

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035050**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.04.22

(21) Номер заявки
201491569

(22) Дата подачи заявки
2013.02.22

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

(54) СИММЕТРИЧНОЕ БИСПЕЦИФИЧЕСКОЕ АНТИТЕЛО IgG4 С УЛУЧШЕННОЙ СТАБИЛЬНОСТЬЮ

(31) **1203051.6**

(32) **2012.02.22**

(33) **GB**

(43) **2015.01.30**

(86) **PCT/EP2013/053614**

(87) **WO 2013/124450 2013.08.29**

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

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

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

(56) SCHUURMAN J. ET AL.: "The inter-heavy chain disulfide bonds of IgG4 are in equilibrium with intra-chain disulfide bonds", MOLECULAR IMMUNOLOGY, PERGAMON, GB, vol. 38, no. 1, 1 January 2001 (2001-01-01), pages 1-8, XP002329378, ISSN: 0161-5890, DOI: 10.1016/S0161-5890(01)00050-5, page 5

US-A-5677425

EP-A1-2409990

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

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

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

(57) Изобретение относится к симметричному биспецифическому антителу класса IgG4, содержащему две тяжелых цепи, каждая из которых содержит переменный домен, домен C_H1 и шарнирную область, где в каждой тяжелой цепи цистеин в домене C_H1, который образует межцепочечную дисульфидную связь с цистеином в легкой цепи, заменен на другую аминокислоту; и, необязательно, одна или несколько аминокислот, расположенных в верхней шарнирной области, заменены на цистеин, где последовательности константной области каждой тяжелой цепи являются сходными или идентичными, а переменные области в каждой тяжелой цепи различаются, к составам, содержащим их, к применению каждого из указанных выше для лечения и к способам получения указанных антител и составов.

B1**035050****035050****B1**

Изобретение относится к биспецифическому IgG4-антителу, обладающему измененным расположением дисульфидных связей по сравнению с антителом дикого типа и к способу получения усовершенствованного антитела. В следующем аспекте изобретение относится к эффективному способу получения биспецифических антител.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

После открытия мутации S241P исследовали дополнительные мутации IgG4 для понимания взаимодействия между тяжелыми цепями в антителах IgG4, снижения эффекторной функции IgG4 и усиления стабильности структуры. В Schoorman et al. (Schoorman J. et al., 2001. The inter-heavy chain disulphide bonds of IgG4 are in equilibrium with intra-heavy chain disulphide bonds. Molecular Immunology 38, 1-8), на-

блюдаемую нестабильность дисульфидных связей между цепями IgG4 исследовали с использованием мутантов IgG4. В мутанте M1 Cys 131 (при нумерации по системе нумерации EU или Cys 127 по системе нумерации Kabat), который вовлечен в дисульфидную связь между тяжелой цепью и легкой цепью (C_L - C_{H1}), был заменен на серин, и было выявлено, что этот мутант приводит к образованию димеров легких цепей и димеров тяжелых цепей. В мутанте M2 цистеин 226 (226 при нумерации по системе нумерации EU или 239 по системе нумерации Kabat), который вовлечен в дисульфидную связь между тяжелыми цепями в шарнирной области, был заменен на серин, и было выявлено, что этот мутант обладает более стабильной связью между тяжелыми цепями по сравнению с IgG4 и препятствует образованию дисульфидной связи внутри тяжелой цепи.

Мутации в доменах C_{H2} и C_{H3} IgG4-антител также исследовали для уменьшения образования агрегатов IgG4-антитела. В US 2008/0063635, Takahashi et al., описано исследование мутанта IgG4, в котором аргинин в положении 409 (409 при нумерации по системе нумерации EU, или 440 при нумерации по системе нумерации Kabat) в домене C_{H3} заменен лизином, треонином, метионином или лейцином для ингибирования образования агрегата при низком значении pH. Также описаны дополнительные мутации в положениях L235, D265, D270, R322, P329 и P331 (L235, D265, D270, R322, P329 и P331 при нумерации по системе нумерации EU или L248, D278, D283, R341, P348 и P350 при нумерации по системе нумерации Kabat) для ослабления активности CDC. В WO 2008/145142 Van de Winkel et al. описаны стабильные IgG4-антитела, которые обладают сниженной способностью претерпевать "обмен Fab-плечами" (обозначаемый в настоящем описании как динамический обмен тяжелыми цепями) путем замены остатка аргинина в положении 409, остатка Phe в положении 405 или остатка Lys в положении 370 (R409, F405 и R370 при нумерации по системе нумерации EU или R440, F436 и R393 при нумерации по системе нумерации Kabat), даже в отсутствие мутации S228P (S228 при нумерации по системе нумерации EU или S241 по системе нумерации Kabat) в шарнирной области.

Настоящее изобретение относится к новым мутантным антителам, которые могут обладать преимущественными свойствами, включая улучшенные биофизические свойства, например, по сравнению с антителами дикого типа, в частности IgG4-антителами дикого типа и их фрагментами. В частности, неожиданно было открыто, что изменение положения остатка цистеина в тяжелой цепи IgG4-антитела, который образует дисульфидную связь с цистеином в легкой цепи, обеспечивает IgG4-антитело, обладающее увеличенной стабильностью по сравнению с IgG4-антителом дикого типа. Также было открыто, что мутантные IgG4-антитела способны образовывать биспецифические антитела, обладающие преимущественными свойствами обмена Fab-плечами.

Обмен Fab-плечами *in vitro* можно стимулировать с использованием высоких концентраций антител и/или с использованием химических стимуляторов, таких как глутатион, для получения биспецифического формата, который является стабильным и подходящим для применения в качестве лекарственного средства. Это имеет применение в области фармацевтических биологических продуктов, поскольку биспецифические структуры может быть трудно экспрессировать в качестве одной конструкции.

Сущность изобретения

В одном из аспектов изобретение относится к симметричному биспецифическому антителу класса IgG4, содержащему две тяжелых цепи, каждая из которых содержит варибельную область, домен C_{H1} и шарнирную область, где в каждой тяжелой цепи:

- a) цистеин в домене C_{H1} , который образует межцепочечную дисульфидную связь с цистеином в легкой цепи, заменен другой аминокислотой; и
- b) одна или несколько аминокислот, расположенных в верхней шарнирной области, заменена на цистеин,

где последовательности константной области каждой из тяжелых цепей являются сходными или идентичными, а варибельные области в каждой из тяжелых цепей различаются.

В одном из вариантов осуществления цистеин в домене C_{H1} , который образует межцепочечную дисульфидную связь с цистеином в легкой цепи, представляет собой цистеин в положении 127 при нумерации по системе нумерации Kabat, например, как показано на фиг. 1b.

В одном из вариантов осуществления межцепочечный цистеин в положении 127 при нумерации по системе нумерации Kabat в домене C_{H1} заменен на другую аминокислоту в одной или обеих тяжелых цепях.

Одна или несколько аминокислот, расположенных в верхней шарнирной области, которые заменены на цистеин, могут быть выбраны из 226, 227, 228, 229, 230, 237 и 238 при нумерации по системе нумерации Kabat, как показано на фиг. 1b (подчеркнутые аминокислоты в верхней шарнирной области). В одном из вариантов осуществления одна или несколько аминокислот, расположенных в верхней шарнирной области, которые заменены на цистеин, представляют собой одну или несколько аминокислот в положениях, выбранных из 227, 228, 229 и 230 при нумерации по системе нумерации Kabat, как показано на фиг. 1b и 2a.

В одном из вариантов осуществления мутация на цистеин в положении 229 снижает обмен Fab-плечами.

В одном из вариантов осуществления используют мутацию на цистеин в положении 230 в комбина-

ции с мутацией в положении 241 на неполярную аминокислоту, например, выбранную из пролина, аланина, глицина, изолейцина, фенилаланина, триптофана и валина.

В одном из вариантов осуществления обмен Fab-плечами может быть увеличен с использованием мутации на полярный остаток, например, выбранный из аргинина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, гистидина, лизина, треонина и тирозина, такой как треонин.

В одном из вариантов осуществления используют мутацию в положении 241 на неполярную аминокислоту, например, выбранную из пролина, аланина, глицина, изолейцина, фенилаланина, триптофана и валина.

В следующем аспекте настоящее изобретение также относится к симметричному биспецифическому антителу класса IgG4, содержащему две тяжелых цепи, каждая из которых содержит вариабельную область, домен C_H1 и шарнирную область, где в каждой тяжелой цепи:

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

b) цистеин в положении 239 или цистеин в положении 242 при нумерации по системе нумерации Kabat заменены на другую аминокислоту,

где последовательности константной области каждой из тяжелых цепей являются сходными или идентичными, а вариабельные области в каждой из тяжелых цепей различаются.

Антитела, предусматриваемые в рамках настоящего изобретения, не обладают эффекторной функцией и могут демонстрировать преимущественные свойства по сравнению с IgG4-антителом дикого типа, например, увеличенную стабильность, такую как увеличенная термическая стабильность.

Без связи с теорией, полагают, что модифицированная шарнирная область в антителах по настоящему изобретению облегчает внутреннее напряжение, присущее молекуле IgG4, и, тем самым, обеспечивает увеличенную стабильность.

Природные процессы обмена тяжелыми цепями можно стимулировать в IgG4-антителах для облегчения получения биспецифических IgG4-антител в соответствии с настоящим изобретением, например, *in vitro* с использованием высоких концентраций антител и/или с использованием химического стимулятора обмена, такого как глутатион.

Антитела по настоящему изобретению могут быть преимущественными в том, что они обладают увеличенной стабильностью относительно молекул IgG4 дикого типа и/или улучшенным обменом тяжелыми цепями. Антитела по настоящему изобретению могут продемонстрировать сниженный обмен тяжелыми цепями по сравнению с IgG4 дикого типа, который обеспечивает биспецифическое антитело, которое демонстрирует небольшой обмен или отсутствие обмена с IgG4 дикого типа *in vivo* вследствие их сниженной подверженности к обмену по сравнению с IgG4 и также вследствие относительно низкой концентрации биспецифического антитела *in vivo* по сравнению с природными циркулирующими IgG4-антителами.

Без связи с теорией полагают, что обмен между конструкциями сходного типа с конструкциями, описанными в соответствии с настоящим изобретением, является более благоприятным, чем обмен между конструкцией по настоящему изобретению и IgG4 дикого типа.

Биспецифические антитела по настоящему изобретению могут продемонстрировать сниженный обмен тяжелыми цепями при концентрациях, превышающих концентрации *in vivo*, например, при концентрациях 0,5 мМ или менее по сравнению с IgG4 дикого типа. В то время как биспецифические антитела по изобретению демонстрируют сниженный обмен тяжелыми цепями по сравнению с IgG4 дикого типа, они демонстрируют степень обмена тяжелыми цепями, по сравнению с IgG1 wt и IgG4 S241P, которая является достаточной для образования биспецифического антитела из двух антител, обладающих различными антигенными специфичностями, *in vitro*. Симметрия в константной области конструкций в рамках настоящего изобретения преимущественно минимизирует внутреннее напряжения антитела и, таким образом, способствует стабильности.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к способу получения симметричного биспецифического антитела, включающему стадию смешения первого IgG4-антитела со вторым IgG4-антителом *ex vivo* в условиях, способствующих обмену тяжелыми цепями, где антигенная специфичность вариабельных областей в первом антителе отличается от антигенной специфичности, вариабельных областей во втором антителе.

Способ по настоящему изобретению позволяет эффективное получение биспецифических симметричных антител с использованием только общепринятых способов и стимуляции природных процессов.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1a представлены последовательности C_H1 и шарнирной области человека IgG1 дикого типа и IgG4 дикого типа, где остатки шарнирной области подчеркнуты, и константная последовательность легкой цепи каппа;

на фиг. 1b представлены

константная последовательность легкой цепи каппа человека, где указан цистеин (подчеркнут), который формирует дисульфидные связи между цепями C_L-C_H1;

последовательности N-концевых остатков C_H1 и шарнирной области тяжелой цепи IgG1, 2, 3 и 4

человека, где указано (подчеркнуто) положение цистеина (в верхней шарнирной области для IgG1 и в N-концевом C_H1 для IgG2, 3 и 4), который формирует дисульфидную связь между цепями C_L-C_H1;

последовательности N-концевых остатков C_H1 и часть шарнирной области тяжелой цепи IgD человека, где указано (подчеркнуто) положение цистеина в N-концевой последовательности C_H1, который формирует дисульфидную связь между цепями C_L-C_H1;

N-концевые остатки C_H1, C-концевые остатки C_H1 тяжелой цепи IgM человека и отдельные N-концевые остатки C_H2, где указано (подчеркнуто) положение цистеина в N-концевой последовательности C_H1, который формирует дисульфидную связь между цепями C_L-C_H1; и

остатки в верхней шарнирной области IgG3 и IgG4, шарнирной области IgD и на C-конце C_H1 и в C_H2 IgM, где подчеркнутые остатки указывают на положения, где один или несколько остатков могут быть заменены на цистеин в антителах по настоящему изобретению;

на фиг. 2a - остаток цистеина C_H1 (C127), который формирует межцепочечную дисульфидную связь с цистеином легкой цепи, и остатки верхней и центральной шарнирной области IgG1 дикого типа, IgG4 дикого типа, и положения, в которых в IgG4-антитела по настоящему изобретению внесены мутации;

на фиг. 2b - остаток цистеина C_H1 (C127), который формирует межцепочечную дисульфидную связь с цистеином легкой цепи, и остатки шарнирной области IgG3 дикого типа и положения, где один или несколько остатков заменены на цистеин в IgG3-антителах по настоящему изобретению;

на фиг. 2c - остаток цистеина C_H1 (C127), который формирует межцепочечную дисульфидную связь с цистеином легкой цепи, и отдельные остатки C_H1 и C_H2 IgM дикого типа и положения, где один или несколько остатков заменены на цистеин в IgM-антителах по настоящему изобретению;

на фиг. 2d - остаток цистеина C_H1 (C128), который формирует межцепочечную дисульфидную связь с цистеином легкой цепи, и остатки шарнирной области IgD дикого типа и положения, где один или несколько остатков замещены цистеином в IgD-антителах по настоящему изобретению;

на фиг. 3a - мутации, внесенные в IgG4-антитела в соответствии с настоящим изобретением;

на фиг. 3b - положения остатков в мутантной тяжелой цепи IgG4-антител, представленной на фиг. 3a, и предсказанная дисульфидная связь, которая может образовываться с цистеином либо в легкой цепи (LC), либо в другой мутантной тяжелой цепи (HC). Когда цистеин может связываться с цистеином в LC или HC, подчеркнутая цепь представляет собой предсказанное преобладающее расположение дисульфидной связи;

на фиг. 4a - мутации, внесенные в IgG4-антитела в соответствии с настоящим изобретением;

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

на фиг. 5 - последовательности C_H1 и шарнирной области IgG4-антител в соответствии с настоящим изобретением;

на фиг. 6 - последовательности C_H1, шарнирной области, C_H2 и C_H3 IgG4-антител в соответствии с настоящим изобретением;

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

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

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

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

на фиг. 11 - результаты анализа ThermoFluor антител по настоящему изобретению, которые демонстрируют термостабильность доменов Fab и C_H2;

на фиг. 12 - результаты анализа ThermoFluor антител по настоящему изобретению, которые демонстрируют термостабильность доменов Fab и C_H2;

на фиг. 13 - результаты анализа ThermoFluor антител по настоящему изобретению, которые демонстрируют термостабильность доменов Fab и C_H2;

на фиг. 14 - результаты анализа ThermoFluor антител по настоящему изобретению, которые демонстрируют термостабильность доменов Fab и C_H2;

на фиг. 15 - ранжирование величин термостабильности отдельных антител по изобретению;

на фиг. 16 - обмен тяжелыми цепями для IgG1 дикого типа, IgG4 дикого типа и различных мутантов при двух концентрациях GSH и в различные моменты времени;

на фиг. 17 - обмен тяжелыми цепями для IgG4 дикого типа и различных мутантов при двух концен-

трациях GSH в различные моменты времени;

на фиг. 18 - обмен тяжелыми цепями для IgG4 дикого типа и различных мутантов при двух концентрациях GSH в различные моменты времени;

на фиг. 19 - процентное изменение обмена тяжелыми цепями для различных мутантов в 0,5 mM GSH по сравнению с IgG4 дикого типа;

на фиг. 20 - процентное изменение обмена тяжелыми цепями для различных мутантов в 5 mM GSH по сравнению с IgG4 дикого типа;

на фиг. 21 - анализ симметричного обмена плечами для мутантов IgG4 с альтернативными остатками в положении 241. Обмен IgG4 WT превышал обмен IgG4 P. Активность обмена в случае S241G и S241A была сходной и значительно меньше и составляла приблизительно половину от IgG4 WT. Мутант S241T обменивался на сходных с IgG4 WT уровнях.

Краткое описание последовательностей

В SEQ ID NO:1-223 представлены различные шарнирные области.

В SEQ ID NO:224 представлена природная шарнирная область IgG1.

В SEQ ID NO:225 представлена природная шарнирная область IgG4.

В SEQ ID NO:226 представлены последовательности C_H1 и шарнирной области IgG1-антитела дикого типа.

В SEQ ID NO:227 представлена последовательность C_H1 и шарнирной области в IgG4-антителе дикого типа.

В SEQ ID NO:228 представлена часть константной области легкой цепи каппа человека дикого типа.

В SEQ ID NO:229 представлена последовательность нижней шарнирной области IgG4 (описание на стр.22).

В SEQ ID NO:230 представлена часть N-концевой последовательности домена C_H1 IgG1-антитела человека.

В SEQ ID NO:231 представлена шарнирная область IgG1-антитела человека.

В SEQ ID NO:232 представлена часть N-концевой последовательности домена C_H1 IgG2-антитела человека.

В SEQ ID NO:233 представлена шарнирная область IgG2-антитела человека.

В SEQ ID NO:234 представлена часть N-концевой последовательности домена C_H1 IgG3-антитела человека.

В SEQ ID NO:235 представлена шарнирная область IgG3-антитела человека.

В SEQ ID NO:236 представлена часть N-концевой последовательности домена C_H1 IgG4-антитела человека.

В SEQ ID NO:237 представлена шарнирная область IgG4-антитела человека.

В SEQ ID NO:238 представлена часть N-концевой последовательности домена C_H1 IgGD-антитела человека.

В SEQ ID NO:239 представлена часть шарнирной области IgGD-антитела человека.

В SEQ ID NO:240 представлена часть N-концевой последовательности домена C_H1 IgGM-антитела человека.

В SEQ ID NO:241 представлена часть C-концевой последовательности домена C_H1 IgGM-антитела человека.

В SEQ ID NO:242 представлена часть домена C_H2 IgGM-антитела человека.

В SEQ ID NO:243-278 представлен домен C_H1 и шарнирная область последовательности антител 6, 7, 8, 15, 16, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 44, 45, 46, 47, 2, 3, 48, 28P, 44P, 1, 4, 5, 5P, 9, 10, 11, 12, 13 и 14 соответственно.

В SEQ ID NO:279 представлены последовательности доменов C_H2 и C_H3 IgG4.

В SEQ ID NO:280 представлены последовательности C_H2 IgG4 дикого типа и C_H3 IgG1 дикого типа.

В SEQ ID NO:281-306 представлены последовательности домена C_H1, шарнирной области, домена C_H2 и домена C_H3 антител 6, 7, 8, 15, 16, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 44, 45, 46, 47, 2, 3, 48, 28P и 44P соответственно.

В SEQ ID NO:306-316 представлены последовательности домена C_H1, шарнирной области, домена C_H2 и домена C_H3 антител 1, 4, 5, 5P, 9, 10, 11, 12, 13 и 14 соответственно.

В SEQ ID NO:317, 318, 320 и 321 представлены различные последовательности шарнирной области.

В SEQ ID NO:319 представлено расположение в последовательности антитела.

Подробное описание предпочтительных вариантов осуществления изобретения

Изобретение далее описано более подробно.

Симметричное антитело, как используют в рамках настоящего изобретения, представляет собой антитело или фрагмент антитела, где тяжелые цепи имеют сходную или идентичную последовательность в области вне варибельных областей.

Аналогично, как используют в настоящем описании, аминокислотная последовательность обладает 95% или более идентичностью на протяжении всей проанализированной последовательности, например 96, 97, 98 или 99% идентичностью. Процентную идентичность можно оценивать с использованием про-

граммного обеспечения, известного специалистам в данной области.

"Идентичный", как используют в настоящем описании, относится к 100% идентичности последовательности на протяжении анализируемой последовательности, например на протяжении всей последовательности.

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

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

Верхняя и центральная шарнирная области IgG1 дикого типа имеют последовательность EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:224).

Верхняя и центральная шарнирные области IgG4 дикого типа имеют последовательность EPKYGPPCPSCP (SEQ ID NO:225).

Шарнирная область типа IgG1, используемая в рамках настоящего изобретения, относится к шарнирной области, где одна или несколько, например 1-5, как, например, 1, 2 или 3 аминокислоты встроены в шарнирную область IgG4, в частности, между EPKYGPP (SEQ ID NO:319) и CPSC, и/или одна или несколько из аминокислот YGPP в шарнирной области IgG4 заменены, например, чтобы они соответствовали аминокислоте в шарнирной области IgG1, в частности, G (из YGPP в шарнирной области IgG4) заменен на C, или где Y (из YGPP в шарнирной области IgG4) заменен на C или S.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к симметричному биспецифическому антителу, содержащему тяжелые цепи IgG4 с верхней шарнирной областью, центральной и нижней шарнирной областью, где указанная верхняя и центральная шарнирные области в тяжелой цепи или каждой тяжелой цепи в нем имеют длину от 13 до 17, как, например, 15 аминокислот.

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

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

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

ESKYGPPAAACPPSCP SEQ ID NO:1; ESKYGPPGGGCPSCP SEQ ID NO:2;
 ESKYGPPHTHTCPSCP SEQ ID NO:3; ESKYGDKTHTCPSCP SEQ ID NO:4;
 EPSKYGPPAAACPPSCP SEQ ID NO:5; EPSKYGPPGGGCPSCP SEQ ID NO:6;
 EPSKYGPPHTHTCPSCP SEQ ID NO:7; EPSKYGDKTHTCPSCP SEQ ID NO:8;
 ESKSYGPPAAACPPSCP SEQ ID NO:9; ESKSYGPPGGGCPSCP SEQ ID NO:10;
 ESKSYGPPHTHTCPSCP SEQ ID NO:11; ESKSYGDKTHTCPSCP SEQ ID NO:12;
 ESKYGPPAAACPPCP SEQ ID NO:13; ESKYGPPGGGCPSCP SEQ ID NO:14;
 ESKYGPPHTHTCPPCP SEQ ID NO:15; ESKYGDKTHTCPPCP SEQ ID NO:16;
 EPSKYGPPAAACPPCP SEQ ID NO:17; EPSKYGPPGGGCPSCP SEQ ID NO:18;
 EPSKYGPPHTHTCPPCP SEQ ID NO:19; EPSKYGDKTHTCPPCP SEQ ID NO:20;
 ESKSYGPPAAACPPCP SEQ ID NO:21; ESKSYGPPGGGCPSCP SEQ ID NO:22;
 ESKSYGPPHTHTCPPCP SEQ ID NO:23; ESKSYGDKTHTCPPCP SEQ ID NO:24.

В одном из вариантов осуществления верхняя шарнирная область и центральная шарнирная область в тяжелой цепи IgG4 по изобретению состоит из шарнирной области IgG1-типа, т.е. EPKSCDKTHTCPPC SEQ ID NO:25, или ее производного, такого как

EPKSCDKAAACPPCP SEQ ID NO:26; EPKSCDKGGGCPSCP SEQ ID NO:27;
 EPKSCDKTHTSPPCP SEQ ID NO:28; EPKSCDKTHTCPPSP SEQ ID NO:29;
 EPKSCDKTHTSPPSP SEQ ID NO:30; EPKSCDKAAASPPCP SEQ ID NO:31;
 EPKSCDKAAACPPSP SEQ ID NO:32; EPKSCDKAAASPPSP SEQ ID NO:33;
 EPKSCDKGGGSPPCP SEQ ID NO:34; EPKSCDKGGGCPSCP SEQ ID NO:35;
 EPKSCDKGGGSPPSP SEQ ID NO:36

В одном из вариантов осуществления антитело по настоящему изобретению содержит верхнюю и

центральную шарнирные области.

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

ESKYGPPCPSCP SEQ ID NO:37; ESKYGDKCPSCP SEQ ID NO:38;
 EPSKYGPPCPSCP SEQ ID NO:39; EPSKYGDKCPSCP SEQ ID NO:40;
 ESKSYGPPCPSCP SEQ ID NO:41; ESKSYGDKCPSCP SEQ ID NO:42;
 ESKYGPPAACPSCP SEQ ID NO:43; ESKYGPPGGCPSCP SEQ ID NO:44;
 ESKYGPPHTCPSCP SEQ ID NO:45; ESKYGDKHTCPSCP SEQ ID NO:46;
 EPSKYGPPAACPSCP SEQ ID NO:47; EPSKYGPPGGCPSCP SEQ ID NO:48;
 EPSKYGPPHTCPSCP SEQ ID NO:49; EPSKYGDKHTCPSCP SEQ ID NO:50;
 ESKSYGPPAACPSCP SEQ ID NO:51; ESKSYGPPGGCPSCP SEQ ID NO:52;
 ESKSYGPPHTCPSCP SEQ ID NO:53; ESKSYGDKHTCPSCP SEQ ID NO:54;
 ESKYGPPACPSCP SEQ ID NO:55; ESKYGPPGCPSCP SEQ ID NO:56;
 ESKYGPPHTCPSCP SEQ ID NO:57; ESKYGDKHTCPSCP SEQ ID NO:58;
 EPSKYGPPACPSCP SEQ ID NO:59; EPSKYGPPGCPSCP SEQ ID NO:60;
 EPSKYGPPHTCPSCP SEQ ID NO:61; EPSKYGDKHTCPSCP SEQ ID NO:62;
 ESKSYGPPACPSCP SEQ ID NO:63; ESKSYGPPGCPSCP SEQ ID NO:64;
 ESKSYGPPHTCPSCP SEQ ID NO:65; ESKSYGDKHTCPSCP SEQ ID NO:66;
 ESKYGPPHTCPSCP SEQ ID NO:67; ESKYGDKHTCPSCP SEQ ID NO:68;
 EPSKYGPPHTCPSCP SEQ ID NO:69; EPSKYGDKHTCPSCP SEQ ID NO:70;
 ESKSYGPPHTCPSCP SEQ ID NO:71; ESKSYGDKHTCPSCP SEQ ID NO:72;
 ESKYGPPHTCPSCP SEQ ID NO:73; ESKYGDKHTCPSCP SEQ ID NO:74;
 EPSKYGPPHTCPSCP SEQ ID NO:75; EPSKYGDKHTCPSCP SEQ ID NO:76;
 ESKSYGPPHTCPSCP SEQ ID NO:77; ESKSYGDKHTCPSCP SEQ ID NO:78;
 ESKYGPPHTCPSCP SEQ ID NO:79; ESKYGDKHTCPSCP SEQ ID NO:80;
 EPSKYGPPHTCPSCP SEQ ID NO:81; EPSKYGDKHTCPSCP SEQ ID NO:82;
 ESKSYGPPHTCPSCP SEQ ID NO:83; ESKSYGDKHTCPSCP SEQ ID NO:84;
 ESKYGPPHCPSCP SEQ ID NO:85; ESKYGDKHCPSCP SEQ ID NO:86;

EPSKYGPPHCPSCP SEQ ID NO:87; EPSKYGDKHCPSCP SEQ ID NO:88;
 ESKSYGPPHCPSCP SEQ ID NO:89; ESKSYGDKHCPSCP SEQ ID NO:90;
 EPKSCDKAACPPCP SEQ ID NO:91; EPKSCDKGGCPPCP SEQ ID NO:92;
 EPKSCDKHTSPPCP SEQ ID NO:93; EPKSCDKHTCPPSP SEQ ID NO:94;
 EPKSCDKHTSPPSP SEQ ID NO:95; EPKSCDKAASPPCP SEQ ID NO:96;
 EPKSCDKAACPPSP SEQ ID NO:97; EPKSCDKAASPPSP SEQ ID NO:98;
 EPKSCDKGGSPCP SEQ ID NO:99; EPKSCDKGGCPPSP SEQ ID NO:100;
 EPKSCDKGGSPSP SEQ ID NO:101; EPKSCDKACPPCP SEQ ID NO:102;
 EPKSCDKGCPPCP SEQ ID NO:103; EPKSCDKTSPPCP SEQ ID NO:104;
 EPKSCDKTCPPSP SEQ ID NO:105; EPKSCDKTSPPSP SEQ ID NO:106;
 EPKSCDKASPPCP SEQ ID NO:107; EPKSCDKACPPSP SEQ ID NO:108;
 EPKSCDKASPPSP SEQ ID NO:109; EPKSCDKGSPPCP SEQ ID NO:110;
 EPKSCDKGCPPSP SEQ ID NO:111; EPKSCDKGSPPSP SEQ ID NO:112;
 EPKSCDKCPPCP SEQ ID NO:113; EPKSCDKCPPCP SEQ ID NO:114;
 EPKSCDKSPPCP SEQ ID NO:115; EPKSCDKSPPSP SEQ ID NO:116;
 EPKSCDKSPPCP SEQ ID NO:117; EPKSCDKCPPSP SEQ ID NO:118;
 EPKSCDKSPPSP SEQ ID NO:119; EPKSCDKSPPCP SEQ ID NO:120;
 EPKSCDKCPPSP SEQ ID NO:121; EPKSCDKSPPSP SEQ ID NO:122;
 EPKSCDKTTSPCP SEQ ID NO:123; EPKSCDKTTCPPSP SEQ ID NO:124;
 EPKSCDKTTSPSP SEQ ID NO:125; EPKSCDKTHSPPCP SEQ ID NO:126;
 EPKSCDKTHCPPSP SEQ ID NO:127; EPKSCDKTHSPPSP SEQ ID NO:128;
 ESKYGPPCPPCP SEQ ID NO:129; ESKYGPPCPPCP SEQ ID NO:130;
 ESKYGPPCPPCP SEQ ID NO:131; ESKYGDKCPPCP SEQ ID NO:132;
 EPSKYGPPCPPCP SEQ ID NO:133; EPSKYGPPCPPCP SEQ ID NO:134;
 EPSKYGPPCPPCP SEQ ID NO:135; EPSKYGDKCPPCP SEQ ID NO:136;
 ESKSYGPPCPPCP SEQ ID NO:137; ESKSYGPPCPPCP SEQ ID NO:138;
 ESKSYGPPCPPCP SEQ ID NO:139; ESKSYGDKCPPCP SEQ ID NO:140;
 ESKYGPPAACPPCP SEQ ID NO:141; ESKYGPPGGCPPCP SEQ ID NO:142;
 ESKYGPPHTCPPCP SEQ ID NO:143; ESKYGDKHTCPPCP SEQ ID NO:144;
 EPSKYGPPAACPPCP SEQ ID NO:145; EPSKYGPPGGCPPCP SEQ ID NO:146;
 EPSKYGPPHTCPPCP SEQ ID NO:147; EPSKYGDKHTCPPCP SEQ ID NO:148;
 ESKSYGPPAACPPCP SEQ ID NO:149; ESKSYGPPGGCPPCP SEQ ID NO:150;
 ESKSYGPPHTCPPCP SEQ ID NO:151; ESKSYGDKHTCPPCP SEQ ID NO:152;
 ESKYGPPACPPCP SEQ ID NO:153; ESKYGPPGCCPPCP SEQ ID NO:154;
 ESKYGPPHTCPPCP SEQ ID NO:155; ESKYGDKHTCPPCP SEQ ID NO:156;
 EPSKYGPPACPPCP SEQ ID NO:157; EPSKYGPPGCCPPCP SEQ ID NO:158;

EPSKYGPPTTCPPCP SEQ ID NO:159; EPSKYGDKTTCPPCP SEQ ID NO:160;
 ESKSYGPPACPPCP SEQ ID NO:161; ESKSYGPPGCPPCP SEQ ID NO:162;
 ESKSYGPPTTCPPCP SEQ ID NO:163; ESKSYGDKTTCPPCP SEQ ID NO:164;
 ESKYGPPTHCPPCP SEQ ID NO:165; ESKYGDKTHCPPCP SEQ ID NO:166;
 EPSKYGPPTHCPPCP SEQ ID NO:167; EPSKYGDKTHCPPCP SEQ ID NO:168;
 ESKSYGPPTHCPPCP SEQ ID NO:169; ESKSYGDKTHCPPCP SEQ ID NO:170;
 ESKYGPHTCPPCP SEQ ID NO:171; ESKYGDKHTCPPCP SEQ ID NO:172;
 EPSKYGPHTCPPCP SEQ ID NO:173; EPSKYGDKHTCPPCP SEQ ID NO:174;
 ESKSYGPHTCPPCP SEQ ID NO:175; ESKSYGDKHTCPPCP SEQ ID NO:176;
 ESKYGPPTCPPCP SEQ ID NO:177; ESKYGDKTCPPCP SEQ ID NO:178;
 EPSKYGPPTCPPCP SEQ ID NO:179; EPSKYGDKTCPPCP SEQ ID NO:180;
 ESKSYGPPTCPPCP SEQ ID NO:181; ESKSYGDKTCPPCP SEQ ID NO:182;
 ESKYGPPHCPPCP SEQ ID NO:183; ESKYGDKHCPPCP SEQ ID NO:184;
 EPSKYGPPHCPPCP SEQ ID NO:185; EPSKYGDKHCPPCP SEQ ID NO:186;
 ESKSYGPPHCPPCP SEQ ID NO:187; ESKSYGDKHCPPCP SEQ ID NO:188;
 EPKSCDKTHTCPPCP SEQ ID NO:189; EPKSCDKTHTCPSCP SEQ ID NO:190;
 ESKYCPACPSCP SEQ ID NO:191; ESKYCPAACPSCP SEQ ID NO:192;
 ESKYCPAAACPSCP SEQ ID NO:193; ESKYCPAAASPSCP SEQ ID NO:194;
 ESKYCPAAACPSSP SEQ ID NO:195; ESKCGPAAACPSCP SEQ ID NO:196;
 ESKYCPAAACPSCP SEQ ID NO:197; ESKYCPAAAAACPSCP SEQ ID NO:198;
 ESKYCPGGGCPSCP SEQ ID NO:199; ESKYCPSSSCPSCP SEQ ID NO:200;
 ESKYCPPTCPSCP SEQ ID NO:201; ESKYCPPTHTCPSCP SEQ ID NO:202;
 ESKYCPPTHTCPSCP SEQ ID NO:203; ESKYCPKTHTCPSCP SEQ ID NO:204;
 ESKYCDKTHTCPSCP SEQ ID NO:205; ESKYCDKTHCPSCP SEQ ID NO:206;
 ESKYCDKTCPSCP SEQ ID NO:207; ESKYCDKAAACPSCP SEQ ID NO:208;
 ESKYCDKCPSCP SEQ ID NO:209; ESKSCDKTHTCPSCP SEQ ID NO:210;
 EPKYCDKTHTCPSCP SEQ ID NO:211; EPKSCPPCPSCP SEQ ID NO:212;
 ESKSCPPCPSCP SEQ ID NO:213; EPKYCPPCPSCP SEQ ID NO:214;
 ECKYGPPCPSCP SEQ ID NO:215; ECKYGPPSPSCP SEQ ID NO:216;
 ECKYGPPCPSSP SEQ ID NO:217; ESCYGPPCPSCP SEQ ID NO:218;
 ESCYGPPSPSCP SEQ ID NO:219; ESCYGPPCPSSP SEQ ID NO:220;
 ESKCGPPCPSCP SEQ ID NO:221; ESKCGPPSPSCP SEQ ID NO:222;
 ESKCGPPCPSSP SEQ ID NO:223; EPKSCDKCPPSP SEQ ID NO:317.

В одном из вариантов осуществления центральная шарнирная область в одной или обеих последовательностях тяжелой цепи или их фрагментах имеет последовательность CPPCP SEQ ID NO:318.

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

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения каждая тяжелая цепь биспецифического антитела обладает идентичными верхней и центральной шарнирными областями, выбранными из представленных выше последовательностей, и она также может иметь идентичную нижнюю шарнирную область. В следующем варианте осуществления каждая тяжелая цепь биспецифического антитела имеет идентичные области C_H1, и также может иметь идентичные области C_H2 и C_H3. Таким образом, каждая тяжелая цепь может иметь идентичные последовательности константной области тяжелой цепи.

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

"Специфический", как используют в настоящем описании, относится к тому факту, что связываю-

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

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

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

Изобретение также относится к вектору экспрессии, содержащему последовательность, которая кодирует антитела по настоящему изобретению, и к клетке-хозяину, содержащей вектор экспрессии.

Изобретение также относится к антителу, как определено выше, для применения для лечения заболевания или нарушения. Кроме того, предусматривается способ лечения заболевания или нарушения, включающий введение терапевтически эффективного количества антитела, как определено выше.

В одном из вариантов осуществления антитело по настоящему изобретению содержит одну или две последовательности тяжелой цепи, независимо выбранных из последовательности тяжелой цепи, описанной в настоящем описании.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Между четырьмя изотипами IgG4 внутрицепочечное расположение дисульфидных связей в тяжелой цепи и легкой цепи является сходным, в то время как расположение межцепочечных дисульфидных связей является уникальным для каждого изотипа [рассмотрено (Wypych J., Li M., Guo A., Zhang Z., Martinez T., Allen M.J., Fodor S., Kelner D.N., Flynn G.C., Liu Y.D., Bondarenko P.V., Ricci M.S., Dillon T.M., Balland A., 2008. Human IgG2 antibodies display disulphide-mediated structural isoforms. *J. Biol. Chem.* 283, 16194-16205)].

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

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

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

В рамках настоящего изобретения проводили исследование того, как дисульфидная связь C_L-C_H1 влияет на свойства IgG4-антитела, включая термостабильность, структурную стабильность и аффинность антитела.

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

Каждая тяжелая цепь может содержать дополнительные мутации, включающие замену одного или обоих из остатков цистеина 239 и 242 в шарнирной области IgG4 на другую аминокислоту. Также в некоторые антитела включали мутацию для удлинения шарнирной области IgG4 на три аминокислоты между положениями 238 и 239 так, чтобы они имели ту же длину, что и шарнирная область IgG1. Также в некоторые антитела вносили мутацию S241P.

Образование половинных молекул IgG4 может быть уменьшено путем внесения мутации Ser на Pro в положении 241 (при нумерации по системе нумерации Kabat) в шарнирной области (Angal S. et al., 1993. A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody. *Mol. Immunol.* 30, 105-108). Кроме того, эта точечная мутация не влияла на компактную структуру IgG4, тем самым позволяя IgG4 сохранить его сниженную способность активировать комплемент.

Однако обмен *in vitro* этих мутантных антител можно стимулировать с использованием высоких концентраций антител, например 1-10 мМ или более, таких как 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 мМ. Было обнаружено, что мутантные IgG4-антитела в соответствии с настоящим изобретением демонстрируют преимущественные свойства, например увеличенную стабильность.

В одном из вариантов осуществления мутантные IgG4-антитела в соответствии с настоящим изобретением демонстрируют увеличенную термостабильность по сравнению с IgG4-антителом дикого типа. Неожиданно было обнаружено, что мутантные IgG4-антитела, в которые внесена мутация для замены цистеина в положении 127 домена C_H1 другой аминокислотой и в которых в шарнирную область тяжелой цепи внесен цистеин между положениями 227-230, демонстрируют увеличенную термостабильность по сравнению с IgG4-антителом дикого типа. Мутация путем удаления цистеина в положении 127 изменяет положение, в котором межцепочечная дисульфидная связь образуется между тяжелой цепью и легкой цепью (C_L-C_H1), и вынуждает легкую цепь образовывать дисульфидную связь с цистеином, который внесен между положениями 227 и 230 в шарнирной области тяжелой цепи. Таким образом, в одном из вариантов осуществления предусматривается IgG4-антитело, в котором цистеин 127 заменен на другую аминокислоту, и цистеин легкой цепи связан через дисульфидную связь с модифицированным способом инженерии цистеином в положении 227, 228, 229 или 230.

Кроме того, увеличение термостабильности также было неожиданно обнаружено путем добавления трех аминокислот к шарнирной области IgG4 для удлинения шарнирной области IgG4.

Также неожиданно было открыто, что мутантные IgG4-антитела, в которые была внесена мутация путем замены цистеина в положении 127 в домене C_H1 другой аминокислотой и путем замены цистеина в положении 239 или в положении 242 в шарнирной области тяжелой цепи другой аминокислотой, продемонстрировали увеличенную термостабильность по сравнению с IgG4-антителом дикого типа.

В одном из вариантов осуществления антитела по настоящему изобретению демонстрируют уменьшенное образование так называемых половинных молекул, которые образованы из одной легкой цепи и одной тяжелой цепи (HL). Антитела по настоящему изобретению, которые содержат мутацию в положении C239, но не содержат мутацию в положении C242, как правило, демонстрируют сниженное образование половинных молекул. Без связи с теорией полагают, что это является следствием того, что удаление цистеина в положении 239 снижает образование внутрицепочечной дисульфидной связи в тяжелой цепи и, таким образом, уменьшает количество половинных молекул по сравнению с антителами, которые не содержат мутацию в положении C239 или C242. Антитела, которые содержат мутацию в положении C242, но не содержат мутацию в положении C239, по-видимому, обеспечивают образование большего количества половинных молекул по сравнению с антителами, которые содержат мутацию в положении C239, но не содержат мутацию в положении C242. Без связи с теорией, полагают, что цисте-

ин в положении 239 является более реакционноспособным по сравнению с цистеином в положении 242 и способен образовывать дисульфидную связь либо с цистеином шарнирной области тяжелой цепи, либо с цистеином легкой цепи.

Антитела, которые содержат мутацию как в C239, так и в C242, образуют высокое количество половинных молекул вследствие образования межцепочечных дисульфидных связей между двумя тяжелыми цепями. Однако антитела, содержащие мутации как в C239, так и в C242, все еще способны образовывать целые молекулы антител вследствие связывания тяжелых цепей через нековалентные связи. Сниженное образование половинных молекул также наблюдают в антителах, содержащих мутацию S241P.

Антитела по настоящему изобретению также демонстрируют сравнимую аффинность в отношении антигена-мишени с IgG4-антителом дикого типа.

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

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

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

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

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

В одном из вариантов осуществления только один остаток, выбранный из 227, 228, 229 и 230, заменен остатком цистеина.

В одном из вариантов осуществления антитела по настоящему изобретению содержат мутацию Y229C или G230C.

Включение остатка цистеина в положение, выбранное из 227, 228, 229 и 230, в шарнирной области тяжелой цепи, обеспечивает новое положение для образования межцепочечной дисульфидной связи между тяжелой цепью и легкой цепью. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что это новое межцепочечное расположение дисульфидных связей обеспечивает IgG4-антитела, обладающие увеличенной термостабильностью по сравнению с IgG4-антителом дикого типа.

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

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

пиями.

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

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

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

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

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

Следующей мутацией, которую вносят в антитела в соответствии с настоящим изобретением, является мутация S241P. Ранее было показано, что эта мутация уменьшает образование половинных молекул (Angal S. et al., 1993. A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody. Mol. Immunol., 30, 105-108). Неожиданно было открыто, что мутантные антитела по настоящему изобретению, которые содержат мутацию S241P, демонстрируют некоторый обмен тяжелыми цепями *in vitro* в жестких восстанавливающих условиях по сравнению с IgG4 P (IgG4 с S241P). Это позволяет получение биспецифических антител *in vitro* из мутантных IgG4-антител по настоящему изобретению. Антитела в соответствии с настоящим изобретением могут содержать одну или несколько дополнительных мутаций в шарнирной области. Например, антитела могут дополнительно содержать одну или несколько из следующих мутаций: S227P, Y229S, P237D и P238K.

В одном из вариантов осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением по существу содержит шарнирную область IgG1 в остатках 226-243 (верхняя шарнирная область и центральная шарнирная область). Таким образом, антитело по настоящему изобретению содержит шарнирную область, где глицин в положении 230 заменен на цистеин, серин в положении 227 заменен пролином, тирозин в положении 229 заменен серином, пролин в положении 237 заменен аспарагиновой кислотой, пролин в положении 238 заменен лизином, аминокислотная последовательность треонин-гистидин-треонин встроена между положениями 238 и 239, и серин в положении 241 заменен пролином. Эти мутации также могут быть обозначены как S227P, Y229S, G230C, P237D, P238KTHT и S241P, как показано на фиг. 2a. Было обнаружено, что внесение этих дополнительных мутаций в шарнирную область IgG4 обеспечивает антитело, обладающее увеличенной термостабильностью.

Антитело в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно имеет нижнюю шарнирную область IgG4 в остатках с 244 по 251 (APEFLGGP SEQ ID NO:229). Без связи с теорией полагают, что нижняя шарнирная область IgG4 вносит вклад в отсутствие эффекторной функции IgG4-антитела.

Во втором аспекте настоящего изобретения предусматривается симметричное биспецифическое антитело, где в одной или обеих тяжелых цепях межцепочечный цистеин в положении 127 заменен на другую аминокислоту, как описано выше, и цистеин в положении 239 или цистеин в положении 242 при нумерации по системе нумерации Kabat в тяжелой цепи заменен на другую аминокислоту. В этом втором аспекте ни один из остатков в положениях 227, 228, 229 и 230 не замещен остатком цистеина.

Симметричное биспецифическое антитело класса IgG4, содержащее две тяжелых цепи, каждая из которых содержит вариабельный домен, домен C_H1 и шарнирную область, где в каждой тяжелой цепи межцепочечный цистеин в положении 127 при нумерации по системе нумерации Kabat заменен на другую аминокислоту; и цистеин в положении 239 и/или цистеин в положении 242 при нумерации по системе нумерации Kabat заменен на другую аминокислоту, где последовательности константной области каждой тяжелой цепи являются сходными или идентичными, а вариабельные области в каждой тяжелой цепи различаются.

Неожиданно было обнаружено, что антитела согласно второму аспекту настоящего изобретения обладают увеличенной термостабильностью по сравнению с IgG4-антителом дикого типа.

Во втором аспекте настоящего изобретения антитело может содержать одну или несколько дополнительных мутаций. В одном из вариантов осуществления антитело содержит тяжелую цепь IgG4, в которую внесена мутация для встраивания трех аминокислот между аминокислотами 226-243, предпочтительно, между аминокислотами 238 и 239, как описано выше. В следующем варианте осуществления антитело содержит мутацию S241P. В следующем варианте осуществления антитело может дополнительно содержать одну или несколько из следующих мутаций S227P, Y229S, P237D и P238R.

На фиг. 3а и 4а также представлены мутации, внесенные в IgG4-антитела в соответствии с настоящим изобретением. На фиг. 3b и 4b представлены положения остатков цистеина в IgG4-антителах по настоящему изобретению и также представлены предсказанные связи цистеина с цистеином в легкой цепи (LC) или другой тяжелой цепи (HC). Для остатков цистеина, которые представлены (LC или HC), также возможно, что цистеин связывается с цистеином в легкой цепи или тяжелой цепи, но либо LC, либо HC, когда они подчеркнуты, как полагают, являются участками, где дисульфидная связь преимущественно встречается.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к антителу, содержащему две тяжелых цепи, каждая из которых содержит вариабельную область, домен C_H1 и шарнирную область, и каждая тяжелая цепь содержит мутации антитела, выбранные из 2, 3, 6, 7, 8, 15, 16, 28, 28P, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 44, 44P, 45, 46, 47 и 48, как показано в табл. 1. Таким образом, настоящее изобретение относится к антителу, содержащему две тяжелых цепи, каждая из которых содержит вариабельную область, домен C_H1 и шарнирную область, и каждая тяжелая цепь содержит одну из следующих последовательностей: SEQ ID NO:243, SEQ ID NO:244, SEQ ID NO:245, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248, SEQ ID NO:249, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251, SEQ ID NO:252, SEQ ID NO:253, SEQ ID NO:254, SEQ ID NO:255, SEQ ID NO:256, SEQ ID NO:257, SEQ ID NO:258, SEQ ID NO:259, SEQ ID NO:260, SEQ ID NO:261, SEQ ID NO:262, SEQ ID NO:263, SEQ ID NO:264, SEQ ID NO:265, SEQ ID NO:266, SEQ ID NO:267 и SEQ ID NO:268.

В предпочтительном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению содержит две тяжелых цепи, каждая из которых содержит вариабельную область, домен C_H1 и шарнирную область, и содержит одну из следующих последовательностей: SEQ ID NO:243, SEQ ID NO:244, SEQ ID NO:245, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248, SEQ ID NO:249, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251, SEQ ID NO:252, SEQ ID NO:253, SEQ ID NO:254, SEQ ID NO:255, SEQ ID NO:256, SEQ ID NO:257, SEQ ID NO:258, SEQ ID NO:259, SEQ ID NO:260, SEQ ID NO:261, SEQ ID NO:262, SEQ ID NO:263, SEQ ID NO:264, SEQ ID NO:265, SEQ ID NO:266, SEQ ID NO:267 и SEQ ID NO:268. Более предпочтительно, антитело по настоящему изобретению содержит две тяжелых цепи, каждая из которых содержит вариабельную область, домен C_H1 и шарнирную область, и каждая тяжелая цепь содержит одну из следующих последовательностей: SEQ ID NO:243, SEQ ID NO:244, SEQ ID NO:245, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248, SEQ ID NO:249, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251, SEQ ID NO:252, SEQ ID NO:253, SEQ ID NO:254, SEQ ID NO:255, SEQ ID NO:256, SEQ ID NO:257, SEQ ID NO:258, SEQ ID NO:259, SEQ ID NO:260, SEQ ID NO:261, SEQ ID NO:262, SEQ ID NO:263, SEQ ID NO:264, SEQ ID NO:265, SEQ ID NO:266, SEQ ID NO:267 и SEQ ID NO:268.

В следующем предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антителу, содержащему две тяжелых цепи, каждая из которых содержит вариабельную область, домен C_H1, шарнирную область, домен C_H2 и домен C_H3, и каждая тяжелая цепь содержит мутации антитела, выбранные из 2, 3, 6, 7, 8, 15, 16, 28, 28P, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 44, 44P, 45, 46, 47 и 48, как показано в табл. 1. Таким образом, настоящее изобретение относится к антителу, содержащему две тяжелых цепи, каждая из которых содержит вариабельную область, домен C_H1, шарнирную область, домен C_H2 и домен C_H3, и каждая тяжелая цепь содержит одну из следующих последовательностей: SEQ ID NO:281, SEQ ID NO:282, SEQ ID NO:283, SEQ ID NO:284, SEQ ID NO:285, SEQ ID NO:286, SEQ ID NO:287, SEQ ID NO:288, SEQ ID NO:289, SEQ ID NO:290, SEQ ID NO:291, SEQ ID NO:292, SEQ ID NO:293, SEQ ID NO:294, SEQ ID NO:295, SEQ ID NO:296, SEQ ID NO:297, SEQ ID NO:298, SEQ ID NO:299, SEQ ID NO:300, SEQ ID NO:301, SEQ ID NO:302, SEQ ID NO:303, SEQ ID NO:304, SEQ ID NO:305 и SEQ ID NO:306.

Особенно предпочтительное антитело по настоящему изобретению содержит две тяжелых цепи, каждая из которых содержит вариабельную область, домен C_H1 и шарнирную область, где тяжелая цепь содержит SEQ ID NO:36 (антитело 28P), SEQ ID NO:37 (антитело 44P) или SEQ ID NO:35 (антитело 48). Следующее особенно предпочтительное антитело по настоящему изобретению содержит две тяжелых цепи, каждая из которых содержит вариабельную область, домен C_H1, шарнирную область, домен C_H2 и домен C_H3, где тяжелая цепь содержит SEQ ID NO:62 (антитело 28P), SEQ ID NO:63 (антитело 44P) или SEQ ID NO:61 (антитело 48). Антитела 28P, 44P и 48 являются особенно предпочтительными, поскольку они проявляют значительно увеличенную термостабильность и, кроме того, проявляют уменьшенное образование половинных молекул.

В табл. 1 ниже приведены иллюстративные антитела с мутациями, которые были внесены, по срав-

нению с последовательностью IgG4 дикого типа. Также табл. 1 включает антитела IgG1 и IgG4 дикого типа и контрольные антитела.

Таблица 1

Номер антитела	Мутации тяжелой цепи (нумерация Kabat)	Домен C _H 1 и шарнирная область, SEQ ID NO:	C _H 1, шарнирная область, C _H 2 и C _H 3, SEQ ID NO:
1	C127S	269	307
2	C127S, C239S	264	302
3	C127S, C242S	265	303
4	C127S, C242S, C239S	270	308
5	G230C	271	309
5P	G230C, S241P	272	310
6	C127S, G230C, C239S	243	281
7	C127S, G230C, C242S	244	282
8	C127S, G230C, C239S, C242S	245	283
9	G230C, C239S	273	311
10	G230C, C242S	274	312
11	G230C, C239S, C242S	275	313
12	C239S	276	314
13	C242S	277	315
14	C239S, C242S	278	316
15	C127S, G230C	246	284
16	C127S, G230C, S241P	247	285
17	IgG4 человека дикого типа	227	–
18	S241P	–	–
19	IgG1 человека дикого типа	226	–
28	C127S Y229C	248	286
28P	C127S Y229C, S241P	267	305
29	C127S Y229C C239S	249	287
30	C127S Y229C C242S	250	288
31	C127S Y229C C239S C242S	251	289
32	C127S K228C	252	290
33	C127S K228C C239S	253	291

34	C127S K228C C242S	254	292
35	C127S K228C C239S C242S	255	293
36	C127S S227C	256	294
37	C127S S227C C239S	257	295
38	C127S S227C C242S	258	296
39	C127S S227C C239S C242S	259	297
44	C127S G230C P238PAAA	260	298
44P	C127S G230C P238PAAA, S241P	268	306
45	C127S G230C P238PAAA C239S	261	299
46	C127S G230C P238PAAA C242S	262	300
47	C127S G230C P238PAAA C239S C242S	263	301
48	C127S, S227P, Y229S, G230C, P237D, P238KTHT, S241P	266	304
49	C127S G230C P238PA		
50	C127S G230C P238PAA S241P		
51	C127S, G230C, P238PAAAA		
52	C127S, G230C, P238PAAAAA		
55	C127S, G230C, P238PTHT		
56	C127S, G230C, P237D, P238KTHT		
57	C127S, G230C, P238PGGG		
60	C127S, S227P, G230C		
62	C127S, Y229S, G230C		
64	C127S, S227P, Y229S, G230C		
65	C127S, S227P, Y229S, G230C, P237D, P238KTHT		
66	C127S, G230C, P237D, P238KTH		
67	C127S, G230C, P237D, P238KT		
68	C127S, G230C, P237D, P238K		
69	C127S, G230C P237D, P238KAAA		
71	C127S, S227P, G230C, P237D, P238KTHT		
73	C127S, Y229S, G230C, P237D, P238KTHT		
74	центральная шарнирная область C127S Y229C SPPCP		
75	центральная шарнирная область C127S G230C CPPSP		
76	центральная шарнирная область C127S Y229C CPPSP		
77	центральная шарнирная область C127S G230C SPPCP		

На фиг. 3а и 4а также представлены мутации, внесенные в IgG4-антитела в соответствии с настоящим изобретением. На фиг. 3b и 4b представлены положения остатков цистеина в IgG4-антителах по

настоящему изобретению и также представлены предсказанные связи цистеина с цистеином в легкой цепи (LC) или другой тяжелой цепи (HC). Для остатков цистеина, которые представлены (LC или HC), также возможно, что цистеин связывается с цистеином в легкой цепи или тяжелой цепи, но либо LC, либо HC, когда они подчеркнуты, как полагают, являются участками, где дисульфидная связь преимущественно встречается.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антителу, содержащему две тяжелых цепи, каждая из которых содержит вариабельную область, домен C_H1 и шарнирную область, и каждая тяжелая цепь содержит мутации антитела, выбранные из 2, 3, 6, 7, 8, 15, 16, 28, 28P, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 44, 44P, 45, 46, 47 и 48, как показано в табл. 1. Таким образом, настоящее изобретение относится к антителу, содержащему две тяжелых цепи, каждая из которых содержит вариабельную область, домен C_H1 и шарнирную область, и каждая тяжелая цепь содержит одну из следующих последовательностей: SEQ ID NO:243, SEQ ID NO:244, SEQ ID NO:245, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248, SEQ ID NO:249, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251, SEQ ID NO:252, SEQ ID NO:253, SEQ ID NO:254, SEQ ID NO:255, SEQ ID NO:256, SEQ ID NO:257, SEQ ID NO:258, SEQ ID NO:259, SEQ ID NO:260, SEQ ID NO:261, SEQ ID NO:262, SEQ ID NO:263, SEQ ID NO:264, SEQ ID NO:265, SEQ ID NO:266, SEQ ID NO:267 и SEQ ID NO:268.

В предпочтительном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению содержит две тяжелых цепи, каждая из которых содержит вариабельную область, домен C_H1 и шарнирную область, и содержит одну из следующих последовательностей: SEQ ID NO:243, SEQ ID NO:244, SEQ ID NO:245, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248, SEQ ID NO:249, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251, SEQ ID NO:252, SEQ ID NO:253, SEQ ID NO:254, SEQ ID NO:255, SEQ ID NO:256, SEQ ID NO:257, SEQ ID NO:258, SEQ ID NO:259, SEQ ID NO:260, SEQ ID NO:261, SEQ ID NO:262, SEQ ID NO:263, SEQ ID NO:264, SEQ ID NO:265, SEQ ID NO:266, SEQ ID NO:267 и SEQ ID NO:268. Более предпочтительно, антитело по настоящему изобретению содержит две тяжелых цепи, каждая из которых содержит вариабельную область, домен C_H1 и шарнирную область, и каждая тяжелая цепь содержит одну из следующих последовательностей: SEQ ID NO:243, SEQ ID NO:244, SEQ ID NO:245, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248, SEQ ID NO:249, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251, SEQ ID NO:252, SEQ ID NO:253, SEQ ID NO:254, SEQ ID NO:255, SEQ ID NO:256, SEQ ID NO:257, SEQ ID NO:258, SEQ ID NO:259, SEQ ID NO:260, SEQ ID NO:261, SEQ ID NO:262, SEQ ID NO:263, SEQ ID NO:264, SEQ ID NO:265, SEQ ID NO:266, SEQ ID NO:267 и SEQ ID NO:268.

В следующем предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антителу, содержащему две тяжелых цепи, каждая из которых содержит вариабельную область, домен C_H1, шарнирную область, домен C_H2 и домен C_H3, и каждая тяжелая цепь содержит мутации антитела, выбранные из 2, 3, 6, 7, 8, 15, 16, 28, 28P, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 44, 44P, 45, 46, 47 и 48, как показано в табл. 1. Таким образом, настоящее изобретение относится к антителу, содержащему две тяжелых цепи, каждая из которых содержит вариабельную область, домен C_H1, шарнирную область, домен C_H2 и домен C_H3, и каждая тяжелая цепь содержит одну из следующих последовательностей: SEQ ID NO:281, SEQ ID NO:282, SEQ ID NO:283, SEQ ID NO:284, SEQ ID NO:285, SEQ ID NO:286, SEQ ID NO:287, SEQ ID NO:288, SEQ ID NO:289, SEQ ID NO:290, SEQ ID NO:291, SEQ ID NO:292, SEQ ID NO:293, SEQ ID NO:294, SEQ ID NO:295, SEQ ID NO:296, SEQ ID NO:297, SEQ ID NO:298, SEQ ID NO:299, SEQ ID NO:300, SEQ ID NO:301, SEQ ID NO:302, SEQ ID NO:303, SEQ ID NO:304, SEQ ID NO:305 и SEQ ID NO:306.

Особенно предпочтительное антитело по настоящему изобретению содержит две тяжелых цепи, каждая из которых содержит вариабельную область, домен C_H1 и шарнирную область, где тяжелая цепь содержит SEQ ID NO:267 (антитело 28P), SEQ ID NO:268 (антитело 44P) или SEQ ID NO:266 (антитело 48). Следующее особенно предпочтительное антитело по настоящему изобретению содержит две тяжелых цепи, каждая из которых содержит вариабельную область, домен C_H1, шарнирную область, домен C_H2 и домен C_H3, где тяжелая цепь содержит SEQ ID NO:305 (антитело 28P), SEQ ID NO:306 (антитело 44P) или SEQ ID NO:304 (антитело 48). Антитела 28P, 44P и 48 являются особенно предпочтительными, поскольку они проявляют значительно увеличенную термостабильность и, кроме того, проявляют сниженное образование половинных молекул.

Было показано, что антитела 2, 3 и 8 образуют значительное количество так называемых половинных молекул (HL). Эти мутанты могут образовывать целые молекулы антител (H2L2) *in vitro* в неденатурирующих условиях, однако любые нековалентные связи между тяжелыми цепями и/или между тяжелыми и легкими цепями устраняются в невосстанавливающих условиях SDS-PAGE. В то время как часто полагают, что является желательным снижение образования половинных молекул, антитела, которые обладают увеличенной тенденцией к образованию половинных молекул, могут быть преимущественными для определенных применений. Антитела, которые формируют стабильные половинные молекулы (HL) и мало или ни одного целого антитела (H2L2) вследствие того, что тяжелая цепь неспособна образовывать ковалентную или нековалентную связь с другой тяжелой цепью, представляют особый интерес. Антитела, которые образуют стабильные половинные молекулы, могут быть преимущественными для получения одновалентных антител. Антитела, которые образуют половинные молекулы, также могут

обеспечить подходящий способ получения биспецифического антитела вследствие образования целых антител из половинных молекул, обладающих различной специфичностью, где целое антитело является биспецифическим и одновалентным для каждого антигена. Тяжелые цепи такого биспецифического антитела могут быть связаны нековалентно.

В антителе 3 сохранен C239 в шарнирной области, однако оно оказалось неспособным образовывать дисульфидные связи между тяжелыми цепями, предположительно вследствие эффективного образования дисульфидной связи между С-концевым остатком цистеина легкой цепи и C239 шарнирной области. Сравнение антител 2 и 3 демонстрирует степень "вытягивания" С-концевого цистеина легкой цепи, поскольку легкая цепь более эффективно образует дисульфидные связи с C239, чем с C242, в шарнирной области. Более того, антитело 3 демонстрирует увеличенную стабильность по сравнению с антителом 2.

Хотя мутантные антитела в соответствии с настоящим изобретением описаны в отношении изотипа IgG4, квалифицированному специалисту будет понятно, что мутации, внесенные в IgG4-антитело, можно применять к другим изотипам или классам антител, которые обладают тем же расположением дисульфидных связей, что и у антитела IgG4, для получения улучшенного антитела. Конкретные примеры антител, которые обладают тем же расположением дисульфидных связей, что и IgG4-антитело, представляют собой IgG3-антитела, IgM-антитела и IgD-антитела. Как показано на фиг. 1b, IgG3 и IgM имеют цистеин в положении 127 в домене C_H1, и IgD имеет цистеин в положении 128 в домене C_H1, который эквивалентен C127 в домене C_H1 IgG4, который образует межцепочечную дисульфидную связь в легкой цепи. Кроме того, также на фиг. 1b можно видеть, что верхние шарнирные области IgG3 и IgD, и С-концевая область домена C_H1 и N-концевая область домена C_H2 в IgM не содержат остатка цистеина, который эквивалентен остаткам верхней шарнирной области IgG1. Таким образом, настоящее изобретение, кроме того, относится к IgG3-антителу, IgD-антителу и IgM-антителу, где цистеин в домене C_H1, который образует межцепочечную дисульфидную связь с цистеином в легкой цепи, замещен другой аминокислотой, и где одна или несколько аминокислот, которые находятся в структурно аналогичном положении относительно верхней шарнирной области IgG1 или IgG4, заменены на цистеин.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к асимметричному биспецифическому антителу класса IgG3, содержащему две тяжелых цепи, каждая из которых содержит вариабельную область, домен C_H1 и шарнирную область, где в каждой тяжелой цепи:

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

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

где последовательности константной области каждой тяжелой цепи являются сходными или идентичными, а вариабельные области в каждой тяжелой цепи различаются.

В предпочтительном варианте осуществления аспекта настоящего изобретения IgG3-антитела, цистеин в домене C_H1, который образует межцепочечную дисульфидную связь с цистеином в легкой цепи, представляет собой цистеин в положении 127, при нумерации по системе нумерации Kabat, как показано на фиг. 1b и 2b.

В предпочтительном варианте осуществления аспекта настоящего изобретения IgG3-антитела, одна или несколько аминокислот, расположенных в верхней шарнирной области, которые могут быть заменены на цистеин, представляют собой одну или несколько аминокислот в положениях, выбранных из 226, 227, 228, 229, 230, 232 и 233, при нумерации по системе нумерации Kabat, как показано на фиг. 1b и 2b.

Кроме того, настоящее изобретение относится к симметричному биспецифическому антителу класса IgM, содержащему две тяжелых цепи, каждая из которых содержит вариабельную область, домен C_H1 и домен C_H2, где в каждой тяжелой цепи:

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

б) одна или несколько аминокислот, расположенных в домене C_H1 или домене C_H2, заменена на цистеин,

где последовательности константной области каждой тяжелой цепи являются сходными или идентичными, а вариабельные области в каждой тяжелой цепи различаются.

В предпочтительном варианте осуществления аспекта изобретения IgM-антитела, цистеин в домене C_H1, который образует межцепочечную связь с цистеином в легкой цепи, представляет собой цистеин в положении 127 при нумерации по системе нумерации Kabat, как показано на фиг. 1b и 2c.

В предпочтительном варианте осуществления аспекта настоящего изобретения IgM-антитела, одна или несколько аминокислот, расположенных на С-конце домена C_H1 или N-конце домена C_H2, заменены на цистеин. Предпочтительное положение аминокислот на С-конце домена C_H1, который может быть заменен на цистеин, представляют собой одно или несколько положений аминокислот, выбранных из 223, 223A, 223B и 223C, при нумерации по системе нумерации Kabat, как показано на фиг. 1b и 2c. Предпочтительное положение аминокислот на N-конце домена C_H2, которые могут быть заменены на цистеин, представляют собой одно или несколько положений аминокислот, выбранных из 243G, 243H и 243I

при нумерации по системе нумерации Kabat, как показано на фиг. 1b и 2c. Таким образом, любые одна или несколько из аминокислот 223-243 могут быть заменены на цистеин.

Кроме того, настоящее изобретение относится к симметричному биспецифическому антителу класса IgD, содержащему две тяжелых цепи, каждая из которых содержит вариабельную область, домен C_H1 и шарнирную область, где в каждой тяжелой цепи:

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

б) одна или несколько аминокислот, расположенных в шарнирной области, заменены на цистеин, где последовательности константной области каждой тяжелой цепи являются сходными или идентичными, а вариабельные области в каждой тяжелой цепи различаются.

В предпочтительном варианте осуществления аспекта настоящего изобретения IgD-антитела, цистеин в домене C_H1 , который образует межцепочечную дисульфидную связь с цистеином в легкой цепи, представляет собой цистеин в положении 128 при нумерации по системе нумерации Kabat, как показано на фиг. 1b и 2d.

Шарнирная область IgD-антитела может быть определена как R224-P243, по системе нумерации Kabat.

В предпочтительном варианте осуществления аспекта настоящего изобретения IgD-антитела, одна или несколько аминокислот, расположенных в шарнирной области, которые заменены на цистеин, представляют собой одну или несколько из аминокислот в положениях, выбранных из 227, 228, 229, 230, 231, 232 и 233, при нумерации по системе нумерации Kabat, как показано на фиг. 1b и 2d.

Антитела IgG3, IgD или IgM, предусматриваемые настоящим изобретением, могут содержать одну или несколько дополнительных мутаций шарнирной области, как рассмотрено выше в отношении IgG4-антитела.

В этом аспекте настоящего изобретения антитело, предпочтительно, принадлежит классу IgG4.

Термин "антитело", как используют в рамках изобретения, включает интактные (целые) антитела и функционально активные фрагменты, которые содержат две тяжелых цепи, каждая из которых содержит домен V_H , домен C_H1 и шарнирную область. Антитело в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно, содержит по меньшей мере одну легкую цепь. Таким образом, термин "антитело" в рамках настоящего изобретения охватывает двух-, трех- или четырехвалентные антитела, димер Fab'- и $F(ab')_2$ -фрагментов и целые молекулы антител, содержащие две пары легких и тяжелых цепей.

Как хорошо известно в данной области, типичная молекула Fab' содержит пару тяжелой и легкой цепи, в которой тяжелая цепь содержит вариабельную область V_H , константный домен C_H1 и шарнирную область, и легкая цепь содержит вариабельную область V_L и константный домен C_L .

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

В одном из вариантов осуществления тяжелая цепь содержит домен C_H2 и домен C_H3 , и необязательно домен C_H4 . В одном из вариантов осуществления антитело содержит две тяжелых цепи, каждая из которых является такой, как определено выше в первом или втором аспекте настоящего изобретения. Антитела в соответствии с настоящим изобретением также, предпочтительно, содержат две легких цепи, где константные области легких цепей, предпочтительно, являются идентичными. В этом варианте осуществления, где антитело содержит две тяжелых цепи и две легких цепи, предпочтительно, обе последовательности константной области тяжелой цепи являются идентичными, как определено выше для первого и второго аспектов настоящего изобретения, и обе последовательности константной области легкой цепи являются идентичными.

В предпочтительном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению представляет собой целое антитело, содержащее две легких цепи и две тяжелых цепи, где каждая тяжелая цепь содержит IgG4 C_H1 , где цистеин в положении 127 при нумерации по системе нумерации Kabat заменен на другую аминокислоту, верхнюю и среднюю шарнирные области IgG1, нижнюю шарнирную область IgG4, домен C_H2 и домен C_H3 .

Полная шарнирная область IgG4-антитела, как правило, состоит из остатков 226-251 (нумерация по системе нумерации Kabat). Однако шарнирная область может быть укороченной или удлиненной при необходимости. Например, в антителах в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения аминокислота дикого типа заменена остатком цистеина в положении 227, 228, 229 или 230, шарнирная область может оканчиваться после нового остатка цистеина в положении 227, 228, 229 или 230. Антитела в соответствии с настоящим изобретением также могут содержать одну или несколько дополнительных аминокислот, расположенных на N-конце и/или C-конце шарнирной области. Кроме того, можно контролировать другие характеристики шарнирной области, такие как расстояние остатков цистеина(ов) от межцепочечного цистеина легких цепей, расстояние между остатками цистеина шарнирной области, и состав других аминокислот в шарнирной области, которые могут влиять на свойства шарнирной области, такие как гибкость, например, остатки глицина можно включать в шарнирную область для увеличения гибкости при вращении, или остатки пролина можно включать для уменьшения гибкости. Альтернативно в шарнирную область можно включать заряженные или гидрофобные остатки для сообщения свойств

мультиверизации или очистки. Другие модифицированные шарнирные области могут быть полностью синтетическими и могут быть сконструированы так, чтобы они обладали желаемыми свойствами, такими как длина, композиция и гибкость.

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

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

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

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

В одном из вариантов осуществления каждая тяжелая цепь содержит домен C_H2 IgG4 и домен C_H3 IgG1, как показано в SEQ ID NO:280.

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

В одном из вариантов осуществления мутации в положении C127 в домene C_H1 можно вносить в эквивалентные положения других изотипов IgG (1, 2, 3) или других классов антител. Эти мутантные антитела могут содержать одну или несколько дополнительных мутаций, например, в шарнирной области, и/или домene C_H2, и/или домene C_H3. Примеры конкретных мутаций в шарнирной области и доменах C_H2 и C_H3 описаны ранее в отношении других аспектов настоящего изобретения.

Конкретными примерами описанных выше мутантных антител являются мутантные IgG4-антитела 4, 5, 5P, 9, 10, 11 и 14, приведенные в табл. 1.

Таким образом, настоящее изобретение относится к антителу, содержащему две тяжелых цепи, где каждая тяжелая цепь содержит домен C_H1 и шарнирную область и каждая тяжелая цепь содержит мутации антитела, выбранные из 4, 5, 5P, 9, 10, 11 и 14, как показано в табл. 1. Таким образом, настоящее изобретение относится к антителу, содержащему две тяжелых цепи, где каждая тяжелая цепь содержит домен C_H1 и шарнирную область, и каждая тяжелая цепь содержит одну из следующих последовательностей: SEQ ID NO:270, SEQ ID NO:271, SEQ ID NO:272, SEQ ID NO:273, SEQ ID NO:274, SEQ ID NO:275 и SEQ ID NO:276.

В следующем варианте осуществления настоящее изобретение относится к антителу, содержащему две тяжелых цепи, где каждая тяжелая цепь содержит домен C_H1, шарнирную область, домен C_H2 и домен C_H3, и каждая тяжелая цепь содержит мутации в антителе, выбранном из 4, 5, 5P, 9, 10, 11 и 14, как показано в табл. 1. Таким образом, настоящее изобретение относится к антителу, содержащему две тяжелых цепи, где каждая тяжелая цепь содержит домен C_H1, шарнирную область, домен C_H2 и домен C_H3, и каждая тяжелая цепь содержит одну из следующих последовательностей: SEQ ID NO:308, SEQ ID NO:309, SEQ ID NO:310, SEQ ID NO:311, SEQ ID NO:312, SEQ ID NO:313 и SEQ ID NO:316.

Было показано, что антитела 4 (C127S, C239S и C242S) и 14 (C239S и C242S) образуют значительное количество так называемых половинных молекул (HL). Эти мутанты могут образовывать целые молекулы антител (H2L2) *in vitro* в невозстанавливающих условиях, но любые ассоциации между тяжелыми цепями и/или между тяжелой и легкой цепями устраняются в невозстанавливающих условиях SDS-PAGE. Хотя часто полагают, что является желательным снижение образования половинных молекул, антитела, которые имеют увеличенную тенденцию к образованию половинных молекул, могут быть преимущественными для определенных применений, например образование половинных молекул *in vitro* может способствовать обмену тяжелыми цепями и способствовать получению биспецифических IgG4-антител в соответствии с настоящим изобретением.

Также было показано, что антитела 2, 3 и 8, как описано выше, образуют значительные количества половинных молекул и, таким образом, их также можно использовать в случаях, где является желательным образование половинных молекул.

В антителе 3 сохранен C239 в шарнирной области, однако оно оказалось неспособным образовывать дисульфидные связи между тяжелыми цепями, предположительно вследствие эффективного образования дисульфидной связи между С-концевым остатком цистеина легкой цепи и C239 шарнирной об-

ласти. Сравнение антител 2 и 3 демонстрирует степень "вытягивания" С-концевого цистеина легкой цепи, поскольку легкая цепь более эффективно образует дисульфидные связи с C239, чем с C242, в шарнирной области. Более того, антитело 3 демонстрирует увеличенную стабильность по сравнению с антителом 2.

Антитела 5 (G230C), 5P (G230C и S241P), 9 (G230C и C239S), 10 (G230C и C242S) и 11 (G230C, C239S и C242S) содержат два остатка цистеина (цистеин в положении 127 в C_H1 и в положении 230 в верхней шарнирной области), с которым цистеин в легкой цепи может образовывать дисульфидную связь. Таким образом, эти антитела могут содержать не связанный дисульфидной связью цистеин в C_H1 или шарнирной области тяжелой цепи, который можно преимущественно использовать для связывания эффекторной молекулы с не связанным дисульфидной связью цистеином. Кроме того, антитело 5 содержит два остатка цистеина шарнирной области в положениях C239 и C242 и, таким образом, оно является устойчивым к стадии мягкого восстановления, активирующей свободный тиол не связанного дисульфидной связью цистеина для встраивания эффекторной молекулы. Кроме того, антитело 11 не содержит остатков цистеина шарнирной области в положениях 239 и 242, и, таким образом, это снижает вероятность связывания каких-либо эффекторных молекул с этими положениями в шарнирной области.

Термин "антитело", как используют в рамках изобретения, включает интактные (целые) антитела и функционально активные фрагменты, которые содержат две тяжелых цепи, каждая из которых содержит домен V_H, домен C_H1 и шарнирную область. Антитело в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно, содержит по меньшей мере одну легкую цепь. Таким образом, термин "антитело" в рамках настоящего изобретения охватывает двух-, трех- или четырехвалентные антитела, фрагменты Fab' и F(ab')₂, половинные молекулы антител или половинные молекулы, содержащие одну пару легкой цепи и тяжелой цепи, и целые молекулы антител, содержащие две пары легкой цепи и тяжелой цепи.

Как хорошо известно в данной области, типичная молекула Fab' содержит пару тяжелой и легкой цепи, в которой тяжелая цепь содержит переменную область V_H, константный домен C_H1 и шарнирную область, и легкая цепь содержит переменную область V_L и константный домен C_L. В одном из вариантов осуществления предусматривается димер Fab' по настоящему изобретению, например димеризация может происходить через шарнирную область.

В одном из вариантов осуществления тяжелая цепь содержит домен C_H2 и домен C_H3, и необязательно домен C_H4. В одном из вариантов осуществления антитело содержит две тяжелых цепи, каждая из которых является такой, как определено выше в первом или втором аспекте настоящего изобретения. Антитела в соответствии с настоящим изобретением также, предпочтительно, содержат две легких цепи. В этом варианте осуществления, где антитело содержит две тяжелых цепи и две легких цепи, предпочтительно обе последовательности константной области тяжелой цепи являются идентичными, как определено выше для первого и второго аспектов настоящего изобретения.

В предпочтительном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению представляет собой целое антитело, содержащее две легких цепи и две тяжелых цепи, где каждая тяжелая цепь содержит IgG4 C_H1, где цистеин в положении 127 при нумерации по системе нумерации Kabat заменен на другую аминокислоту, верхнюю и среднюю шарнирные области IgG1, нижнюю шарнирную область IgG4, домен C_H2 и домен C_H3.

Полная шарнирная область IgG4-антитела, как правило, состоит из остатков 226-251 (нумерация на основе системы нумерации Kabat). Однако шарнирная область может быть укороченной или удлиненной при необходимости. Например, в антителах в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения аминокислота дикого типа заменена остатком цистеина в положении 227, 228, 229 или 230, шарнирная область может оканчиваться после нового остатка цистеина в положении 227, 228, 229 или 230. Антитела в соответствии с настоящим изобретением также могут содержать одну или несколько дополнительных аминокислот, расположенных на N-конце и/или С-конце шарнирной области. Кроме того, можно контролировать другие характеристики шарнирной области, такие как расстояние остатков цистеина(ов) от межцепочечного цистеина легких цепей, расстояние между остатками цистеина шарнирной области, и состав других аминокислот в шарнирной области, которые могут влиять на свойства шарнирной области, такие как гибкость, например, остатки глицина можно включать в шарнирную область для увеличения гибкости при вращении, или остатки пролина можно включать для уменьшения гибкости. Альтернативно в шарнирную область можно включать заряженные или гидрофобные остатки для сообщения свойств мультимеризации или очистки. Другие модифицированные шарнирные области могут быть полностью синтетическими и могут быть сконструированы так, чтобы они обладали желаемыми свойствами, такими как длина, композиция и гибкость.

Домены константной области, в частности в Fc-домене, когда он присутствует, используемые в рамках настоящего изобретения, предпочтительно, представляют собой домены изотипа IgG4, где эффекторные функции антител не требуются. Таким образом, каждая тяжелая цепь, предпочтительно, содержит домен C_H2 и домен C_H3 IgG4, как показано в SEQ ID NO:279.

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

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

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

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

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

Полностью человеческие антитела представляют собой антитела, в которых все варибельные области и константные области (когда они присутствуют) как тяжелой, так и легкой, цепей происходят из человека, или по существу идентичны последовательностям, происходящим из человека, необязательно из того же антитела. Примеры полностью человеческих антител могут включать антитела, полученные, например, способами фагового дисплея, описанными выше, и антитела, продуцированные мышами, в которых гены варибельной и/или константной области иммуноглобулинов мыши заменены их аналогами человека, например, как описано в общих терминах в EP 0546073 B1, US 5545806, US 5569825, US 5625126, US 5633425, US 5661016, US 5770429, EP 0438474 B1 и EP 0463151 B1.

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

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

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

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

Варибельные домены могут быть оптимизированными и/или гуманизированными.

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

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

молекулам.

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

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

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

В одном из вариантов осуществления молекулы антитела по настоящему изобретению содержат один или несколько связывающих альбумин пептидов. *In vivo* пептид связывает альбумин, который увеличивает время полужизни молекулы.

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

Примеры связывающих альбумин пептидов предоставлены в WO 2007/106120.

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

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

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

Примеры эффекторных молекул могут включать цитотоксины или цитотоксические средства, включая любое средство, которое является вредоносным (например, уничтожает) для клеток. Примеры включают комбретастины, доластатины, эпотилоны, стауроспорин, майтанзиноиды, спонгистатины, ризоксин, халихондрины, роридины, гемиастерлины, таксол, цитохалазин В, грамицидин D, бромид эти-

дия, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубин, даунорубин, дигидроксиантрацидион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, татракаин, лидокаин, пропранолол и пурамицин и их аналоги или гомологи.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Размер полимера можно варьировать, если желательно, однако, как правило, он имеет диапазон средней молекулярной массы от 500 до 50000 Да, например от 5000 до 40000 Да, как, например, от 20000 до 40000 Да. В частности, размер полимера можно выбирать, исходя из предполагаемого применения

продукта, например, способности локализоваться в определенных тканях, таких как опухоли, или продления половинного времени циркуляции (для обзора см. Chapman, 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 531-545). Таким образом, например, когда предполагается, что продукт покинет циркуляцию и проникнет в ткань, например, для применения для лечения опухоли, может быть преимущественным использование низкомолекулярного полимера, например с молекулярной массой приблизительно 5000 Да. Для применений, где продукт остается в кровотоке, может быть преимущественным использование более высокомолекулярного полимера, например, имеющего молекулярную массу в диапазоне от 20000 до 40000 Да.

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

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

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

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

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

В следующем аспекте предусматривается вектор, содержащий указанную ДНК.

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

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

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

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

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

Молекулы антител по настоящему изобретению экспрессируются на подходящих уровнях из кле-

ток-хозяев, что делает их подходящими для коммерческой обработки.

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

Растворимые антигены включают интерлейкины, такие как IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-13, IL-14, IL-16 или IL-17, такие как IL17A и/или IL17F, вирусные антигены, например антигены респираторного синцитиального вируса или цитомегаловируса, иммуноглобулины, такие как IgE, интерфероны, такие как интерферон α , интерферон β или интерферон γ , фактор некроза опухоли TNF (ранее известный как фактор некроза опухоли- α и обозначаемый в настоящем описании как TNF или TNF α), фактор некроза опухоли- β , колониестимулирующие факторы, такие как G-CSF или GM-CSF, и тромбоцитарные факторы роста, такие как PDGF- α и PDGF- β , WISP-1 и, когда это целесообразно, их рецепторы. Другие антигены включают бактериальные антигены клеточной поверхности, бактериальные токсины, вирусы, такие как вирус гриппа, EBV, HerA, B и C, агенты биологического оружия, радионуклиды и тяжелые металлы, и яды и токсины змей и пауков.

В одном из вариантов осуществления предусматривается способ получения симметричного биспецифического антитела, включающий стадию смешения первого IgG4-антитела со вторым IgG4-антителом *ex vivo* в условиях, способствующих обмену тяжелыми цепями, где антигенная специфичность переменных областей первого антитела отличается от антигенной специфичности переменных областей второго антитела.

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

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

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

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

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

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

В одном из вариантов осуществления предусматривается антитело или фрагмент, полученные или получаемые с помощью процесса или способа, описанных в настоящем описании.

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

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

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

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

Термин "воспалительное заболевание" или "нарушение" и "иммунное заболевание или нарушение"

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

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

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

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической или диагностической композиции, содержащей антитело по настоящему изобретению в комбинации с одним или несколькими из фармацевтически приемлемых эксципиентов, разбавителей или носителей. Таким образом, предусматривается применение антитела по изобретению для получения лекарственного средства. Композиция обычно предоставляет в качестве части стерильной фармацевтической композиции, которая обычно включает фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению, кроме того, может содержать фармацевтически приемлемый адъювант.

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

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

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

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

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

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

Доза, в которой вводят антитело по настоящему изобретению, зависит от природы состояния, подвергаемого лечению, например степени имеющегося заболевания/состояния, и от того, используют ли

молекулу профилактически или для лечения существующего состояния.

Частота дозирования зависит от времени полужизни антитела и длительности его эффекта. Если антитело обладает коротким временем полужизни (например, 2-10 ч), может быть необходимым введение одной или нескольких доз в сутки.

Альтернативно, если антитело обладает длительным временем полужизни (например, 2-15 суток), может быть необходимым введение дозировки один раз в сутки, один раз в неделю или даже один раз в 1 или 2 месяца.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

лемым эксципиентом.

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

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

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

Особенно подходящими газами-пропеллентами являются галогенированные производные алканов, выбранные из TG 11, TG 12, TG 134a и TG227. Из упомянутых выше галогенированных углеводородов TG134a (1,1,1,2-тетрафторэтан) и TG227 (1,1,1,2,3,3,3-гептафторпропан) и их смеси являются особенно подходящими.

Содержащие газы-пропелленты ингалируемые аэрозоли также могут содержать другие ингредиенты, такие как сорастворители, стабилизаторы, сурфактанты (поверхностно-активные вещества), антиоксиданты, смазывающие вещества и средства для коррекции pH. Все эти ингредиенты известны в данной области.

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

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

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

Терапевтические суспензии или составы растворов также могут содержать один или несколько эксципиентов. Эксципиенты хорошо известны в данной области и включают буферы (например, цитратный буфер, фосфатный буфер, ацетатный буфер и бикарбонатный буфер), аминокислоты, мочевины, спирты, аскорбиновую кислоту, фосфолипиды, белки (например, сывороточный альбумин), EDTA, хлорид натрия, липосомы, маннит, сорбит и глицерин. Растворы или суспензии могут быть инкапсулированы в липосомы или биodeградируемые микросферы. Состав, главным образом, может быть предоставлен, по существу, в стерильной форме с использованием стерильных процессов изготовления.

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

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

Полагают, что антители по настоящему изобретению являются особенно пригодным для доставки путем распыления.

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

Когда это технически приемлемо, варианты осуществления изобретения можно комбинировать.

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

Примеры

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

Аминокислотные мутации вносили с использованием набора Quickchange® Lightning Multi Site Di-

rected Mutagenesis (SDM) kit или набора Quickchange® II DSM kit (приобретенные в Stratagene®) (каталожные номера 210516 и 200521 соответственно) в соответствии с инструкциями изготовителя.

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

Номер антитела	Мутации тяжелой цепи (нумерация Kabat)	Домен C _H 1 и шарнирная область, SEQ ID NO:	C _H 1, шарнирная область, C _H 2 и C _H 3, SEQ ID NO:
1	C127S	269	307
2	C127S, C239S	264	302
3	C127S, C242S	265	303
4	C127S, C242S, C239S	270	308
5	G230C	271	309
5P	G230C, S241P	272	310
6	C127S, G230C, C239S	243	281
7	C127S, G230C, C242S	244	282
8	C127S, G230C, C239S, C242S	245	283
9	G230C, C239S	273	311
10	G230C, C242S	274	312
11	G230C, C239S, C242S	275	313
12	C239S	276	314
13	C242S	277	315
14	C239S, C242S	278	316
15	C127S, G230C	246	284
16	C127S, G230C, S241P	247	285
17	IgG4 человека дикого типа	227	–
18	S241P	–	–
19	IgG1 человека дикого типа	226	–
28	C127S Y229C	248	286
28P	C127S Y229C, S241P	267	305
29	C127S Y229C C239S	249	287
30	C127S Y229C C242S	250	288
31	C127S Y229C C239S C242S	251	289
32	C127S K228C	252	290
33	C127S K228C C239S	253	291
34	C127S K228C C242S	254	292
35	C127S K228C C239S C242S	255	293
36	C127S S227C	256	294
37	C127S S227C C239S	257	295
38	C127S S227C C242S	258	296
39	C127S S227C C239S C242S	259	297
44	C127S G230C P238PAAA	260	298
44P	C127S G230C P238PAAA, S241P	268	306
45	C127S G230C P238PAAA C239S	261	299
46	C127S G230C P238PAAA C242S	262	300
47	C127S G230C P238PAAA C239S C242S	263	301
48	C127S, S227P, Y229S, G230C, P237D, P238KTHT, S241P	266	304

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

2) Экспрессия мутантных IgG4-антител.

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

3) Очистка мутантных IgG4-антител.

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

4) Охарактеризация очищенных мутантных IgG4-антител.

Анализ SDS PAGE.

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

Результаты анализа с использованием вестерн-блоттинга представлены на фиг. 7-10. На фиг. 7-10, H означает тяжелую цепь, и L означает легкую цепь, H2L2 представляет собой молекулу целого антитела, содержащую две тяжелых цепи и две легких цепи, и HL представляет собой половинную молекулу, содержащую одну тяжелую цепь и одну легкую цепь.

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

На фиг. 8 представлен анализ с использованием вестерн-блоттинга для антител 15, 6, 7, 8, 28, 29, 30, 31, 17, 19, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 и 39. На фиг. 8 можно видеть, что антитела демонстрируют высокий уровень H2L2, за исключением антител 8, 31, 35 и 39, которые демонстрируют отсутствие или очень

мало H2L2 вследствие присутствия мутаций C239S и C242S в шарнирной области и, таким образом, отсутствия образования дисульфидных связей между двумя тяжелыми цепями. Однако антитела 8, 31, 35 и 39 могут образовывать H2L2 путем образования нековалентных связей между тяжелыми цепями. Также можно видеть, что антитела, которые содержат мутацию C239S, но не C242S (антитела 6, 29, 33 и 37) демонстрируют сниженное образование HL по сравнению с антителами, которые не содержат ни C239S, ни C242S, или с антителами, которые содержат C242S, но не C239S. Мутант 15 способен образовывать дисульфидную связь между легкой цепью и G230C в C_{H1} и дисульфидные связи между тяжелыми цепями, что, таким образом, приводит к полностью собранному и связанному дисульфидной связью белку. Более того, сравнение мутантов 15(C127S G230C), 28(C127S Y229C), 32 (C127S K228C) и 36(C127S S227C) демонстрирует, что положение внесенного цистеина в верхней шарнирной области увеличивает образование дисульфидных связей между LC-HC. G230 и Y229 являются особенно предпочтительными положениями для внесения цистеина. Мутант 28 (C127S Y229C) демонстрирует низкий уровень HL и H2 и, таким образом, обладает низкой гетерогенностью дисульфидных связей.

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

На фиг. 10 представлен анализ с использованием вестерн-блоттинга для антител 48, 17, 18 и 19. На фиг. 10 можно видеть, что антитело 48 демонстрирует высокий уровень H2L2 и очень мало HL. Мутант 48 содержит последовательность верхней шарнирной области IgG1 EPKSCDKTHT SEQ ID NO:320 вместо последовательности верхней шарнирной области IgG4 вместе с мутацией центральной шарнирной области S241P. Таким образом, мутант 48 имеет последовательность верхней и центральной шарнирной области EPKSCDKTHTCPPCP SEQ ID NO:321. Мутант 48 демонстрирует более низкие уровни гетерогенности дисульфидных связей по сравнению с антителом IgG4 дикого типа 17 и приблизительно эквивалентные низкие уровни гетерогенности дисульфидной связи по сравнению с мутантом S241P IgG4 18 и антителом IgG1 дикого типа 19.

Анализ ThermoFluor.

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

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

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

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

5) Обмен Fab-плечами.

а) Обмен тяжелыми цепями *in vitro*.

Первое IgG4-антитело и его потенциальный партнер по обмену смешивали в молярном соотношении 1:1 в общей концентрации 100 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере (PBS) (в mM: 150 NaCl, 10 NaH₂PO₄; pH 7,4). Для обеспечения восстановления дисульфидной связи образцы добавляли восстано-

ленным глутатионом (GSH; Sigma) до конечной концентрации 0, 0,5 или 5 mM. В начале эксперимента ($t=0$ ч) отбирали аликвоту смеси, гасили ее N-этилmaleимидом (NEM; Sigma) до конечной концентрации 10 mM (для инактивации потенциально реакционноспособных тиольных групп) и инкубировали с остатальной смесью в течение 16 ч при 37°C ($t=16$ ч). После инкубации образец при $t=16$ ч гасили, как описано выше.

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

Присутствие функционально активных биспецифических антител определяли с использованием сэндвич-анализа MSD, реакционные образцы после гашения, полученные согласно примеру 5 а), подвергнутые серийному разведению в 1% BSA в PBS (PB), предварительно инкубировали с 1 мкг/мл биотинилированного антигена 1 (антиген первого антитела) в PB в течение 1 ч при к.т. при встряхивании (200 об/мин), а затем переносили в предварительно блокированные покрытые стрептавидином планшеты для MSD с PB (Meso Scale Diagnostics). После инкубации в течение 1 ч при к.т. при встряхивании лунки промывали три раза посредством PBS/0,1% Tween-20, а затем инкубировали с 1 мкг/мл сульфомеченного антигена 2 (антиген второго антитела) в PB. После инкубации планшеты промывали, как описано выше, и сигналы выявляли и измеряли с использованием коммерческого буфера для считывания и устройства Image Sector 6000 соответственно. Фоновые величины, полученные в контрольных параллельных реакциях, в которых биотинилированный антиген был заменен небитинилированной альтернативой, вычитали из величин всех сигналов. Для всех вычислений использовали дублированные величины из по меньшей мере 3 независимых экспериментов. Чем более высоким является сигнал MSD, тем более высоким является уровень обмена тяжелыми цепями, который произошел.

Анализировали следующие антитела:

Антитело	Мутации по сравнению с IgG4 дикого типа
IgG1 wt (дикий тип)	–
IgG4 wt (дикий тип)	–
IgG4 P	S241P
Мутант IgG4 28	C127S Y229C
Мутант IgG4 28 P	C127S Y229C S241P
Мутант IgG4 15	C127S G230C
Мутант IgG4 44	C127S G230C P238PAAA
Мутант IgG4 44P	C127S G230C P238PAAA, S241P
Мутант IgG4 48	C127S, S227P, Y229S, G230C, P237D, P238KTNT, S241P

На фиг. 16-20 представлены результаты количественного определения обмена Fab-плечами *in vitro*, где на оси у представлен сигнал MSD, где более высокий уровень столбика указывает на более высокое количество обмена Fab-плечами.

На фиг. 16 представлен обмен тяжелыми цепями для IgG1 дикого типа, IgG4 дикого типа и мутантов IgG4P, 28, 15, 44, 44P и 48 при двух концентрациях GSH и в различные моменты времени.

На фиг. 17 представлен обмен тяжелыми цепями для IgG4 дикого типа и мутантов 15, 44 и 48 при двух концентрациях GSH в различные моменты времени. Можно видеть, что чем больше шарнирная область IgG4 является мутантной в направлении типа IgG1, тем больше снижается обмен, как показано для мутанта 48, имеющего наименьший обмен.

На фиг. 18 представлен обмен тяжелыми цепями для IgG4 дикого типа и мутантов 15 и 28 при двух концентрациях GSH в различные моменты времени. Можно видеть, что мутация в положении 229 (мутант 28) снижает обмен на протяжении 4-16 ч при обеих концентрациях восстановителя в большей степени, чем мутация в положении 230 (мутант 15).

На фиг. 19 представлено процентное изменение для мутантов IgG4P, 15, 28, 44 и 48 в 0,5 mM GSH по сравнению с IgG4 дикого типа. Обмен можно ранжировать следующим образом: IgG4 wt>15 = 44>48>28.

На фиг. 20 представлено процентное изменение для различных мутантов в 5 mM GSH по сравнению с IgG4 дикого типа. Обмен можно ранжировать как IgG4 wt>15 = 44>48>28.

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

Аффинность антитела.

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

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

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

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

Анализ с использованием эксклюзионной (SEC) ВЭЖХ.

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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное симметричное биспецифическое антитело класса IgG4 с улучшенной стабильностью по сравнению с диким типом антитела IgG4, содержащее две тяжелых цепи, каждая из которых содержит переменный домен, домен C_{H1} и шарнирную область, где в каждой тяжелой цепи

цистеин в домене C_{H1} , образующий межцепочечную дисульфидную связь с цистеином в легкой цепи, заменен на аминокислоту, не содержащую тиольную группу; и

одна или несколько аминокислот, расположенных в верхней шарнирной области, заменены на цистеин, где последовательности константной области каждой тяжелой цепи идентичны по меньшей мере на 95%, а переменные области в каждой тяжелой цепи различаются, и

где одна или более аминокислот, расположенных в верхней шарнирной области первой тяжелой цепи, замененных на цистеин, находятся в положениях, выбранных из 226, 227, 228, 229, 230, 237 и 238, при нумерации по системе нумерации Kabat.

2. Симметричное биспецифическое антитело по п.1, где шарнирная область представляет собой шарнирную область типа IgG1.

3. Симметричное биспецифическое антитело по п.1 или 2, где межцепочечный цистеин в положении 127 при нумерации по системе нумерации Kabat в домене C_{H1} в одной или обеих тяжелых цепях заменен на аминокислоту, не содержащую тиольную группу.

4. Симметричное биспецифическое антитело по любому из пп.1-3, где одна или несколько аминокислот, расположенных в верхней шарнирной области первой тяжелой цепи, замененных на цистеин, находятся в положениях, выбранных из 227, 228, 229 и 230 при нумерации по системе нумерации Kabat.

5. Симметричное биспецифическое антитело по п.4, где глицин в положении 230 при нумерации по системе нумерации Kabat заменен на цистеин.

6. Симметричное биспецифическое антитело по п.4, где тирозин в положении 229 при нумерации по системе нумерации Kabat заменен на цистеин.

7. Симметричное биспецифическое антитело по п.4, где лизин в положении 228 при нумерации по системе нумерации Kabat заменен на цистеин.

8. Симметричное биспецифическое антитело по п.4, где серин в положении 227 при нумерации по системе нумерации Kabat заменен на цистеин.

9. Симметричное биспецифическое антитело по любому из пп.1-8, где цистеин в положении 239 и цистеин в положении 242 при нумерации по системе нумерации Kabat в одной или обеих тяжелых цепях заменен/заменены на аминокислоту, не содержащую тиольную группу.

10. Симметричное биспецифическое антитело по любому из пп.1-9, где цистеин в положении 239 при нумерации по системе нумерации Kabat в первой тяжелой цепи заменен на аминокислоту, не содержащую тиольную группу.

11. Симметричное биспецифическое антитело по любому из пп.1-10, где цистеин в положении 242 при нумерации по системе нумерации Kabat в первой тяжелой цепи заменен на аминокислоту, не содержащую тиольную группу.

12. Симметричное биспецифическое антитело по пп.1-11, где аминокислотой, не содержащей тиольную группу, является серин.

13. Симметричное биспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, где три аминокислоты вставлены в одну или обе тяжелых цепи между аминокислотами 226-243 при нумерации по системе нумерации Kabat.

14. Симметричное биспецифическое антитело по п.13, где три аминокислоты встроены в одну или обе тяжелых цепи между положениями 238 и 239 при нумерации по системе нумерации Kabat.

15. Симметричное биспецифическое антитело по п.14, где три остатка аланина встроены между по-

ложениями 238 и 239 первой тяжелой цепи при нумерации по системе нумерации Kabat.

16. Симметричное биспецифическое антитело по п.14, где треонин, гистидин и дополнительный треонин встроены между положениями 238 и 239 одной или обеих из тяжелых цепей при нумерации по системе нумерации Kabat.

17. Симметричное биспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, где серин в положении 241 одной или обеих тяжелых цепей при нумерации по системе нумерации Kabat заменен/заменены на пролин.

18. Симметричное биспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, где в одной или обеих тяжелых цепях глицин в положении 230 заменен на цистеин, серин в положении 227 заменен на пролин, тирозин в положении 229 заменен на серин, пролин в положении 237 заменен на аспарагиновую кислоту, пролин в положении 238 заменен на лизин, аминокислотная последовательность треонин-гистидин-треонин встроена между положениями 238 и 239 и серин в положении 241 заменен на пролин.

19. Симметричное биспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, где обе тяжелых цепи содержат домен C_{H2} и/или домен C_{H3} .

20. Симметричное биспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, где шарнирные области в каждой тяжелой цепи являются идентичными.

21. Симметричное биспецифическое антитело по любому из пп.1-20, где каждая тяжелая цепь содержит верхнюю шарнирную область и центральную область длиной 12-17 аминокислот.

22. Симметричное биспецифическое антитело по любому из пп.1-20, где каждая тяжелая цепь содержит верхнюю шарнирную область и центральную область длиной 15 аминокислот.

23. Симметричное биспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, которое дополнительно содержит одну или две легких цепи.

24. Вектор экспрессии, содержащий последовательность, которая кодирует антитело по любому из пп.1-23.

25. Клетка-хозяин для экспрессии антитела по любому из пп.1-23, содержащая вектор по п.24.

26. Применение антитела по любому из пп.1-23 для лечения заболевания или нарушения, патоген которого связан с антигенами, с которыми связывается антитело по пп.1-23.

27. Применение по п.26, где заболевание или нарушение выбрано из группы, состоящей из ревматоидного артрита, псориатического артрита, болезни Стилла, болезни Макла-Уэлса, псориаза, болезни Крона, язвенного колита, SLE (системной красной волчанки), астмы, аллергического ринита, атопического дерматита, рассеянного склероза, васкулита, сахарного диабета типа I, трансплантации и реакции "трансплантат против хозяина", идиопатического фиброза легких (IPF), системного склероза (или склеродермии), фиброза почек, диабетической нефропатии, IgA-нефропатии, гипертензии, заболевания почек конечной стадии, перитонеального фиброза (непрерывного амбулаторного перитонеального диализа), цирроза печени, связанной со старением дегенерации желтого пятна (ARMD), ретинопатии, реактивного фиброза сердца, образования рубцов, келоидов, ожогов, изъязвлений кожи, ангиопластики, хирургической операции коронарного шунтирования, артропластики и хирургической операции по удалению катаракты, рака молочной железы, рака яичника, рака предстательной железы, рака легкого, рака почки, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака мочевого пузыря или рака кишечника.

28. Способ получения симметричного биспецифического антитела по любому из пп.1-23, включающий стадию смешения первого IgG4-антитела и второго IgG4-антитела *ex vivo*, где и первое IgG4-антитело, и второе IgG4-антитело содержит домен C_{H1} и шарнирную область по любому одному из пп.1-23, в присутствии подходящего восстановителя, такого как GSH, 2-меркаптоэтанол, 2-меркаптоэтиламин, TBP, TCEP, цистеин-HCl и DTT или окислительно-восстановительные буферы, где антигенная специфичность вариабельных областей в первом антителе отличается от антигенной специфичности вариабельных областей во втором антителе.

29. Способ по п.28, где восстановители присутствуют в интервале от 0,01 до 10 mM.

30. Способ по п.28 или 29, где первое и второе антитела смешивают в соотношении от 0,5:5 до 5:0,5.

31. Способ по любому из пп.28-30, где способ осуществляют при температуре от 15 до 40°C.

СН1 и шарнирная область IgG1 дикого типа

(A) STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV

DKKV (E) PKSCDKTHTCPPCPAPELGGP (SEQ ID NO:227)

СН1 и шарнирная область IgG4 дикого типа

(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKV

DKRV (E) SKYGPPCPSCPAPEFLGGP (SEQ ID NO:228)

Константная область легкой цепи каппа Ig дикого типа

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP

VTKSFNRGEC (SEQ ID NO:229)

Фиг. 1a

Легкая цепь	C _L			
к человека	FNRGEC (SEQ ID NO:228)			
Тяжелая цепь	C _H 1 (N-концевая)	ВЕРХНЯЯ	ЦЕНТРАЛЬНАЯ	НИЖНЯЯ
IgG _γ 1 человека	LAPSSKSTS (SEQ ID NO:230)	EPKSCDKTHT (SEQ ID NO:231)	CPPCP	APELLGGP
IgG _γ 2 человека	LAPCSRSTS (SEQ ID NO:232)	ERK (SEQ ID NO:233)	CCVECPPCP	APPVAGP
IgG _γ 3 человека	LAPCSRSTS (SEQ ID NO:234)	ELKTP LGDTTHT (SEQ ID NO:235)	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP) ₃ APELLGGP	
IgG _γ 4 человека	LAPCSRSTS ↑ C127 (SEQ ID NO:236)	ESKYGPP ↑ G230	CPSCP ↑ ↑ C239 C242	APEFLGGP
Тяжелая цепь	C _H 1 (N-концевая)	Шарнирная область		
IgD человека	IISGCRHPK (SEQ ID NO:238)	(E) SPKAQASSVPTAQPQAEGLAKATTAPATTRNT (SEQ ID NO:239)		
Тяжелая цепь	C _H 1 (N-концевая)	C _H 1 (C-концевая)	C _H 2 (N-концевая)	
IgM человека	LVSCENSPPS (SEQ ID NO:240)	EKNVPLP (SEQ ID NO:241)	(V) IAE LPPKVS V (SEQ ID NO:242)	

Фиг. 1b

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

Фиг. 2a

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

Фиг. 2b

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

Фиг. 2c

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

Фиг. 2d

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

Фиг. 3a

	АНТИТЕЛА																		
Положение Cys HC	G4	G1	1	2	3	4	5	5P	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
127	LC						LC	LC				LC	LC	LC	LC	LC	LC		
230							HC	HC	LC	LC	LC	HC	HC	HC				HCилиLC	HCилиLC
230 (G4) 233 (G1)		LC																	
239	HC	HC	LCилиHC		LC		HC	HC		HC			HC			HC		HCилиLC	HCилиLC
242	HC	HC	LCилиHC	LC			HC	HC	HC			HC			HC			HCилиLC	HCилиLC

Фиг. 3b

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

Фиг. 4а

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

Фиг. 4б

(Ab 6) (SEQ ID NO:243)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPPSPSCPAPEFLGGP

(Ab 7) (SEQ ID NO:244)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPPCPSPCPAPEFLGGP

(Ab 8) (SEQ ID NO:245)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPPSPSPCPAPEFLGGP

(Ab 15) (SEQ ID NO:246)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPPCPSPCPAPEFLGGP

(Ab 16) (SEQ ID NO:247)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPPCPSPCPAPEFLGGP

(Ab 28) (SEQ ID NO:248)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKCGPPCPSPCPAPEFLGGP

(Ab 29) (SEQ ID NO:249)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKCGPPSPSCPAPEFLGGP

(Ab 30) (SEQ ID NO:250)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDH
 KPSNTKVDKRV (E) SKCGPPCPSSPAPEFLGGP

(Ab 31) (SEQ ID NO:251)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDH
 KPSNTKVDKRV (E) SKCGPPSPSPAPEFLGGP

(Ab 32) (SEQ ID NO:252)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDH
 KPSNTKVDKRV (E) SCYGPPCPSCPAPEFLGGP

(Ab 33) (SEQ ID NO:253)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDH
 KPSNTKVDKRV (E) SCYGPPSPSCPAPEFLGGP

(Ab 34) (SEQ ID NO:254)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDH
 KPSNTKVDKRV (E) SCYGPPCPSSPAPEFLGGP

(Ab 35) (SEQ ID NO:255)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDH
 KPSNTKVDKRV (E) SCYGPPSPSSPAPEFLGGP

(Ab 36) (SEQ ID NO:256)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDH
 KPSNTKVDKRV (E) CKYGPPCPSCPAPEFLGGP

(Ab 37) (SEQ ID NO:257)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDH
 KPSNTKVDKRV (E) CKYGPPSPSCPAPEFLGGP

(Ab 38) (SEQ ID NO:258)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDH
 KPSNTKVDKRV (E) CKYGPPCPSSPAPEFLGGP

(Ab 39) (SEQ ID NO:259)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDH
 KPSNTKVDKRV (E) CKYGPPSPSSPAPEFLGGP

(Ab 44) (SEQ ID NO:260)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDH
 KPSNTKVDKRV (E) SKYC~~P~~PAAACPSCPAPEFLGGP

(Ab 45) (SEQ ID NO:261)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDH
 KPSNTKVDKRV (E) SKYC~~P~~PAAASPSCPAPEFLGGP

(Ab 46) (SEQ ID NO:262)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDH
 KPSNTKVDKRV (E) SKYC~~P~~PAAACPSSPAPEFLGGP

(Ab 47) (SEQ ID NO:263)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDH
 KPSNTKVDKRV (E) SKYC~~P~~PAAASPSSPAPEFLGGP

(Ab 2) (SEQ ID NO:264)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDH
 KPSNTKVDKRV (E) SKYGPPSPSCPAPEFLGGP

(Ab 3) (SEQ ID NO:265)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYGPPCPSSPAPEFLGGP

(Ab 48) (SEQ ID NO:266)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) PKSCDKTHTCPPCPAPEFLGGP

(Ab 28P) (SEQ ID NO:267)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKCGPPCPCPAPEFLGGP

(Ab 44P) (SEQ ID NO:268)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPPAACPPCPAPEFLGGP

(Ab 1) (SEQ ID NO:269)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYGPPCPSCPAPEFLGGP

(Ab 4) (SEQ ID NO:270)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYGPPSPSSPAPEFLGGP

Ab5 (SEQ ID NO:271)

(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPPCPSCPAPEFLGGP

Ab5P (SEQ ID NO:272)

(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPPCPCPAPEFLGGP

Ab9 (SEQ ID NO:273)

(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPPSPSCPAPEFLGGP

Ab10 (SEQ ID NO:274)

(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPPCPSSPAPEFLGGP

Ab11 (SEQ ID NO:275)

(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPPSPSSPAPEFLGGP

Ab12 (SEQ ID NO:276)

(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYGPPSPSCPAPEFLGGP

Ab13 (SEQ ID NO:277)

(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYGPPCPSSPAPEFLGGP

Ab14 (SEQ ID NO:278)

(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYGPPSPSSPAPEFLGGP

Фиг. 5

IgG4 CH2 и CH3: (SEQ ID NO:279)

SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

IgG4 CH2 IgG1 CH3: (SEQ ID NO:280)

SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

(Ab 6) (SEQ ID NO:281)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDH KPSNTKVDKRV (E) SKYCPCPPSPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 7) (SEQ ID NO:282)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDH KPSNTKVDKRV (E) SKYCPCPPSPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 8) (SEQ ID NO:283)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDH KPSNTKVDKRV (E) SKYCPCPPSPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 15) (SEQ ID NO:284)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDH KPSNTKVDKRV (E) SKYCPCPPSPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 16) (SEQ ID NO:285)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDH KPSNTKVDKRV (E) SKYCPCPPSPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 28) (SEQ ID NO:286)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDH KPSNTKVDKRV (E) SKCGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 29) (SEQ ID NO:287)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDH KPSNTKVDKRV (E) SKCGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 30) (SEQ ID NO:288)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDH KPSNTKVDKRV (E) SKCGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 31) (SEQ ID NO:289)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT~~TKTYTCNV~~DH
 KPSNTKVDKRV (E) SKCGPPSPSSPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK~~TSKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES~~
 NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL~~SLGK~~

(Ab 32) (SEQ ID NO:290)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT~~TKTYTCNV~~DH
 KPSNTKVDKRV (E) SCYGPPCPSPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK~~TSKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES~~
 NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL~~SLGK~~

(Ab 33) (SEQ ID NO:291)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT~~TKTYTCNV~~DH
 KPSNTKVDKRV (E) SCYGPPSPSPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK~~TSKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES~~
 NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL~~SLGK~~

(Ab 34) (SEQ ID NO:292)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT~~TKTYTCNV~~DH
 KPSNTKVDKRV (E) SCYGPPCPSSPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK~~TSKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES~~
 NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL~~SLGK~~

(Ab 35) (SEQ ID NO:293)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT~~TKTYTCNV~~DH
 KPSNTKVDKRV (E) SCYGPPSPSSPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK~~TSKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES~~
 NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL~~SLGK~~

(Ab 36) (SEQ ID NO:294)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT~~TKTYTCNV~~DH
 KPSNTKVDKRV (E) CKYGPPCPSPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK~~TSKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES~~
 NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL~~SLGK~~

(Ab 37) (SEQ ID NO:295)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT~~TKTYTCNV~~DH
 KPSNTKVDKRV (E) CKYGPPSPSPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK~~TSKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES~~
 NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL~~SLGK~~

(Ab 38) (SEQ ID NO:296)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT~~TKTYTCNV~~DH
 KPSNTKVDKRV (E) CKYGPPCPSSPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK~~TSKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES~~
 NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL~~SLGK~~

(Ab 39) (SEQ ID NO:297)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT~~TKTYTCNV~~DH
 KPSNTKVDKRV (E) CKYGPPSPSSPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK~~TSKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES~~
 NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL~~SLGK~~

(Ab 44) (SEQ ID NO:298)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT~~TKTYTCNV~~DH
 KPSNTKVDKRV (E) SKYCPAAACPSPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
 REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK~~TSKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE~~
 WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL~~SLGK~~

(Ab 45) (SEQ ID NO:299)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPPAAASPCSPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 46) (SEQ ID NO:300)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPPAAACPSSPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 47) (SEQ ID NO:301)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPPAAASPSSPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 2) (SEQ ID NO:302)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYGPPSPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 3) (SEQ ID NO:303)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYGPPCSPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 48) (SEQ ID NO:304)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) PKSCDKTHTCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 28P) (SEQ ID NO:305)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKCGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 44P) (SEQ ID NO:306)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPPAAACPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 1) (SEQ ID NO:307)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYGPPCSPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 4) (SEQ ID NO:308)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYGPPSPSSAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

Ab5 (SEQ ID NO:309)

(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDH
KPSNTKVDRV (E) SKYCPSPSPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVHLQDNLNKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

Ab5P (SEQ ID NO:310)

(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDH
KPSNTKVDRV (E) SKYCPSPSPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVHLQDNLNKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

Ab9 (SEQ ID NO:311)

(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDH
KPSNTKVDRV (E) SKYCPSPSPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVHLQDNLNKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

Ab10 (SEQ ID NO:312)

(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDH
KPSNTKVDRV (E) SKYCPSPSPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVHLQDNLNKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

Ab11 (SEQ ID NO:313)

(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDH
KPSNTKVDRV (E) SKYCPSPSPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVHLQDNLNKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

Ab12 (SEQ ID NO:314)

(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDH
KPSNTKVDRV (E) SKYGPPSPSPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVHLQDNLNKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

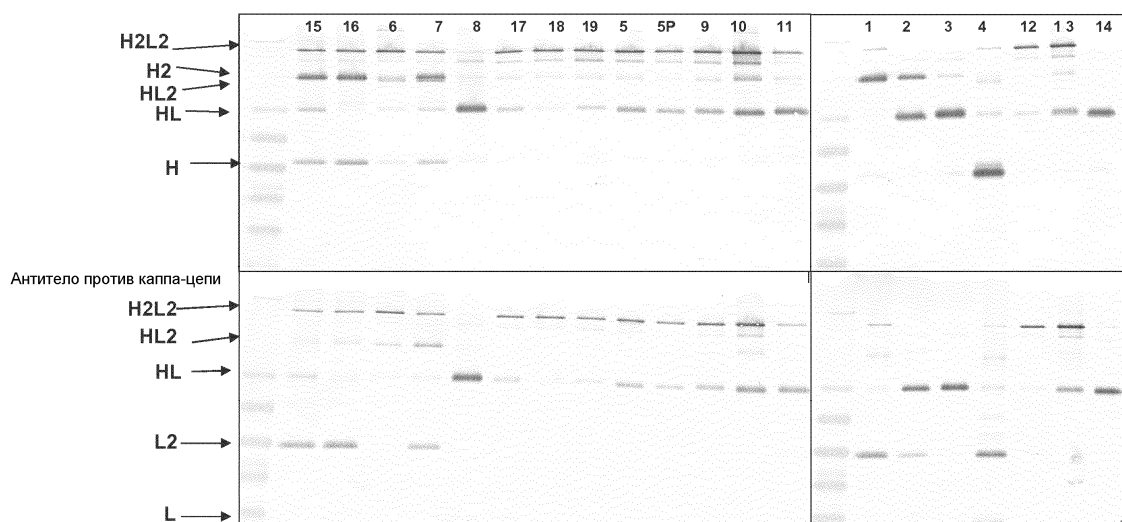
Ab13 (SEQ ID NO:315)

(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDH
KPSNTKVDRV (E) SKYGPPSPSPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVHLQDNLNKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

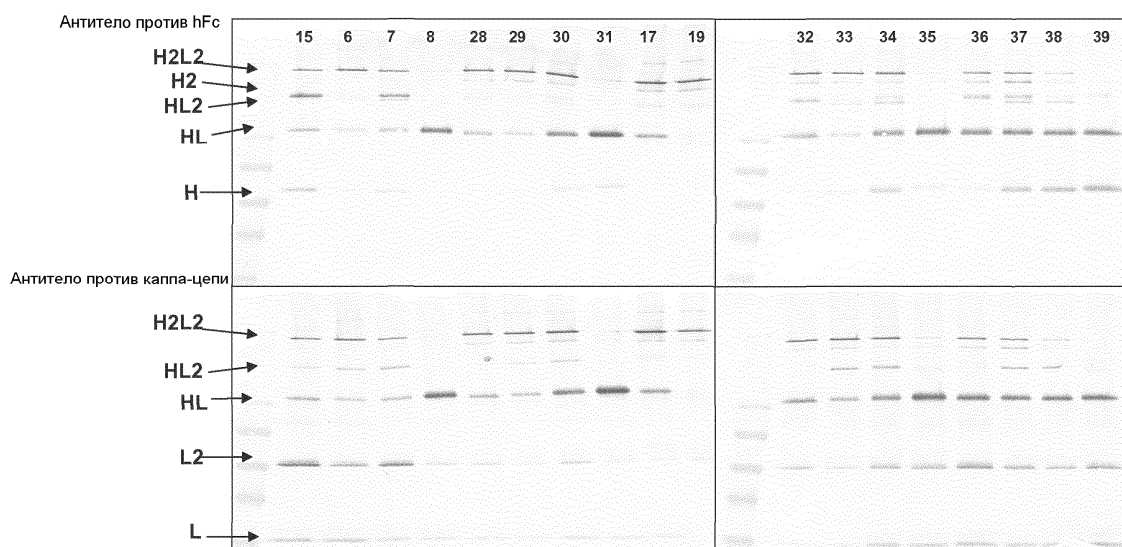
Ab14 (SEQ ID NO:316)

(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDH
KPSNTKVDRV (E) SKYGPPSPSPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVHLQDNLNKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

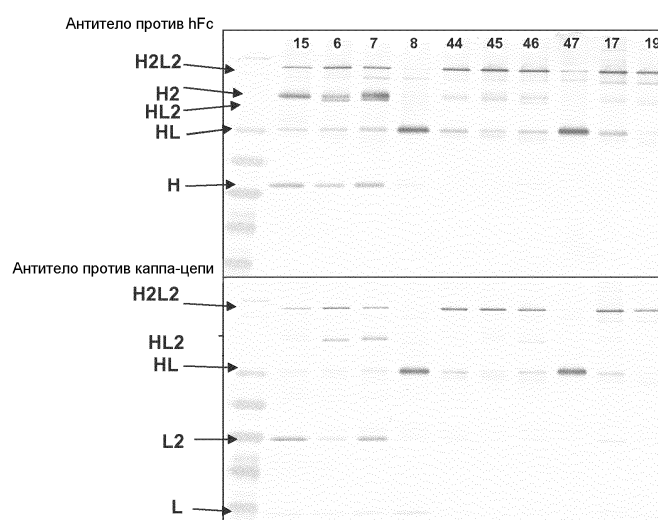
Фиг. 6



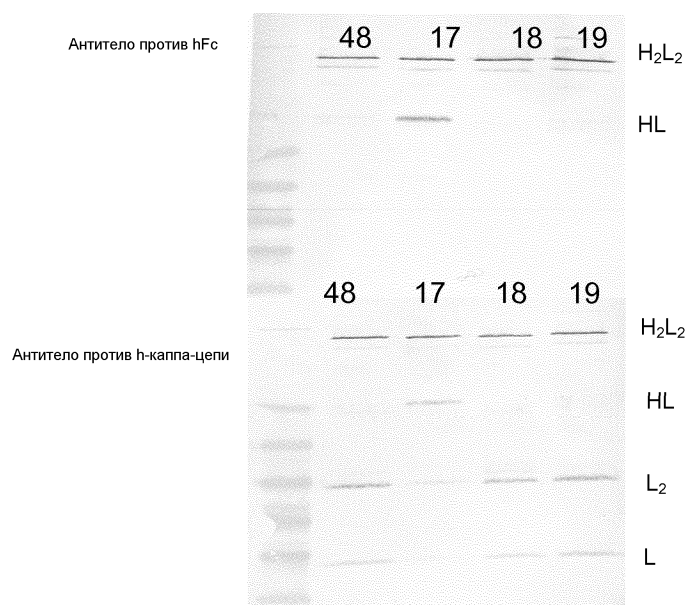
Фиг. 7



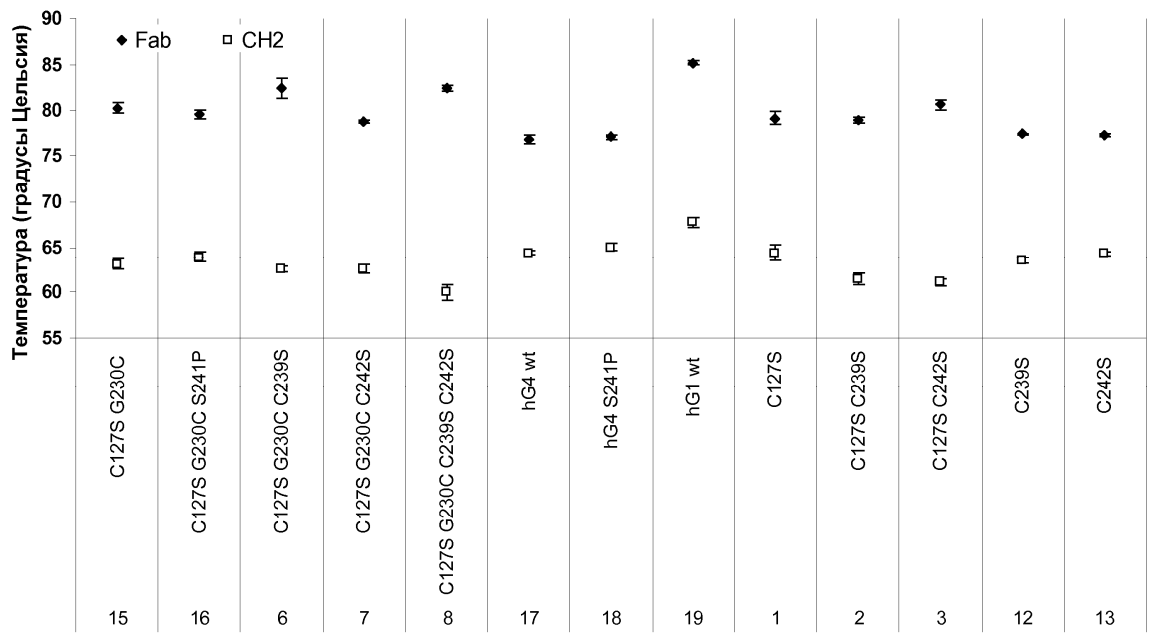
Фиг. 8



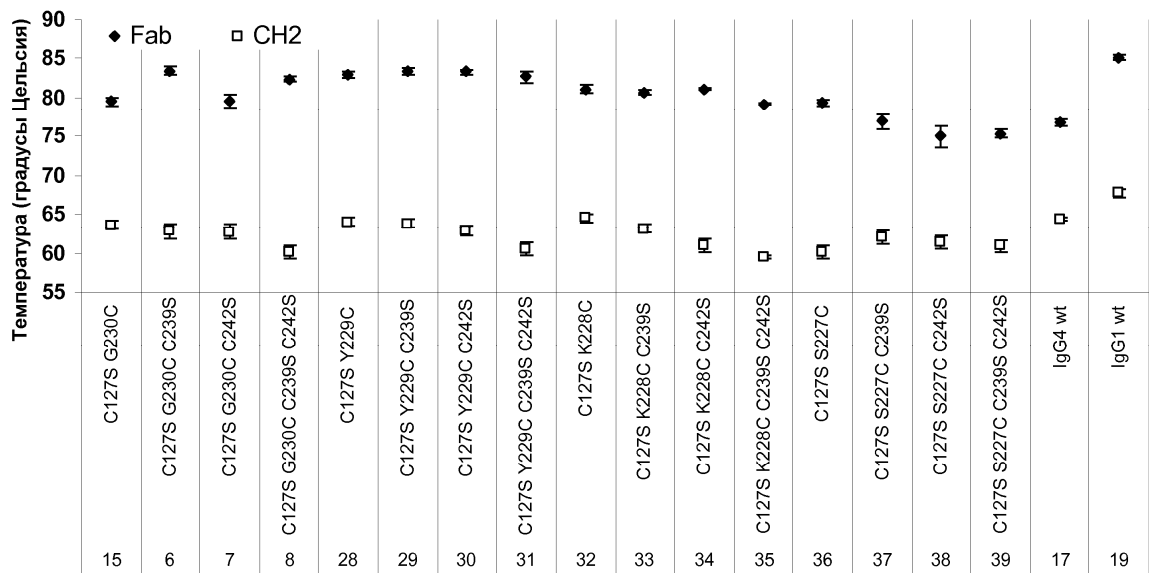
Фиг. 9



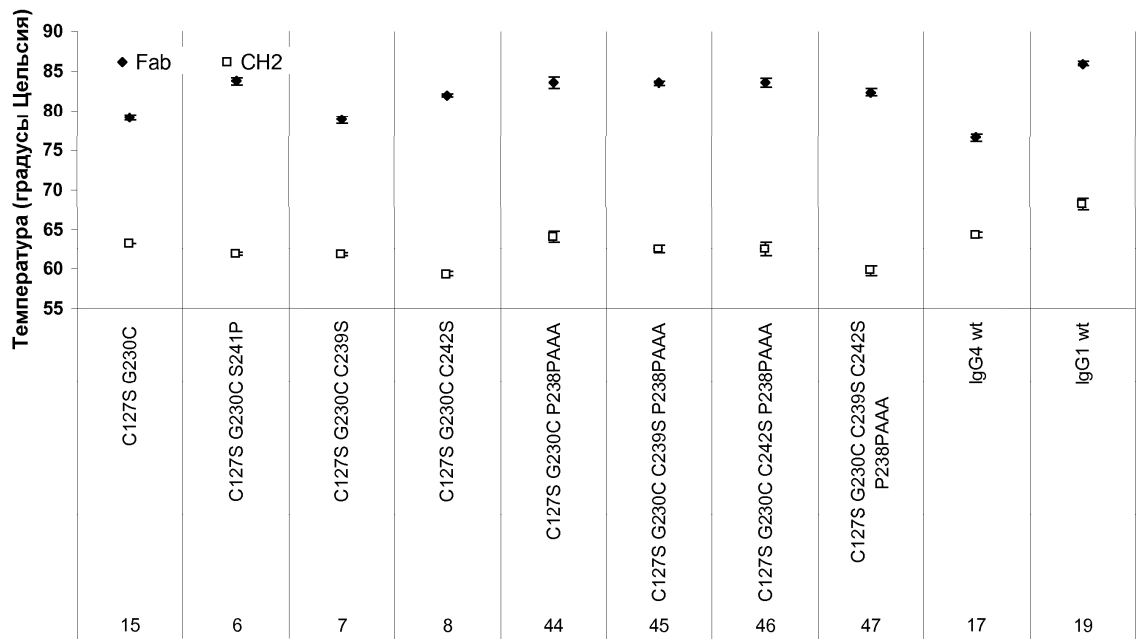
Фиг. 10



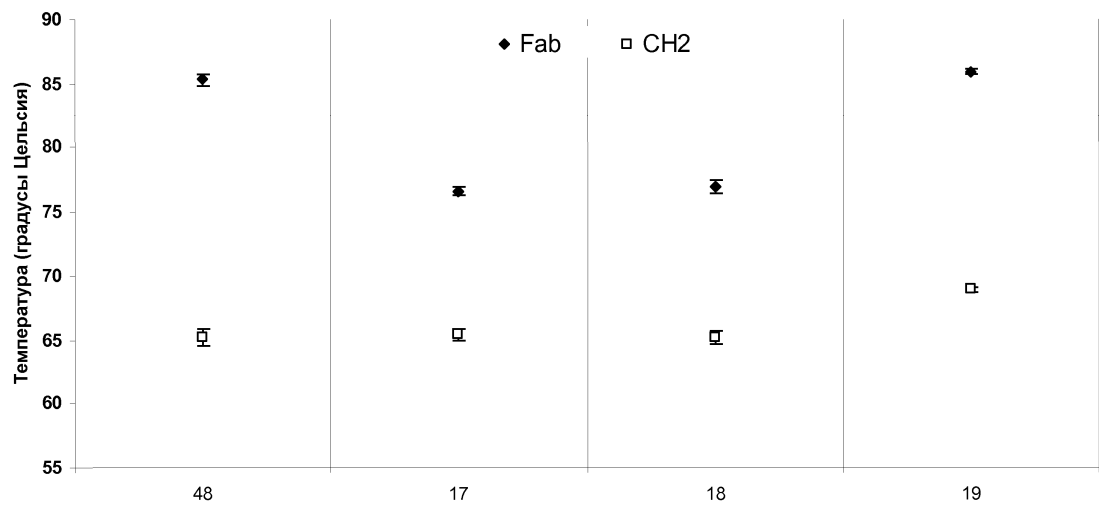
Фиг. 11



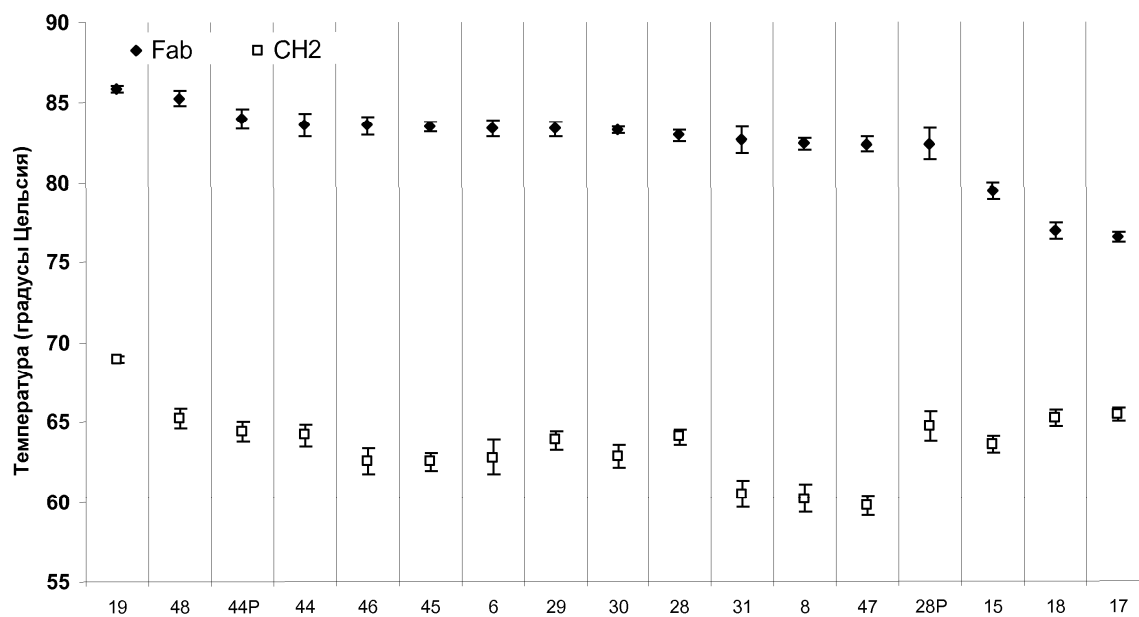
Фиг. 12



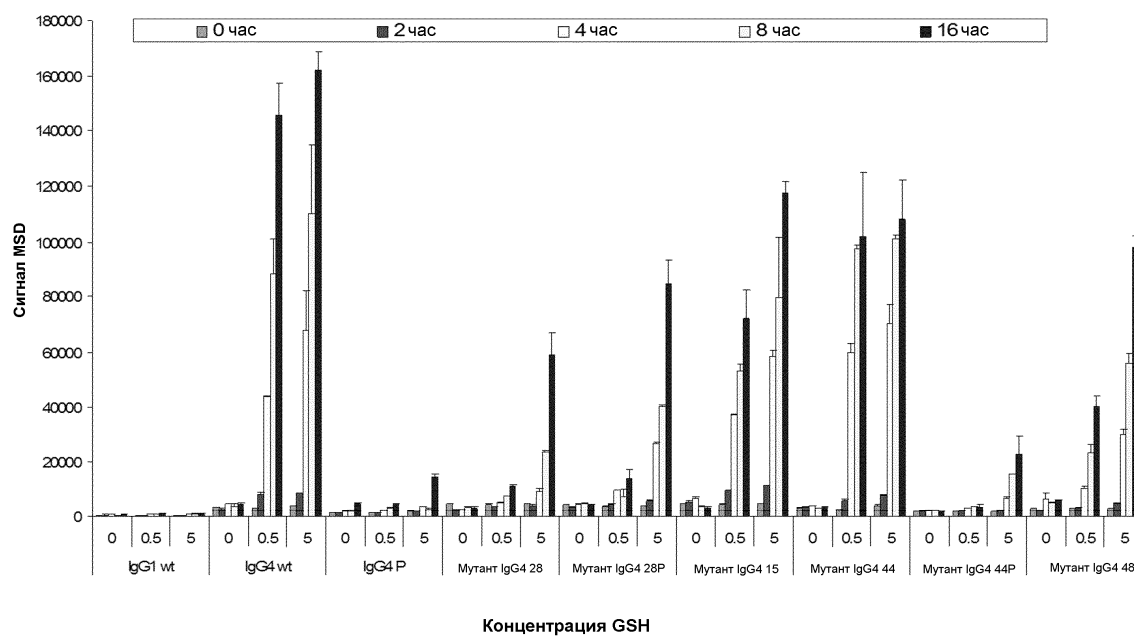
Фиг. 13



Фиг. 14

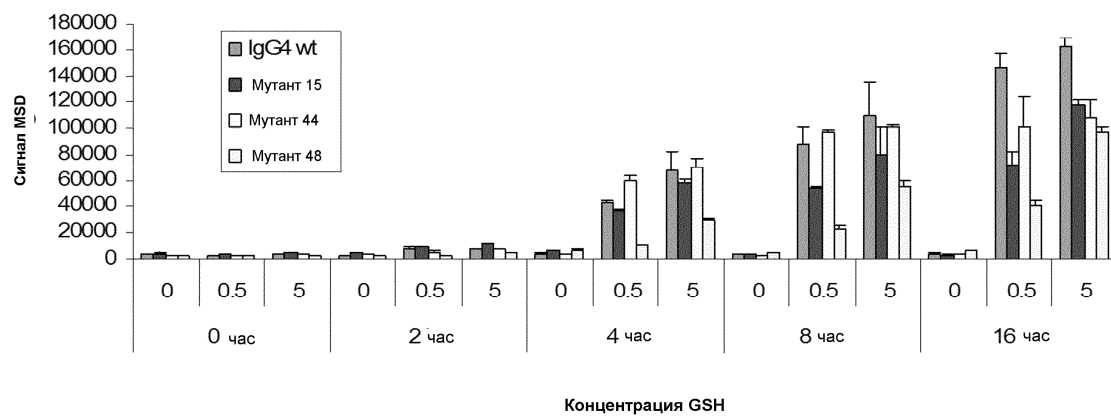


Фиг. 15

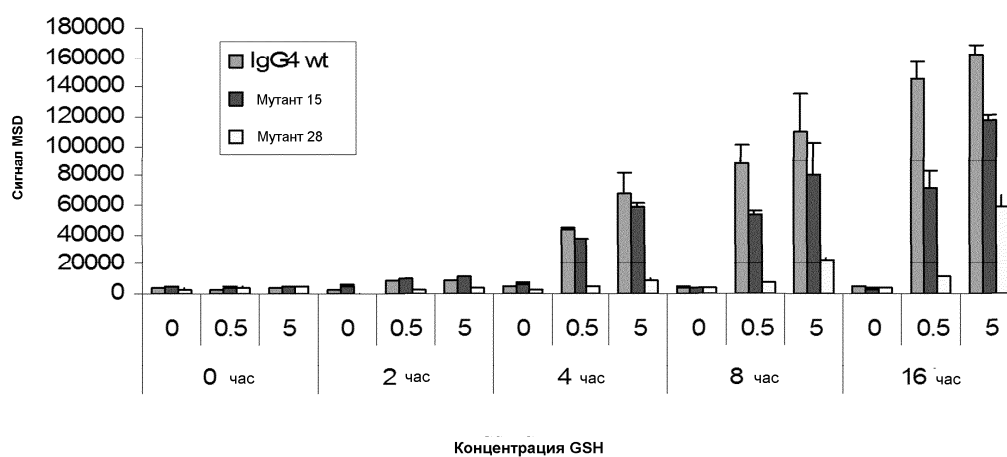


Концентрация GSH

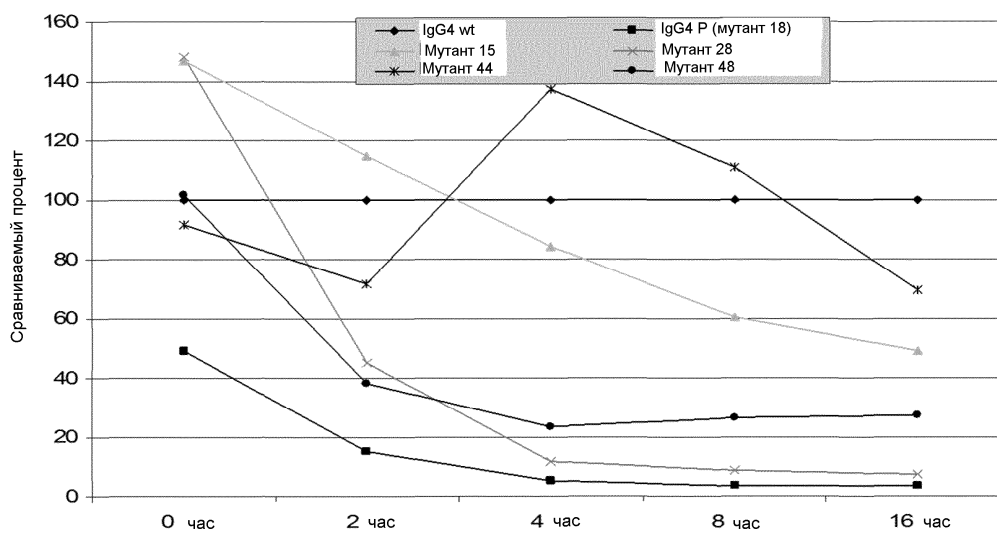
Фиг. 16



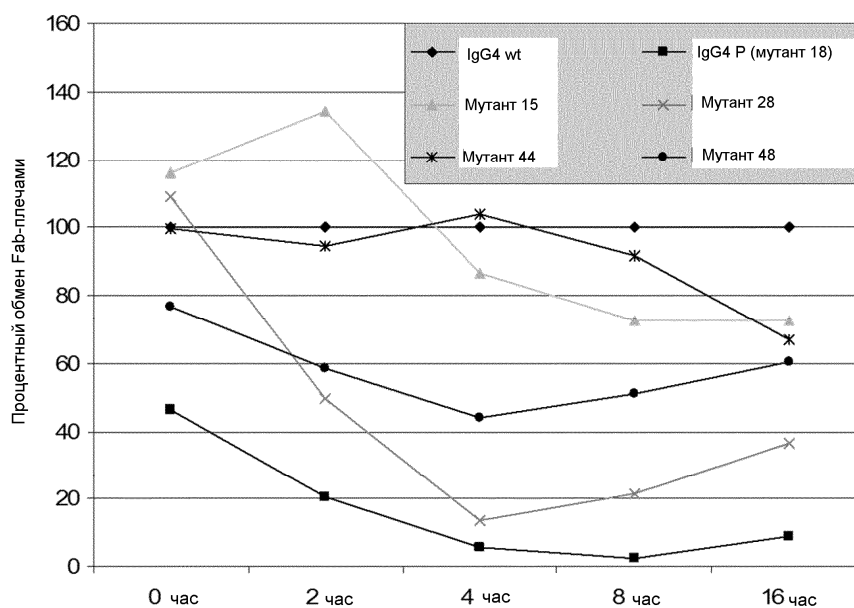
Фиг. 17



Фиг. 18

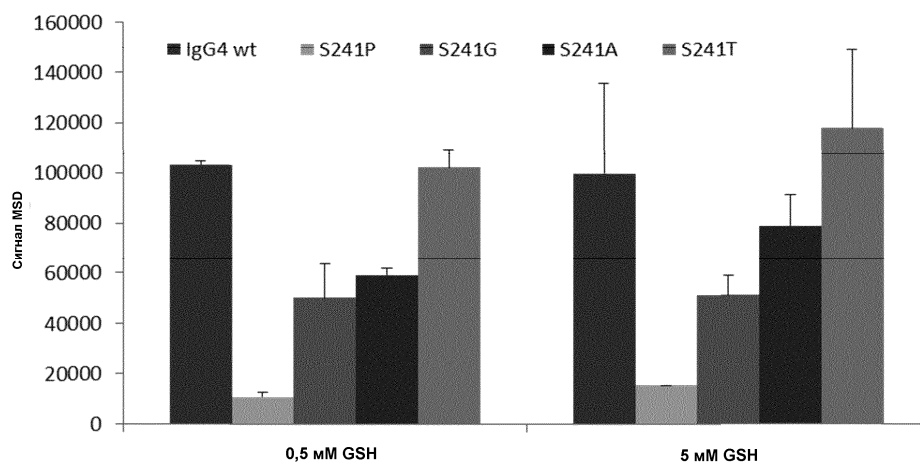


Фиг. 19



Фиг. 20

Анализ симметричного обмена плечами мутантов IgG4 с альтернативными остатками в положении 241



Фиг. 21



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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