1 М глицином/HCl, pH 2,7. Пиковую фракцию элюции собирали, и доводили значение pH до ~7 с помощью 2 М Трис/HCl, pH 8,5. Элюированную фракцию с отрегулированным значением pH концентрировали и подвергали диафильтрации в 20 мМ фосфате, 150 мМ NaCl, pH 7,4, используя концентраторы типа Amicon Ultra-15 с мембранами, верхняя граница отсекающей молекулярной массы которых составляла 10 кДа, и центрифугировали при 4000×g в качающемся роторе до получения конечного объема ~0,3 мл.

Анализ методом гель-фильтрации A26Fab-645dsFv(gH1gL1) и A26Fab-645dsFv(gH5gL4).

Очищенные на белке G образцы анализировали с помощью ЖХВР-гель-фильтрации. Образцы разделяли на колонке с супердекс 200 10/300 GL Tricorn (фирма GE Healthcare), используя изократический градиент 3ФР, pH 7,4 со скоростью 1 мл/мин. Обнаруженный пик находился при 280 нм, и кажущуюся молекулярную массу относительно объема элюции рассчитывали путем сравнения со стандартной кривой для белков с известными молекулярными массами. Изменение гуманизированного трансплантата 645dsFv от gH1g1 к gH5gL4 приводило к повышению процентного содержания мономеров экспрессированной конструкции A26Fab-645dsFv с 59 до 71%, т.е. увеличение на 12%, без какого-либо изменения термической стабильности dsFv (данные не представлены) или аффинности связывания dsFv с ЧСА (человеческий сывороточный альбумин (данные не представлены)).

Пример 2.

2.1. BIAcore-анализ кинетики связывания A26 Fab-dsFv (645gH5gL4) с OX40.

Применяемая в этом и во всех последующих примерах конструкция A26 Fab-dsFv 645gH5gL4 имела последовательность тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 7 (фиг. 2(ж)), и последовательность легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 8 (фиг. 2(з)), т.е. тяжелая цепь включала линкер G4S, G4T, G4S, представленный в SEQ ID NO: 5, см. фиг. 2(д).

BIA (молекулярный анализ взаимодействия, разработанный фирмой BIAcore (Biomolecular Interaction Analysis)), осуществляли с помощью устройства BIAcore T200 (фирма GE Healthcare). Affinipure

F(ab')₂-фрагмент козьего антитела к человеческому IgG, специфический в отношении F(ab')₂-фрагмента (фирма Jackson ImmunoResearch), иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 посредством аминного сочетания до достижения уровня захвата ≈5000 единиц ответа (RU). В качестве подвижного буфера применяли HBS-EP-буфер (10 mM HEPES, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM ЭДТК, 0,05% сурфактанта P20, фирма GE Healthcare) со скоростью потока 10 мкл/мин. Для захвата иммобилизованным антителом к человеческому IgG-F(ab')₂ инъецировали по 10 мкл A26 Fab' в концентрации 0,5 мкг/мл или A26Fab-dsFv в концентрации 1 мкг/мл. Человеческий OX40 титровали относительно захваченного A26 в различных концентрациях (от 25 до 1,5625 нМ) со скоростью потока 30 мкл/мин. Поверхность регенерировали, используя инъекции ×10 мкл 50 mM HCl с последующей инъекцией 5 мкл 5 mM NaOH со скоростью потока 10 мкл/мин. Кривые связывания после вычитания фона анализировали с помощью программы T200evaluation (версия 1.0) согласно стандартным процедурам. Кинетические параметры определяли, используя алгоритм аппроксимации.

Образец	Ka (1/Мс)	Kd (1/с)	KD (М)	KD (нМ)
Fab'	2,18 ± 0,38 E+05	1,00 E-05	4,68E-11	46,8
Fab-Fv	2,55 ± 0,35 E+05	1,04 E-05	4,12E-11	41,2

Среднее по 4 определениям.

2.2. BIAcore-анализ кинетики связывания A26 Fab-dsFv (645gH5gL4) с альбумином.

BIA (молекулярный анализ взаимодействия, разработанный фирмой BIAcore) осуществляли с помощью устройства BIAcore T200 (фирма GE Healthcare). Afflnipure F(ab')₂-фрагмент козьего антитела к человеческому IgG, специфический в отношении F(ab')₂-фрагмента (фирма Jackson ImmunoResearch), иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 посредством аминного сочетания до достижения уровня захвата ≈5000 единиц ответа (RU). В качестве подвижного буфера применяли HBS-EP-буфер (10 mM HEPES, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM ЭДТК, 0,05% сурфактанта P20, фирма GE Healthcare) со скоростью потока 10 мкл/мин. Для захвата иммобилизованным антителом к человеческому IgG-F(ab')₂ инъецировали 10 мкл Fab-Fv в концентрации 0,75 мкг/мл. Человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), мышинный сывороточный альбумин (МСА) и сывороточный альбумин обезьян циномолгус (ЦСА) титровали относительно захваченного Fab-Fv в различных концентрациях (от 50 до 6,25 нМ) со скоростью потока 30 мкл/мин. Поверхность регенерировали, используя инъекции 2×10 мкл 50 mM HCl, с последующей инъекцией 5 мкл 5 mM NaOH со скоростью потока 10 мкл/мин. Кривые связывания после вычитания фона анализировали с помощью программы T200evaluation (версия 1.0) согласно стандартным процедурам. Кинетические параметры определяли, используя алгоритм аппроксимации.

Образец	Ka (1/Мс)	Kd (1/с)	KD (М)	KD (нМ)
ЧСА	5,84 E+04	1,63 E-04	2,93E-09	2,93
МСА	8,86 E+04	3,68 E-04	4,16E-09	4,16
ЦСА	7,1 E+04	1,89 E-04	2,66E-09	2,66

Среднее по 3 определениям.

2.3. Демонстрация одновременного связывания A26 Fab-dsFv(645gH5gL4) с OX40 и альбумином.

Оценивали одновременное связывание человеческого OX40 и человеческого сывороточного альбумина с A26 Fab-dsFv. Конструкцию A26 Fab-dsFv иммобилизовали на поверхности сенсорного чипа согласно методу BIAcore-анализа кинетики связывания A26 Fab-dsFv с альбумином. 50нМ ЧСА, 25 нМ OX40 или содержащий смесь раствор с конечной концентрацией ЧСА 50 нМ и OX40 25 нМ титровали по отдельности относительно захваченной конструкции A26 Fab-dsFv. Результат связывания при использовании раствора, содержащего комбинацию ЧСА/OX40, оказался эквивалентным сумме результатов, полученных при независимых инъекциях. Это подтверждает, что Fab-dsFv обладает способностью одновременно связываться как с человеческим OX40, так и с ЧСА.

Образец	Аналит	Связывание (RU)	
A26 Fab-Fv	hOX40	25	
	ЧСА	9	
	hOX40 + ЧСА	35	(34)

2.4. Проведенный на клетках анализ аффинности A26 Fab-dsFv (645gH5gL4).

Методы.

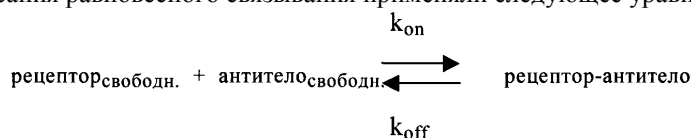
Связывание A26 Fab-Fv с человеческими активированными CD4⁺OX40⁺-Т-клетками.

РВМС выделяли путем разделения в градиенте фикола и активировали с помощью 4 мкг/мл ФГА-Л в течение 3 дней при 37°C, 5% CO₂, 100% относительной влажности. CD4⁺-Т-клетки выделяли методом негативной селекции, используя магнитные гранулы (набор II для выделения CD4⁺-Т-клеток человека; фирма Miltenyi Biotec). Приблизительно 1×10⁵ клеток инкубировали в присутствии антитела либо в Facs-буфере (3ФР/0,2% БСА/0,09% NaN₃), либо в Facs-буфере, дополненном 5% ЧСА, при 4°C. Конечная концентрация антитела составляла от 48 до 0,0005 нМ. Клетки отмывали в 3ФР перед анализом на основе проточной цитометрии, которую осуществляли с помощью устройства FACScalibur (фирма Becton Dickinson). Два набора данных по титрованию получали с использованием обеих буферных сред, для одного

применяли A26 Fab-dsFv, а для другого - служащее в качестве несоответствующего контроля Fab-Fv для определения неспецифического связывания. Количество связанного антитела (в молях) рассчитывали, используя интерполированные величины, полученные с помощью стандартной кривой, которую создавали с применением гранул, содержащих различные, но известные количества флуоресцентного красителя. Геометрические средние величины флуоресценции определяли в проведенных методом проточной цитометрии анализах клеток и гранул. Величину неспецифического связывания вычитали из величин, полученных с использованием A26 Fab-dsFv, и таким образом получали кривую, описывающую специфическое связывание, анализируя нелинейную регрессию с использованием уравнения односайтового связывания (Graphpad Prism®) для определения K_D .

Для определения аффинности A26 Fab-dsFv к экспрессируемому на клеточной поверхности антигену осуществляли эксперименты по связыванию в условиях насыщения с использованием активированных $CD4^+OX40^+$ -Т-клеток и меченой с помощью Alexa Fluor 488 конструкции A26 Fab-dsFv. Специфическое связывание антитела с рецептором в условиях равновесия при использовании диапазона концентраций антитела применяли для определения K_D , считая, что лишь очень незначительная фракция антитела связывалась с рецептором в любой точке на кривой связывания.

Для описания равновесного связывания применяли следующее уравнение:



Скорость реакции ассоциации антитела с рецептором = $k_{\text{on}} \times$

$[\text{рецептора}_{\text{свободн.}}] \times [\text{антитело}_{\text{свободн.}}]$

Скорость реакции диссоциации комплекса рецептор-антитело = k_{off}

$\times [\text{рецептор-антитело}]$

Равновесие, скорости реакции ассоциации и диссоциации являются одинаковыми, и можно вывести уравнение, описывающее изотерму связывания; на полулогарифмической кривой связывание является сигмовидным. Величину K_D определяют как $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$, и ее можно рассчитывать из кривой связывания в виде концентрации, при которой имеет место связывание, составляющее половину от максимального.

Связывание меченой с помощью AlexaFluor488 конструкции A26 Fab-Fv с активированными человеческими $CD4^+OX40^+$ -Т-клетками измеряли с помощью проточной цитометрии с использованием диапазона концентраций, охватывающего 5-log-единиц.

Репрезентативная кривая связывания для A26 Fab-Fv представлена на фиг. 4.

Средняя величина K_D , полученная с использованием активированных клеток, взятых от 5 различных доноров, составляла 145 пМ.

Пример 3. Экспрессия 645gL4gH5 в виде scFv.

Конструирование плазмид.

scFv экспрессировали из одной из двух близкородственных модифицированных экспрессионных плазмид млекопитающих фирмы UCB; pVKΔPvuII применяли для клонирования и экспрессии scFv в HL-ориентации, а pKHΔEcoRV применяли для клонирования и экспрессии scFv в LH-ориентации. Все scFv создавали так, чтобы они содержали состоящий из 20 аминокислот линкерный пептид, т.е. (GGGS)₄ (SEQ ID NO: 17), и C-концевую метку 10×His. Акцепторные плазмиды scFv 362HL и 240LH кодировали уникальные сайты рестрикции с пограничными последовательностями FW1-FW4vH (PvuII и XhoI) и vL (EcoRV и BsiWI), что позволяло осуществлять последующее клонирование с применением рестриктаз переменных областей scFv с использованием двух стадий лигирования. Гены, кодирующие 645gH5vH и 645gL4vL, синтезировали с помощью DNA2.0 с неоднозначными ("качающимися") остатками цистеина в положениях vH44 и vL100 согласно нумерации Кэбота для создания стабилизированного дисульфидными мостиками (ds) scFv. Указанные гены V-областей клонировали в акцепторных плаزمиде scFv, используя PvuII и XhoI (vH) или EcoRV и dBsiWI (vL), и для подтверждения успешного лигирования применяли секвенирование ДНК.

Экспрессия и очистка.

Клетки линии HEK293F (культуры объемом 50 мл, 10 клеток/мл) трансфектировали 50 мкг плазмидной ДНК и культивировали при 37°C в среде FreeStyle™. Супернатанты собирали через 6 дней после трансфекции, и scFv очищали путем серийной очистки на Ni^{2+} -NTA. Очищенный белок концентрировали, и осуществляли замену буфера на ЗФР для последующей биофизической характеристики.

Анализ термостабильности.

ThermoFluor-анализ осуществляли для оценки термостабильности очищенных молекул. Очищенные белки (0,1 мг/мл) смешивали с оранжевым красителем SYPRO® (фирма Invitrogen), и смесь вносили в четырех повторностях в 384-луночный планшет для ПЦР с оптическим дном. Образцы анализировали с

помощью системы для быстрой ПЦР в реальном времени 7900HT (фирма Agilent Technologies) в диапазоне температур от 20 до 99°C при скорости повышения температуры 1,1°C/мин. Строили график зависимости изменения интенсивности флуоресценции в каждой лунке от температуры, и величины T_m определяли по точкам излома.

ЖХВР-гель-фильтрация.

Очищенные белки (10 и 50 мг) анализировали с помощью ЖХВР-гель-фильтрации на колонке Супердекс 200 10/300 GL Tricorn (фирма GE Healthcare). Изократический градиент 3ФР, pH 7,4 применяли со скоростью потока 1 мл/мин с УФ-детекцией при 214 и 280 нм.

Обобщение результатов.

Для конструкции 645gH5gL4 HLds содержание мономеров составляло 97%, и величина T_m (в °C) составляла 75,6.

Для конструкции 645gH5gL4 HL содержание мономеров составляло 86%, и величина T_m (в °C) составляла 75,6.

Пример 4. Конструирование слияний FabA-dsscFv.

Плазмиды для экспрессии в клетках млекопитающих.

Одноцепочечный Fv (scFv) конструировали путем сцепления вариабельных доменов легких и тяжелых цепей антитела к человеческому сывороточному альбумину (SEQ ID NO: 1 и 3 или 2 и 4) через гибкий линкер (SEQ ID NO: 17) в HL-ориентации. Интродуцировали точечные мутации в последовательности ДНК в отобранных остатках в каркасном участке как тяжелой цепи, так и легкой цепи Fv. Мутации интродуцировали для создания межцепочечного дисульфидного мостика между тяжелыми и легкими цепями Fv, при этом замена G44C в тяжелой цепи и замена G100C в легкой цепи позволяли получать связанный дисульфидным мостиком scFv (dsscFv). Слитые белки FabA-dsscFv конструировали путем слияния dsscFv с С-концом константной области либо легкой цепи (с Km3-аллотипом константной области каппа-цепи), либо тяжелой цепи FabA (человеческий константный участок CH1 гамма-1, γ 1-изотип). Гибкий линкер (SEQ ID NO: 18 и 5) применяли для сцепления scFv с С-каппа-участком (SEQ ID NO: 19) или СН1-участком (SEQ ID NO: 20) соответственно. FabA-dsscFv (CL-dsscFv), FabA-dsscFv (CH1-dsscFv), легкую цепь FabA и тяжелую цепь FabA получали химическим путем и затем клонировали в экспрессионных векторах млекопитающих под контролем промотора HCMV-MIE и полиА-последовательности SV40E.

Различные результаты, полученные для этих конструкций, представлены на фиг. 7-13. Опыты по оценке термостабильности этих конструкций позволили установить, что величина T_m для каждой из них составляла примерно 82°C.

Следует иметь в виду, что в контексте настоящего описания понятие "содержащий" обозначает также "включающий".

Варианты осуществления изобретения можно объединять, если это технически возможно.

Указанные в настоящем описании варианты осуществления изобретения содержат определенные отличительные признаки/элементы. Описание распространяется также на отдельные варианты осуществления изобретения, которые состоят или практически состоят из указанных отличительных признаков/элементов.

Должно быть очевидно, что приведенные примеры даны только с целью лучшего понимания настоящего изобретения и не направлены на его ограничение, и что под объем приведенной ниже формулы изобретения подпадают модификации деталей. Предпочтительные признаки каждого варианта осуществления изобретения распространяются на каждый из других вариантов осуществления изобретения с учетом соответствующих изменений. Все публикации, включая (но, не ограничиваясь только ими) патенты и заявки на патент, процитированные в настоящем описании, включены в него в качестве ссылки в той степени, как если бы было указано, что каждая индивидуальная публикация или заявка на патент была специально и индивидуально полностью включена в качестве ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Связывающее сывороточный альбумин антитело или его фрагмент, содержащее/содержащий вариабельный домен тяжелой цепи, который имеет последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, и вариабельный домен легкой цепи, который имеет последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4.

2. Связывающее сывороточный альбумин антитело или его фрагмент, содержащее/содержащий вариабельный домен тяжелой цепи, который имеет последовательность SEQ ID NO: 1, и вариабельный домен легкой цепи, который имеет последовательность SEQ ID NO: 3.

3. Связывающее сывороточный альбумин антитело или его фрагмент, содержащее/содержащий вариабельный домен тяжелой цепи, который имеет последовательность SEQ ID NO: 2, и вариабельный домен легкой цепи, который имеет последовательность SEQ ID NO: 4.

4. Связывающее сывороточный альбумин антитело или его фрагмент по одному из пп.1-3, где антитело или его фрагмент выбраны из группы, состоящей из Fab, модифицированного Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, антитела из единичных вариабельных доменов, scFv, двух-, трех- или четырехвалентных антител, бис-

scFv, димерных (диабоди), тримерных (триабоди), тетрабоди, DVD-Ig и BiTE.

5. Биспецифическое антитело, содержащее
тяжелую цепь, которая содержит в направлении от N-конца первый переменный домен тяжелой цепи (VH1), CH1-домен и второй переменный домен тяжелой цепи (VH2),
легкую цепь, которая содержит в направлении от N-конца первый переменный домен легкой цепи (VL1), CL-домен и второй переменный домен легкой цепи (VL2),
в котором указанные тяжелые и легкие цепи расположены так, что VH1 и VL1 образуют первый антигенсвязывающий сайт, а VH2 и VL2 образуют второй антигенсвязывающий сайт,
где антиген, связывающийся со вторым антигенсвязывающим сайтом, представляет собой человеческий сывороточный альбумин, в котором второй переменный домен тяжелой цепи (VH2) имеет последовательность SEQ ID NO: 1, а второй переменный домен легкой цепи (VL2) имеет последовательность SEQ ID NO: 3, причем
второй переменный домен тяжелой цепи (VH2) и второй переменный домен легкой цепи (VL2) не связаны дисульфидным мостиком.

6. Биспецифическое антитело, содержащее
тяжелую цепь, которая содержит в направлении от N-конца первый переменный домен тяжелой цепи (VH1), CH1-домен и второй переменный домен тяжелой цепи (VH2),
легкую цепь, которая содержит в направлении от N-конца первый переменный домен легкой цепи (VL1), CL-домен и второй переменный домен легкой цепи (VL2),
в котором указанные тяжелые и легкие цепи расположены так, что VH1 и VL1 образуют первый антигенсвязывающий сайт, а VH2 и VL2 образуют второй антигенсвязывающий сайт,
где антиген, связывающийся со вторым антигенсвязывающим сайтом, представляет собой человеческий сывороточный альбумин,
в котором второй переменный домен тяжелой цепи (VH2) имеет последовательность SEQ ID NO: 2, а второй переменный домен легкой цепи (VL2) имеет последовательность в SEQ ID NO: 4, причем
второй переменный домен тяжелой цепи (VH2) и второй переменный домен легкой цепи (VL2) связаны дисульфидным мостиком.

7. Полинуклеотид, кодирующий антитело или его фрагмент по одному из пп.1-4.

8. Вектор для экспрессии связывающего сывороточный альбумин антитела или его фрагмента, где вектор содержит полинуклеотид по п.7.

9. Клетка-хозяин, продуцирующая связывающее сывороточный альбумин антитело или его фрагмент, где клетка-хозяин содержит полинуклеотид по п.7 или вектор по п.8.

10. Способ получения антитела или его фрагмента по любому из пп.1-4, включающий обеспечение экспрессии полинуклеотида по п.7 или вектора по п.8 в клетке-хозяине по п.9.

11. Фармацевтическая композиция для лечения воспалительных заболеваний и нарушений, иммунных заболеваний и нарушений, фиброзных нарушений и различных видов рака, содержащая антитело или фрагмент по одному из пп.1-4 или биспецифическое антитело по п.5 или 6.

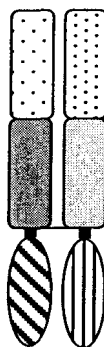
12. Применение антитела или его фрагмента по одному из пп.1-4 для приготовления лекарственного средства для лечения воспалительных заболеваний и нарушений, иммунных заболеваний и нарушений, фиброзных нарушений и различных видов рака.

13. Применение биспецифического антитела по п.5 или 6 для приготовления лекарственного средства для лечения воспалительных заболеваний и нарушений, иммунных заболеваний и нарушений, фиброзных нарушений и различных видов рака.

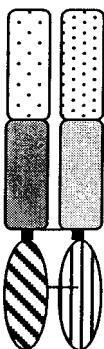
14. Применение антитела или его фрагмента по любому из пп.1-4 для лечения воспалительных заболеваний и нарушений, иммунных заболеваний и нарушений, фиброзных нарушений и различных видов рака.

15. Применение биспецифического антитела по п.5 или 6 для лечения воспалительных заболеваний и нарушений, иммунных заболеваний и нарушений, фиброзных нарушений и различных видов рака.

16. Способ лечения воспалительных заболеваний и нарушений, иммунных заболеваний и нарушений, фиброзных нарушений и различных видов рака, включающий введение терапевтически эффективного количества антитела или его фрагмента по одному из пп.1-4 или биспецифического антитела по п.5 или 6.



Фиг. 1А



Фиг. 1Б

(а) Варибельный домен тяжелой цепи антитела к альбумину (без ds) (SEQ ID NO: 1)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSDNYAINWVRQAPGKCLEWIGIIWASGTTFYATWAKGRFTI
SRDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLTVTVSS

(б) Варибельный домен тяжелой цепи антитела к альбумину (ds) (SEQ ID NO: 2)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSDNYAINWVRQAPGKCLEWIGIIWASGTTFYATWAKGRFTI
SRDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLTVTVSS

(в) Варибельный домен легкой цепи антитела к альбумину (без ds) (SEQ ID NO: 3)

DIQMTQSPSSVSASVGDRTVITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFSGSGSG
TDFTLTISSLQPEDFATYYCGGGYSSISDTTFGGGKTVEIKRT

(г) Варибельный домен легкой цепи антитела к альбумину (ds) (SEQ ID NO: 4)

DIQMTQSPSSVSASVGDRTVITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFSGSGSG
TDFTLTISSLQPEDFATYYCGGGYSSISDTTFGGGKTVEIKRT

(д) Линкер 1 (SEQ ID NO: 5)

SGGGSGGGSGGGG

(е) Линкер 2 (SEQ ID NO: 6)

GGGGSGGGSGGGG

(ж) Тяжелая цепь Fab A26-(G4S,G4T,G4S)-645dsFv(gH5) (SEQ ID NO: 7)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKLEWVASISPSGGLTYRDSVKGRFT
ISRDDAKNSPYLMNSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGLTVTVSSASTKGFVFLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKVEPKSCSGGGSGGGGTGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSDNYAINWVRQA
PGKCLEWIGIIWASGTTFYATWAKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFD
LWGQGLTVTVSS

(з) Легкая цепь Fab A26-(3×G4S)-645dsFv(gL4) (SEQ ID NO: 8)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRATQSIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNANTLHTGVPSRFSASGSGT
DSTLTISLQPEDFATYYCQYYDYPLTFGGGKTVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNN
FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGECGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRTVITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKL
LIYEASKLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGGGYSSISDTTFGGGKTVEIKRT

Фиг. 2

Вариабельный домен тяжелой цепи 645gH1 (SEQ ID NO: 9)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGIIWASCTTFYATWAKGRFTI
SRDSTTVYLQMNLSRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLTVTVSS

Вариабельный домен легкой цепи 645gL1 (SEQ ID NO: 10)

DIQMTQSPSSVSASVGDRTVITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFKSGSGG
TDFTLTISSSLQPEDFATYYCGGYSSISDITFGCGTKVEIK

Тяжелая цепь Fab A26-(3×G4S)-645dsFv(gH1) (SEQ ID NO: 11)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASISPSGGLTYRDSVKGRFT
ISRDDAKNSPYLQMNLSRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKS
NTKVDKKVEPKSCSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDLSNYAINWVRQA
PGKCLEWIGIIWASGTTFYATWAKGRFTISRSTTVYLQMNLSRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLW
GQGLTVTVSS

Легкая цепь Fab A26-(3×G4S)-645dsFv(gL1) (SEQ ID NO: 12)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRATQSIYNALAWYQQKPKAPKLLIYNANTLHTGVPSRFSASGSGT
DSTLTISSSLQPEDFATYYCQYYDYPLTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKKHVVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGECSGGGSGGGSGGGSGGGSDIVMTQSPSSVSASVGDRTVITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPKAPK
LLIYEASKLTSGVPSRFKSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCGGYSSISDITFGCGTKVEIK

Фиг. 3**645 gH5gL4 (SEQ ID NO: 13)**

GAGGTTTCAGCTGCTGGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCACGCTGGAGGAGCCTGCGTCTCTCTTGTCGA
GTAAGCGGCATCGACCTGTCCAACCTACCGGATTAACCTGGGTACGTCAGGCACCGGGTAAAGGCTCGGAA
TGGATCGGCATCATCTGGGCCTCTGGTACGACCTTCTACGCTACTTGGGCCAAAGGTCGTTTACCATC
TCCCGTGACAACCTCTAAAAACACCGTGACCTGCAGATGAACCTCTCTGCGTGCGGAAGACACTGCGGTT
TACTATTGCGCGCGTACCGTTCCGGGCTATTCTACTGCACCGTACTTGCACCTGTGGGGTCAGGGTACT
CTGGTTACCGTCTCGAGTGGAGGTGGCGGTTCTGGCGGTGGCGGTTCCGGTGGCGGTGGATCGGGAGGT
GGCGGTTCTGATATCCAGATGACCCAGAGTCCAAGCAGTGTTTCCGCCAGCGTAGGCGATCGTGTGACT
ATTACCTGTCAGTCTCTCCGAGCGTTTGGTCCAACCTTCTGAGCTGGTACCAGCAGAAACCGGGTAAA
GCCCCGAAACTGCTGATCTACGAGGCGTCTAAACTGACCTCTGGTGTACCGTCCCGTTTCTCTGGCTCT
GGCTCTGTTACGGAATCTCACTCTGACCATCTCCTCTCTGCAGCCGGAAGACTTTGCAACGTACTACTGC
GGTGGTGGTTACTCTTCCATCTCTGACACCACTTCCGTTGGAGGCACCAAGTTGAAATCAAACGTACG
CATCACCATCACCATCACCATCACCATCAC

645 gH5gL4 (SEQ ID NO: 14)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGIIWASGTTFYATWAKGRFTI
SRDNSKNTVYLQMNLSRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLTVTVSSGGGSGGGSGGGSGGG
GGSDIQMTQSPSSVSASVGDRTVITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFSGS
SGGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCGGYSSISDITFGGGTKVEIKRTHHHHHHHHHH

645 gH5gL4ds (SEQ ID NO: 15)

GAGGTTTCAGCTGCTGGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCACGCTGGAGGAGCCTGCGTCTCTCTTGTCGA
GTAAGCGGCATCGACCTGTCCAACCTACCGGATTAACCTGGGTACGTCAGGCACCGGGTAAATGCCTGGAA
TGGATCGGCATCATCTGGGCCTCTGGTACGACCTTCTACGCTACTTGGGCCAAAGTTCGTTTACCATC
TCCCGTGACAACCTCTAAAAACACCGTGACCTGCAGATGAACCTCTCTGCGTGCGGAAGACACTGCGGTT
TACTATTGCGCGCGTACCGTTCCGGGCTATTCTACTGCACCGTACTTGCACCTGTGGGGTCAGGGTACT
CTGGTTACCGTCTCGAGTGGAGGTGGCGGTTCTGGCGGTGGCGGTTCCGGTGGCGGTGGATCGGGAGGT
GGCGGTTCTGATATCCAGATGACCCAGAGTCCAAGCAGTGTTTCCGCCAGCGTAGGCGATCGTGTGACT
ATTACCTGTGAGTCTCTCCGAGCGTTTGGTCCAACCTTCTGAGCTGGTACCAGCAGAAACCGGGTAAA
GCCCCGAAACTGCTGATCTACGAGGCGTCTAAACTGACCTCTGGTGTACCGTCCCGTTTCTCTGGCTCT
GGCTCTGGTACGGACTTCACTCTGACCATCTCCTCTCTGCAGCCGGAAGACTTTGCAACGTACTACTGC
GGTGGTGGTTACTCTTCCATCTCTGACACCACTTCCGTTGTGGCACCAGGTTGAAATCAAACGTACG
CATCACCATCACCATCACCATCACCATCAC

645 gH5gL4ds (SEQ ID NO: 16)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGIIWASGTTFYATWAKGRFTI
SRDNSKNTVYLQMNLSRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLTVTVSSGGGSGGGSGGGSGGG
GGSDIQMTQSPSSVSASVGDRTVITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFSGS
SGGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCGGYSSISDITFGCGTKVEIKRTHHHHHHHHHH

Фиг. 4**Линкер (SEQ ID NO: 17)**

GGGGSGGGSGGGSGGGG

Линкер (SEQ ID NO: 18)

SGGGSGGGSGGGSGGGG

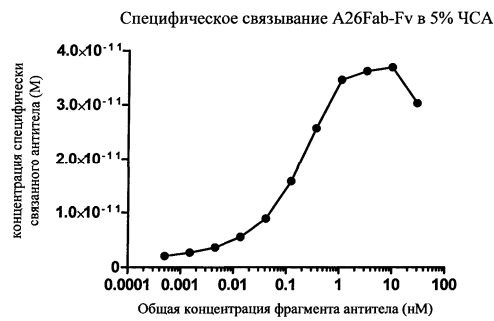
cКарра (SEQ ID NO: 19)

VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSST
LTLSKADYEKKHVVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

CHI (SEQ ID NO: 20)

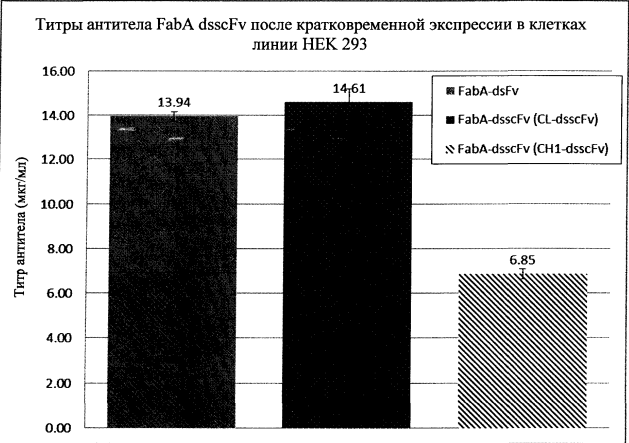
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV
TVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNNTKVDKKVEPKSC

Фиг. 5



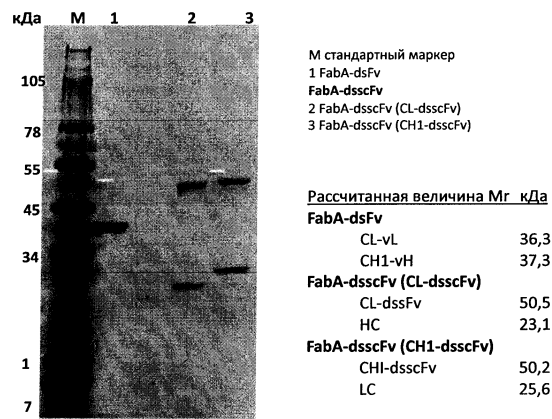
Фиг. 6

Кратковременная экспрессия FabA-dsscFv A26-645gH5gL4 в клетках линии НЕК293



Фиг. 7

Результаты анализа методом ДСН-ПААГ очищенного FabA-dsscFv (НЕК293)



Фиг. 8

Аффинность к ЧСА и связывание антигена А (НЕК293)

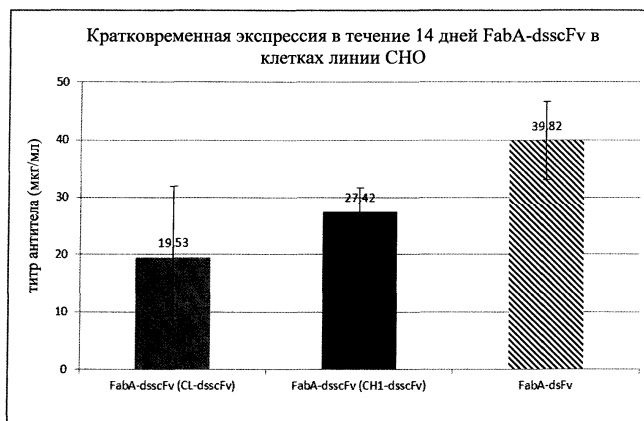
	Аналит		Применяемая концентрация	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (М)	KD (нМ)
FabA-dsscFv (CL-dsscFv)	ЧСА	титрование	50нМ, 25нМ, 12,5нМ, 6,25нМ	1,83E+05	2,40E-04	1,31E-09	1,31
		одна концентрация	50нМ	1,65E+05	2,11E-04	1,28E-09	1,28
FabA-dsscFv (CH1-dsscFv)	ЧСА	титрование	50нМ, 25нМ, 12,5нМ, 6,25нМ	1,72E+05	2,22E-04	1,29E-09	1,29
		одна концентрация	50нМ	1,60E+05	1,99E-04	1,25E-09	1,25
FabA-dsFv	ЧСА	титрование	50нМ, 25нМ, 12,5нМ, 6,25нМ	7,51E+04	1,51E-04	2,01E-09	2,01
		одна концентрация	50нМ	6,06E+04	1,19E-04	1,96E-09	1,96

Фиг. 9

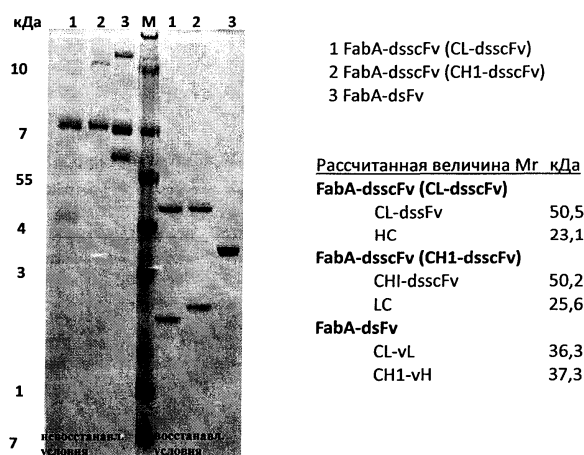
	Аналит		Концентрация	ка (1/Мс)	kd (1/с)	KD (M)	KD (nM)
FabA-dsscFv (CH1-dsscFv)	Антиген А	Одна конц.	25нМ	1,66E+05	2,34E-05	1,41E-10	141
FabA-dsscFv (CL-dsscFv)	Антиген А	Одна конц.	25нМ	1,78E+05	1,82E-05	1,02E-10	102
FabA-dsFv	Антиген А	Одна конц.	25нМ	1,70E+05	1,53E-05	9,00E-11	90

Фиг. 10

FabA-dsscFv (CHO)



Фиг. 11



Фиг. 12

Термостабильность FabA-dsscFv (CHO)

	Tm 1	станд. откл. Tm 1	Tm 2	станд. откл. Tm 2	Tm 3	станд. откл. Tm 3
FabA-dsscFv (CL-dsscFv)	83,8	0,2	73,6	0,5	52,4	0,7
FabA-dsscFv (CH1-dsscFv)	84,6	0,3	75,5	0,5	57,8	0,6
FabA-dsFv	84	0,2	73,9	0,3	ND	ND

Фиг. 13



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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