

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **035388**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2020.06.04**(21) Номер заявки  
**201591720**(22) Дата подачи заявки  
**2014.03.12**(51) Int. Cl. **A61K 39/00** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 19/02** (2006.01)  
**A61P 29/00** (2006.01)  
**A61P 37/06** (2006.01)  
**C07K 14/00** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)(54) **БЕЛКИ, СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ПО ОТНОШЕНИЮ К BAFF И B7RP1, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**(31) **61/780,260; 61/942,776**(32) **2013.03.13; 2014.02.21**(33) **US**(43) **2016.01.29**(86) **PCT/US2014/024908**(87) **WO 2014/159725 2014.10.02**(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**АМДЖЕН ИНК. (US)**(72) Изобретатель:  
**Сюй Хайлин, Чжан Мин, Каннан  
Гунасекаран, Джейкобсен  
Фредерик В., Цудзи Уэйн (US)**(74) Представитель:  
**Харин А.В., Буре Н.Н. (RU)**(56) **WO-A2-2006010057****WALTER A. SIFUENTES GIRALDO ET AL.:** "New Targets in Systemic Lupus (Part 2/2)", *REUMATOLOGÍA CLÍNICA (ENGLISH EDITION)*, vol. 8, no. 5, 1 September 2012 (2012-09-01), pages 263-269, XP055122552, ISSN: 2173-5743, DOI: 10.1016/j.reuma.2012.08.002, page 263, left-hand column - page 264, left-hand column, line 40, page 265, left-hand column, lines 7-17**ANNE DAVIDSON:** "The Rationale for BAFF Inhibition in Systemic Lupus Erythematosus", *CURRENT RHEUMATOLOGY REPORTS, CURRENT SCIENCE INC., NEW YORK*, vol. 14, no. 4, 26 April 2012 (2012-04-26), pages 295-302, XP035079323, ISSN: 1534-6307, DOI: 10.1007/S11926-012-0258-2, page 302, right-hand column, paragraph 2**WO-A2-2006036834****WO-A2-2007011941****M. WATANABE ET AL.:** "Down-Regulation of ICOS Ligand by Interaction with ICOS Functions as a Regulatory Mechanism for Immune Responses", *THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY*, vol. 180, no. 8, 4 April 2008 (2008-04-04), pages 5222-5234, XP055122280, ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.180.8.5222, page 5231, right-hand column, paragraph 1; figure 9**H. HU ET AL.:** "Noncanonical NF- B regulates inducible costimulator (ICOS) ligand expression and T follicular helper cell development", *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES*, vol. 108, no. 31, 2 August 2011 (2011-08-02), pages 12827-12832, XP055122655, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1105774108, figure 2B**US-A1-2011014189****NAN-HUA CHANG ET AL.:** "B Cell Activating Factor (BAFF) and T Cells Cooperate to Breach B Cell Tolerance in Lupus-Prone New Zealand Black (NZB) Mice", *PLOS ONE*, vol. 5, no. 7, 21 July 2010 (2010-07-21), page e11691, XP055122647, ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0011691, the whole document

(57) В изобретении описаны биспецифические белки, специфические по отношению к BAFF и B7RP1, нуклеиновые кислоты, кодирующие такие белки, способы получения и применения таких белков.

**B1****035388****035388 B1**

### Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка заявляет приоритет по предварительной заявке на патент США № 61/780260, поданной 13 марта 2013 года, и № 61/942776, поданной 21 февраля 2014 года, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

### Область техники

Биспецифические молекулы, описанные в документе, относятся к области получения терапевтических средств белковой природы.

### Уровень техники

Большинство терапевтических белков связываются с одним белком-мишенью с высокой специфичностью, тем самым подавляя активность этого одного белка-мишени. Этот белок может участвовать в одном или более биологических путях, которые опосредуют развитие заболевания у человека, которое лечат, и, таким образом, терапевтический белок, может подавлять прогрессирование болезни. Однако эффективность терапевтических белков редко бывает достаточной для всех пациентов. Недостаточная эффективность терапевтических белков в некоторых случаях может быть обусловлена сложностью заболевания. Например, некоторые заболевания могут быть опосредованы многими биологическими путями, или различные биологические пути могут играть основную роль в активности заболеваний у разных пациентов, характеризующихся одинаковым клинически определяемым состоянием. Следовательно, при некоторых заболеваниях преимущество может заключаться в одновременном ингибировании по меньшей мере двух биологических путей.

### Сущность изобретения

В настоящем документе предложен биспецифический белок, который может связываться и ингибировать биологическую активность и В7-родственного белка 1 человека (В7RP1, также известный как GL50 и костимулирующий лиганд Т-клеток (ICOSLG)), и фактора активации В-клеток человека (BAFF, также известный как представитель 13b (TNFSF13B) суперсемейства факторов некроза опухоли). BAFF играет некоторую роль в выживаемости В-клеток, а В7RP1 играет некоторую роль в костимуляции Т-клеток. Следовательно, белок, который ингибирует активность обоих указанных белков, подавляет активность и В-, и Т-клеток.

В настоящем документе описан биспецифический белок, причем указанный белок может ингибировать BAFF-опосредованную пролиферацию В-клеток человека и причем указанный белок может ингибировать В7RP1-опосредованную пролиферацию Т-клеток человека. Биспецифический белок может представлять собой антитело IgG, содержащее две тяжелые цепи иммуноглобулина, имеющие разные аминокислотные последовательности, и две легкие цепи иммуноглобулина, имеющие разные аминокислотные последовательности. Антитело IgG может ингибировать BAFF-опосредованную пролиферацию В-клеток человека и В7RP1-опосредованную пролиферацию Т-клеток человека. В качестве антитела IgG может представлять собой IgG1, IgG2, IgG3 или антитело IgG4 и может представлять собой человеческое или гуманизированное антитело IgG. Биспецифический белок может содержать определяющий комплементарность участок 1 легкой цепи (CDR1), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, определяющий комплементарность участок 2 легкой цепи (CDR2), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, определяющий комплементарность участок 3 легкой цепи (CDR3), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, CDR1 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. Кроме того, биспецифический белок может содержать переменный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность SEQ ID NO: 15, или ее вариант и переменный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 14, или ее вариант. Такие варианты последовательностей могут содержать не более 10 делеций, вставок замещений одной аминокислоты на 100 аминокислот в сравнении с эталонной последовательностью.

В альтернативном варианте реализации изобретения биспецифический белок, который может ингибировать BAFF-опосредованную пролиферацию В-клеток человека и который может ингибировать В7RP1-опосредованную пролиферацию Т-клеток человека, может содержать: (а) полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую следующую формулу: A-L1-P-L2-P, где А представляет собой иммуноглобулиновую тяжелую цепь антитела IgG, L1 представляет собой первый линкер, который отсутствует или длина которого составляет от 3 до 40 аминокислот, P представляет собой BAFF-связывающий пептид, длина которого составляет от 10 до 40 аминокислот, и L2 представляет собой линкерный пептид, который отсутствует или длина которого составляет от 5 до 50 аминокислот; и (б) легкую цепь иммуноглобулина. Тяжелая цепь иммуноглобулина (а) и легкая цепь иммуноглобулина (б) могут формировать антитело IgG, содержащее две молекулы полипептида (а) и две молекулы легкой цепи (б), которые могут связываться с В7RP1 и/или могут ингибировать В7RP1-опосредованную пролиферацию Т-клеток человека. В тяжелой цепи иммуноглобулина может отсутствовать лизин на С-конце сразу перед L1. В качестве антитела IgG может выступать человеческое или гуманизированное антитело IgG1, IgG2, IgG3 или антитело IgG4. BAFF-связывающий пептид P может иметь аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3. L1 может иметь аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.

довательность SEQ ID NO: 4, 37, 38, 39 или 40. L2 может иметь аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, 6 или 7. Биспецифический белок может содержать CDR1 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 (RASQGISNWL A), CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 (AASSLQS), CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 (QQYDSYPRT), CDR1 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 (SYWMS), CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 (YIKQDGNEKYYVDSVKG), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 (EGILWFGDLPTF). Биспецифический белок может содержать переменный домен легкой цепи иммуноглобулина, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и/или переменный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15. Биспецифический белок может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 или ее вариант и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17 или 18 или ее варианты. Такие варианты последовательностей могут содержать не более 10 делеций, вставок замещений одной аминокислоты на 100 аминокислот в сравнении с эталонной последовательностью.

В дополнительном аспекте в настоящем документе описан биспецифический белок, содержащий: (а) полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 18, или ее варианты; и (б) другой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 или ее вариант. Такие варианты последовательностей могут содержать не более 10 делеций, вставок замещений одной аминокислоты на 100 аминокислот в сравнении с эталонной последовательностью. Биспецифический белок может ингибировать BAFF-опосредованную пролиферацию В-клеток человека и B7RP1-опосредованную пролиферацию Т-клеток человека. Биспецифический белок может представлять собой тетрамер, содержащий две молекулы полипептида (а) и две молекулы полипептида (б).

В другом варианте реализации изобретения в настоящем документе предложен белок, содержащий линкер, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах реализации изобретения этот белок может ингибировать BAFF-опосредованную пролиферацию В-клеток человека и/или B7RP1-опосредованную пролиферацию Т-клеток человека. Такой белок может содержать аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 14 и/или SEQ ID NO: 15. Такой белок может содержать аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере две копии SEQ ID NO: 1, разделенные SEQ ID NO: 6 или 7. В дополнительном варианте реализации изобретения такой белок может включать легкую цепь иммуноглобулина и тяжелую цепь иммуноглобулина, и SEQ ID NO: 6 или 7 может располагаться за С-концом тяжелой цепи. В таких вариантах реализации изобретения SEQ ID NO: 6 или 7 могут быть фланкированы пептидами, которые связываются с белком, отличным от белка, с которым связаны тяжелая и легкая цепи.

Кроме того, в настоящем документе описана фармацевтическая композиция, содержащая любые биспецифические белки, описанные в настоящем документе, или белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или 7, и физиологически приемлемое вспомогательное вещество.

Также в настоящем документе описана нуклеиновая кислота, кодирующая любой полипептид, включенный в состав одного из биспецифических белков, или белки, содержащие SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7, описанные в настоящем документе. Иллюстративные нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептид, включенный в состав биспецифического белка, включают, в том числе, например, SEQ ID NO: 55, 56, 60, 61, 62 и 63. Описаны векторы, содержащие такие нуклеиновые кислоты, и клетки-хозяева, содержащие такие векторы и/или нуклеиновые кислоты. Дополнительно в настоящем документе описан способ получения биспецифического белка, включающий культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую любые биспецифические белки, описанные в настоящем документе, в таких условиях, которые обеспечивают экспрессию нуклеиновой кислоты, и выделение белка из клеточной массы или культуральной среды. Клетка-хозяин может представлять собой клетку млекопитающего, например, клетку CHO, или бактериальную клетку, такую как *Escherichia coli*.

В другом аспекте в настоящем документе описан способ лечения системной красной волчанки, включая волчаночный нефрит, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества любых биспецифических белков, описанных в настоящем документе, или фармацевтической композиции, содержащей такой биспецифический белок. Другое терапевтическое средство можно вводить пациенту до, после и одновременно с биспецифическим белком. В качестве другого терапевтического средства может быть использован кортикостероид, противомаларийное средство, ретиноевая кислота, НПВС, циклофосфамид, дегидроэпиандростерон, мофетила микофенолят, азатиоприн, хлорамбуцил, метотрексат, такролимус, дапсон, талидомид, лефлуномид или циклоспорин.

В дополнительном аспекте в настоящем документе описан способ лечения, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества любых биспецифических белков, описанных в настоящем документе, или фармацевтической композиции, содержащей биспецифический белок, описанный в настоящем документе, причем пациент имеет заболевание, выбранное из группы, состоящей из: АНЦА-положительного васкулита, ревматоидного артрита (РА), болезни Крона, язвенного колита, целиакии, пузырчатки, пемфигоида, подострой кожной красной волчанки (ПККВ), рассеянного склероза,

хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии (ХВДП), миастении гравис, синдрома Гудпасчера, гломерулонефрита, аутоиммунной гемолитической анемии (АИГА), идиопатической тромбоцитопенической пурпуры (ИТП), хронического активного гепатита, первичного билиарного цирроза печени, синдрома Шегрена, системного склероза, тиреоидита Хашимото, болезни Грейвса, болезни Аддисона и множественной эндокринной неоплазии (МЭН).

В другом аспекте в настоящем документе описана фармацевтическая композиция, содержащая любые биспецифические белки или белки, содержащие SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7, описанные в настоящем документе. Фармацевтическая композиция может быть предназначена, например, для лечения системной красной волчанки или волчаночного нефрита.

В другом аспекте описано применение в качестве лекарственного вещества любых биспецифических белков, предложенных в настоящем документе.

#### **Краткое описание графических материалов**

Фиг. 1 - схематические изображения биспецифических белков, которые связываются с BAFF и B7RP1. В верхней строке приведены идентификаторы для каждой конструкции. Во второй строке приведена краткая описательная фраза, относящаяся к структуре каждой конструкции. В нижней строке представлено схематическое изображение структуры каждой конструкции. Незаштрихованные овалы соответствуют константным доменам тяжелой или легкой цепи иммуноглобулина. Овалы, заштрихованные горизонтальными линиями, соответствуют вариабельным доменам тяжелой или легкой цепи (VH или VL) иммуноглобулина. Маленькие, закрашенные квадраты и петли соответствуют BAFF-связывающим пептидам. Шарнирные области проиллюстрированы в виде жирных вертикальных линий, тогда как дисульфидные мостики проиллюстрированы в виде жирных горизонтальных линий. Последовательность "G4S" на фиг. 1 раскрыта в SEQ ID NO: 72;

фиг. 2 - активность биспецифических белков в анализе пролиферации В-клеток человека. Данные, проиллюстрированные на фиг. 2А (верхняя) и 2В (нижняя), получены из анализов пролиферации В-клеток, которые осуществляли, как описано в примере 1. На обеих панелях по оси x указана концентрация ( $\log[\text{nM}]$ ) биспецифического белка, содержащегося в анализируемой смеси, а по оси y указано количество включенного  $^3\text{H}$ -тимидина (число импульсов в минуту (и/мин)). Обозначение каждого маркера указано в виде идентификатора для каждого проанализированного белка. Обозначения каждого идентификатора проиллюстрированы на фиг. 1 и пояснены в примере 1;

фиг. 3 - активность биспецифических белков в анализе пролиферации Т-клеток человека. Проиллюстрированные данные получены из анализов пролиферации Т-клеток, которые осуществляли, как описано в примере 1. На оси x указана концентрация ( $\log[\text{nM}]$ ) биспецифического антитела или антитела  $\alpha\text{B7RP1}$  в анализируемой смеси, и на оси y указано процентное содержание включенного в Т-клетки  $^3\text{H}$ -тимидина в присутствии B7RP1-ингибиторов в указанных концентрациях по сравнению с содержанием включенного в Т-клетки  $^3\text{H}$ -тимидина без B7RP1-ингибиторов (в процентах от контроля). Идентификатор указан для каждого исследуемого белка;

фиг. 4 - высвобождение цитокинов клетками миндалин человека, стимулированными энтеротоксином *B Staphylococcus* (SEB). Способы описаны в примере 1. На оси y показаны уровни сигнала, обнаруженного для различных цитокинов, измеренные с помощью наборов Meso Scale Discovery (Роквилл, Мэриленд) согласно инструкциям производителя. На клетки воздействовали либо  $\alpha\text{B7RP1}$  (столбец 1), P74293 (столбец 2), CTLA4-Ig (столбец 3), либо IgG человека (столбец 4). На данной фигуре указаны проанализированные цитокины;

фиг. 5 - фармакокинетический профиль биспецифических конструкций у мышей. Способы оценки *in vivo* фармакокинетических свойств P71617, P71619, P71621, P71622, P74293 и P74294 у мышей описаны в примере 1. Согласно пояснениям, приведенным в примере 1, биспецифические белки были обнаружены с помощью двух разных анализов, в одном из которых был обнаружен только Fc-участок белков (точки данных обозначены закрашенными ромбами; анализ Fc-участков), и в другом из которых были обнаружены и Fc-, и BAFF-связывающий участки белков (точки данных обозначены закрашенными квадратами; анализ интактных белков). На оси x указано время после инъекции (часы), а на оси y указана концентрация белка, обнаруженного в сыворотке (нг/мл). Конструкции, использованные для введения, указаны на каждой панели;

фиг. 6А - ингибирование пролиферации В-клеток мыши проводили с использованием биспецифической молекулы - мышинной гомологичной молекулы ("мышинная гомологичная молекула"), которая связывается с BAFF и B7RP1. Анализ осуществлялся, как описано в примере 2. Мышиная гомологичная молекула содержит антитело IgG к B7RP1 мыши, которое имеет две копии BAFF-связывающего пептида, присоединенного к С-концу тяжелой цепи антитела, как указано в примере 2. В качестве положительного контроля служило BAFF-связывающее пептидное антитело (" $\alpha\text{BAFF}$ "). Данные для мышинной гомологичной молекулы и  $\alpha\text{BAFF}$  указаны, соответственно, в виде закрашенных кружочков и квадратов. На оси x указана концентрация этих исследуемых в данном анализе белков ( $\log[\text{пM}]$ ), а на оси y указаны результаты по включению  $^3\text{H}$ -тимидина (и/мин);

фиг. 6В - ингибирование связывания B7RP1 с Т-клетками мыши с использованием мышинной гомо-

логичной молекулы. Анализ осуществлялся, как описано в примере 2. Антитело IgG к B7RP1 мыши ("антитело к mB7RP1") было использовано в качестве положительного контроля. Данные, полученные для мышинной гомологичной молекулы и антитела к mB7RP1, обозначены, соответственно, в виде закрашенных кругов и квадратов. На оси x отображена концентрация этих исследуемых белков в данном анализе ( $\log[\mu\text{M}]$ ), а по оси y отображен процент B7RP1-FC мыши, связавшегося с Т-клетками;

фиг. 7 - влияние *in vivo* введения мышам эритроцитов барана на их иммунологические показатели. Все результаты, проиллюстрированные на этой фигуре, взяты с анализов, описанных в примере 2. Белки, которые получали мыши, обозначены с помощью закрашивания каждого столбика следующим образом: незакрашенный столбец - антитело к mB7RP1; вертикальные линии -  $\alpha\text{BAFF}$ ; горизонтальные линии - антитело к mB7RP1 в дополнение к  $\alpha\text{BAFF}$ ; диагональные линии - мышинная гомологичная молекула; шахматная штриховка - mlgG1; и закрашенный столбец (только в нижней панели) - мыши, которым не вводили ЭБ. Верхняя панель - выраженное в процентах количество В-клеток селезенки у мышей, которым вводили эритроциты барана (ЭБ). На оси y указано выраженное в процентах количество клеток селезенки, которые представляют собой В-клетки. Средняя панель - выраженное в процентах количество  $\text{CD4}^+$  Т-клеток селезенки, которые представляют собой Т-клетки памяти мышей, которым вводили ЭБ. Нижняя панель - уровни антител к ЭБ в сыворотке мышей, которым вводили ЭБ;

фиг. 8А - протеинурия у мышей линии NZB/NZW, на которых воздействовали различными белками. Способы описаны в примере 2. Для каждой группы мышей воздействие указано следующим образом: закрашенные круги - фосфатно-буферный раствор (PBS); закрашенные квадраты - IgG1 мыши (изотипический контроль; 5 мг/кг); незакрашенные квадраты - антитело к mB7RP1 (4,68 мг/кг); закрашенные треугольники вершиной вверх -  $\alpha\text{BAFF}$  (1,88 мг/кг); незакрашенные треугольники вершиной вверх -  $\alpha\text{BAFF}$  (1,88 мг/кг) в дополнение к антителу к mB7RP1 (4,68 мг/кг); и незакрашенные треугольники вершиной вниз - мышинная гомологичная молекула (5 мг/кг). На оси x указан возраст мышей (месяцы), а на оси y указан процент мышей с протеинурией, т.е.  $\geq 300$  мг/дл белка в моче;

фиг. 8В - уровни антител к двухцепочечной ДНК (дцДНК) у мышей линии NZB/NZW в возрасте 8,5 месяцев, которые получили различные белки. Способы описаны в примере 2. На оси x указаны идентификаторы молекулы(л), которые получили мыши, что приведено ниже: 1, антитело к mB7RP1 (4,68 мг/кг); 2,  $\alpha\text{BAFF}$  (1,88 мг/кг); 3,  $\alpha\text{BAFF}$  (1,88 мг/кг) в дополнение к антителу к mB7RP1 (4,68 мг/кг); 4, биспецифические мышинные гомологичные молекулы (5 мг/кг); и 5, mlgG1 (изотипический контроль; 5 мг/кг). На оси y указаны уровни антител к дцДНК, которые были определены в процентах от положительного контроля. Каждая точка служит для обозначения данных для одной мыши;

фиг. 9А - уровни IgG к дцДНК у мышей линии NZB/NZW. Способы описаны в примере 2. Данные для различных групп мышей представлены следующим образом: 1, мыши, которые получали антитело к mB7RP1 (14 мг/кг); 2, мыши, которые получали  $\alpha\text{BAFF}$  (5,6 мг/кг); 3, мыши, которые получали комбинацию антитела к mB7RP1 (14 мг/кг) и  $\alpha\text{BAFF}$  (5,6 мг/кг); 4, мыши, которые получали мышинные гомологичные молекулы (15 мг/кг); 5, мыши, которые получали изотипический контроль mlgG (15 мг/кг); и 6, мыши, которые получали PBS. Звездочки выше столбцов 1, 3 и 4 обозначают статистически значимые различия (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*\*,  $p < 0,0001$ ) между данными этих столбцов и данными столбца 5 (mlgG);

фиг. 9В - выраженное в процентах количество имеющих протеинурию мышей линии NZB/W F<sub>1</sub> в каждой группе. Способы описаны в примере 2. Данные для различных групп мышей представлены следующим образом: незакрашенные квадраты - мыши, которые получали антитело к mB7RP1 (14 мг/кг); закрашенные треугольники вершиной вверх - мыши, которые получали  $\alpha\text{BAFF}$  (5,6 мг/кг); незакрашенные треугольники вершиной вверх - мыши, которые получали комбинацию антитела к mB7RP1 (14 мг/кг) и  $\alpha\text{BAFF}$  (5,6 мг/кг); незакрашенные треугольники вершиной вниз - мыши, которые получали мышинные гомологичные молекулы (15 мг/кг); закрашенные квадраты - мыши, которые получали изотипический контроль mlgG (15 мг/кг); и закрашенные круги - мыши, которые получали PBS. Статистически значимые различия были обнаружены между результатами для мышинной гомологичной молекулы по сравнению с антителом mB7RP1 ( $p < 0,01$ ),  $\alpha\text{BAFF}$  ( $p < 0,0001$ ) и mlgG ( $p < 0,0001$ ). Указан интервал времени, когда осуществлялось воздействие;

фиг. 10 - показатели патоморфологических изменений почек мышей линии NZB/W F<sub>1</sub>. Согласно пояснениям, приведенным в примере 2, почки получали после смерти мышей, если это происходило до конца исследования или в конце исследования. Показатели патоморфологических изменений почек были определены, как описано в примере 2, причем высокие показатели свидетельствуют о большей тяжести заболевания почек. В дополнение к средним значениям для каждой группы мышей показаны соответствующие планки погрешностей. Группы мышей получали следующие антитела: 1) антитело к mB7RP1 (14 мг/кг), столбец, заштрихованный вертикальными линиями; 2)  $\alpha\text{BAFF}$  (5,6 мг/кг), столбец, заштрихованный горизонтальными линиями; 3) комбинация антитела к mB7RP1 (14 мг/кг) и  $\alpha\text{BAFF}$  (5,6 мг/кг), столбец со штриховкой в клеточку; 4) мышинная гомологичная молекула (15 мг/кг), столбец с шахматной штриховкой; 5) mlgG (15 мг/кг), столбец с белыми точками на черном фоне; и 6) PBS, закрашенный столбец. Звездочками обозначены статистически значимые различия между данными, полученными для мышей, получавших mlgG, с  $p$ -значением  $< 0,05$  (\*) или  $< 0,001$  (\*\*\*)

фиг. 11 - влияние ингибирования BAFF и/или B7RP1 на мышей с коллаген-индуцированным артритом. Способы описаны в примере 4. Пять групп мышей получали исследуемые вещества, указанные ниже: mIgG, окрашенные квадраты, соединенные жирными линиями; PBS, окрашенные квадраты, соединенные пунктирными линиями; антитело к mB7RP1, окрашенные круги, соединенные пунктирными линиями;  $\alpha$ BAFF, незакрашенные круги, соединенные жирными линиями; и комбинация антитела к mB7RP1 и  $\alpha$ BAFF, окрашенные круги, соединенные жирными линиями. На верхней панели показана выраженная в процентах частота случаев развития артрита для различных групп, и на нижней панели показаны средние показатели степени тяжести артрита для этих групп. Вертикальная, направленная вниз стрелка на каждой панели обозначает время второй иммунизации бычьим коллагеном.

**Краткое описание перечней последовательностей**

НОМЕР ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ	ОПИСАНИЕ
SEQ ID NO:1	Аминокислотная последовательность BAFF-связывающего пептида.
SEQ ID NO:2	Аминокислотная последовательность BAFF-связывающего пептида.
SEQ ID NO:3	Аминокислотная последовательность BAFF-связывающего пептида.
SEQ ID NO:4	Аминокислотная последовательность линкера.
SEQ ID NO:5	Аминокислотная последовательность линкера.
SEQ ID NO:6	Аминокислотная последовательность линкера.
SEQ ID NO:7	Аминокислотная последовательность линкера.
SEQ ID NO:8	Аминокислотная последовательность CDR1 легкой цепи.
SEQ ID NO:9	Аминокислотная последовательность CDR2 легкой цепи.
SEQ ID NO:10	Аминокислотная последовательность CDR3 легкой цепи.
SEQ ID NO:11	Аминокислотная последовательность CDR1 тяжелой цепи.
SEQ ID NO:12	Аминокислотная последовательность CDR2 тяжелой цепи.
SEQ ID NO:13	Аминокислотная последовательность CDR3 тяжелой цепи.
SEQ ID NO:14	Аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи.
SEQ ID NO:15	Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи.
SEQ ID NO:16	Аминокислотная последовательность тяжелой цепи биспецифической молекулы P71619 BAFF/B7RP1.
SEQ ID NO:17	Аминокислотная последовательность тяжелой цепи биспецифической молекулы P74293 BAFF/B7RP1.
SEQ ID NO:18	Аминокислотная последовательность тяжелой цепи биспецифической молекулы P74294

## 035388

	BAFF/B7RP1.
SEQ ID NO:19	Аминокислотная последовательность легкой цепи антитела IgG к huB7RP1
SEQ ID NO:20	Аминокислотная последовательность, предшествующая CDR1 тяжелой цепи.
SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность, предшествующая CDR2 тяжелой цепи.
SEQ ID NO:22	Аминокислотная последовательность, следующая за CDR3 тяжелой цепи.
SEQ ID NO:23	Аминокислотная последовательность, следующая за CDR3 легкой цепи.
SEQ ID NO:24	Линкер
SEQ ID NO:25	Аминокислотная последовательность тяжелой цепи антитела IgG к B7RP1.
SEQ ID NO: 26	Аминокислотная последовательность тяжелой цепи конструкции P71617.
SEQ ID NO:27	Аминокислотная последовательность тяжелой цепи конструкции P71618.
SEQ ID NO:28	Аминокислотная последовательность тяжелой цепи конструкции P71620.
SEQ ID NO:29	Аминокислотная последовательность тяжелой цепи конструкции P71621.
SEQ ID NO:30	Аминокислотная последовательность тяжелой цепи конструкции P71622.
SEQ ID NO:31	Аминокислотная последовательность тяжелой цепи конструкции P71623.
SEQ ID NO:32	Аминокислотная последовательность пептитела $\alpha$ BAFF
SEQ ID NO:33	Аминокислотная последовательность Fc-участка IgG1 человека.
SEQ ID NO:34	Аминокислотная последовательность Fc-

	участка IgG2 человека.
SEQ ID NO:35	Аминокислотная последовательность Fc-участка IgG3 человека.
SEQ ID NO:36	Аминокислотная последовательность Fc-участка IgG4 человека.
SEQ ID NO:37	Аминокислотная последовательность линкера.
SEQ ID NO:38	Аминокислотная последовательность линкера.
SEQ ID NO:39	Аминокислотная последовательность линкера.
SEQ ID NO:40	Аминокислотная последовательность линкера.
SEQ ID NO:41	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1.
SEQ ID NO:42	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4.
SEQ ID NO:43	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5.
SEQ ID NO:44	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6.
SEQ ID NO:45	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7.
SEQ ID NO:46	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8.
SEQ ID NO:47	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9.
SEQ ID NO:48	Последовательность нуклеиновой кислоты,

	кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10.
SEQ ID NO:49	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11.
SEQ ID NO:50	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12.
SEQ ID NO:51	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13.
SEQ ID NO:52	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14.
SEQ ID NO:53	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15.
SEQ ID NO:54	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16.
SEQ ID NO:55	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17.
SEQ ID NO:56	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18.
SEQ ID NO:57	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19.
SEQ ID NO:58	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную

	последовательность SEQ ID NO:24.
SEQ ID NO:59	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:25.
SEQ ID NO:60	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:26.
SEQ ID NO:61	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27.
SEQ ID NO:62	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28.
SEQ ID NO:63	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29.
SEQ ID NO:64	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30.
SEQ ID NO:65	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31..
SEQ ID NO:66	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32.
SEQ ID NO:67	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33
SEQ ID NO:68	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34.
SEQ ID NO:69	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35.
SEQ ID NO:70	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36.
SEQ ID NO:71	Аминокислотная последовательность линкера.
SEQ ID NO:72	Аминокислотная последовательность линкера.

#### Подробное описание изобретения

В документе предложены биспецифические белки, которые связываются и ингибируют и фактор активации В-клеток человека (BAFF; также известный как BLYS, TALL1, THANK или TNFSF13B), и В7-родственный белок 1 (B7RP1; также известный как лиганд ICOS, ICOSL, LICOS, гомолог 2 В7, В7Н2 и GL50), нуклеиновые кислоты, кодирующие эти биспецифические белки, и способы получения и использования этих белков. Биспецифические белки могут ингибировать и BAFF-опосредованную пролиферацию В-клеток, и B7RP1-опосредованную пролиферацию Т-клеток. В другом аспекте биспецифические белки могут ингибировать связывание B7RP1 с Т-клетками. Такой биспецифический белок может представлять собой антитело IgG с двумя разными тяжелыми цепями и двумя разными легкими цепями, причем одна пара тяжелой цепи/легкой цепи связывается с BAFF, а другая связывается с B7RP1. В альтернативном варианте B7RP1-связывающий участок биспецифического белка может содержать антитело IgG, включающее две идентичные тяжелые цепи и две идентичные легкие цепи, и BAFF-связывающий участок биспецифического белка может содержать один или более BAFF-связывающих пептидов, которые

могут быть слиты с антителом B7RP1, необязательно через N-конец тяжелой или легкой цепи иммуноглобулина, карбоксильный конец тяжелой цепи иммуноглобулина и/или в пределах CH2- и/или CH3-участка тяжелой цепи иммуноглобулина.

Определения.

В настоящем документе подразумевается, что "антитело" представляет собой белок, содержащий переменный домен тяжелой и/или легкой цепи иммуноглобулина.

В настоящем документе подразумевается, что "биспецифический белок" представляет собой белок, который может специфически связываться с двумя разными молекулами, которые в некоторых вариантах реализации изобретения представляют собой белки. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения биспецифический белок может связываться и с BAFF, MB7RP1.

Пациент получает "параллельное" лечение двумя или более терапевтическими средствами, если получает два или более терапевтических средств на протяжении одинакового периода времени, необязательно в одно и то же время. Например, если пациент регулярно принимает одно терапевтическое средство ежесуточно, а также регулярно принимает другое терапевтическое средство раз в месяц, данный пациент получает эти лекарственные средства параллельно. Аналогичным образом пациент, который принимает два разных терапевтических средства, каждое из которых вводят каждые две недели, но не в один и тот же день, получает параллельное лечение двумя терапевтическими средствами. Кроме того, пациент, регулярно получающий одно терапевтическое средство раз в неделю и другое терапевтическое средство раз в сутки в течение всего лишь трех суток, получает лечение этими двумя терапевтическими средствами в течение короткого периода.

В настоящем документе подразумевается, что "Fc-участок" представляет собой димер, состоящий из двух полипептидных цепей, соединенных одной или более дисульфидными связями, причем каждая цепь содержит часть или весь шарнирный домен в дополнение к CH2- и CH3-домену. Каждая из полипептидных цепей называется "полипептидной цепью Fc-участка". В частности, Fc-участки, которые предусмотрены для применения в настоящем изобретении, представляют собой Fc-участки IgG, которые могут представлять собой Fc-участки IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 млекопитающих, например человека. Среди Fc-участков IgG1 человека, по меньшей мере, известны два аллельных типа. Аминокислотные последовательности полипептидной цепи Fc-участка могут отличаться от аминокислотных последовательностей полипептида Fc-участка млекопитающих не более чем на 20, 15, 12, 10, 8, 5 или 3 замещения, вставки или делеции одной аминокислоты в сравнении с аминокислотной последовательностью полипептида Fc-участка млекопитающих. В альтернативном варианте или в дополнение к этому, аминокислотная последовательность полипептидной цепи Fc-участка может отличаться от последовательности известной или природной полипептидной цепи Fc-участка не более чем на 10 вставок, делеций или замещений одной аминокислоты на каждые 100 аминокислот последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения такие вариации могут представлять собой "изменения, обеспечивающие гетеродимеризацию", которые способствуют образованию гетеродимеров по сравнению с гомодимерами. Ссылаясь на определенные положения в пределах полипептидной цепи Fc-участка, используют систему нумерации EU (Edelman et al. (1969), Proc. Natl. Acad. Sci. 63: 78-85), что проиллюстрировано ниже в табл. 1 в виде выравнивания полипептидных цепей Fc-участка IgG человека.

Таблица 1. Выравнивание аминокислотных последовательностей Fc-участков IgG человека

IgG1	-----					
IgG2	ELKTPPLGDTTHTCPRCPKSCDTPPPCPRCPKSCDTPPPCPRCP					
IgG3	-----					
IgG4	-----					
	225	235	245	255	265	275
	*	*	*	*	*	*
IgG1	EPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF					
IgG2	ERKCCVE---CPPCPAPPVA-GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF					
IgG3	EPKSCDTPPPCPRCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF					
IgG4	ESKYG---PPCPSCPAPPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQF					
	285	295	305	315	325	335
	*	*	*	*	*	*
IgG1	NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT					
IgG2	NWYVDGMEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSIVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKT					
IgG3	KWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT					
IgG4	NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT					
	345	355	365	375	385	395
	*	*	*	*	*	*
IgG1	ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP					
IgG2	ISKTKGQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP					
IgG3	ISKTKGQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTP					
IgG4	ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP					
	405	415	425	435	445	
	*	*	*	*	*	
IgG1	PVLDSGSGFFLYSKLTVDKSRWQGNVFSQSVMEALHNNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 33)					
IgG2	PMLDSGSGFFLYSKLTVDKSRWQGNVFSQSVMEALHNNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 34)					
IgG3	PMLDSGSGFFLYSKLTVDKSRWQGNVFSQSVMEALHNNRFTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 35)					
IgG4	PVLDSGSGFFLYSRLTVDKSRWQGNVFSQSVMEALHNNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 36)					

В некоторых положениях могут встречаться природные полиморфизмы. Например, метионин в положении 282 в приведенной выше последовательности IgG2 чаще представляет собой валин в природных последовательностях IgG2. Аналогичным образом тирозин в положении 296 в последовательности IgG3 также может представлять собой фенилаланин.

Термин "изменения, обеспечивающие гетеродимеризацию", в целом, относится к изменениям в СН3-участках двух разных тяжелых цепей IgG, которые способствуют образованию гетеродимерных димеров тяжелых цепей, т.е. в димеризованных тяжелых цепях отсутствуют идентичные аминокислотные последовательности. Изменения, обеспечивающие гетеродимеризацию, могут быть асимметричными, т.е. одна тяжелая цепь, имеющая определенное изменение, может образовывать пару с другой тяжелой цепью, имеющей другое изменение. Эти изменения способствуют гетеродимеризации и затрудняют гомодимеризацию. Одним из примеров таких парных изменений, обеспечивающих гетеродимеризацию, являются так называемые замещения по типу "выступы и впадины". См., например, патент США № 7695936 и публикацию заявки на патент США 2003/0078385, во фрагментах которых описаны такие мутации и которые включены в настоящий документ посредством ссылки. В настоящем документе подразумевается, что в паре тяжелая цепь/тяжелая цепь, в которой содержится одна пара замещений по типу выступов и впадин, содержится одно замещение в одной тяжелой цепи и другое замещение в другой тяжелой цепи. Например, было обнаружено, что следующие замещения по типу выступы и впадины увеличивают образование гетеродимеров по сравнению с тем, что было обнаружено для немодифицированных тяжелых цепей. 1) Y407T в одной цепи и T366Y в другой; 2) Y407A в одной цепи и T366W в другой; 3) F405A в одной цепи и T394W в другой; 4) F405W в одной цепи и T394S в другой; 5) Y407T в одной цепи и T366Y в другой; 6) T366Y и F405A в одной цепи и T394W и Y407T в другой; 7) T366W и F405W в одной цепи и T394S и Y407A в другой; 8) F405W и Y407A в одной цепи и T366W и T394S в другой; и 9) T366W в одном полипептиде Fc и T366S, L368A и Y407V в другом. В настоящем документе подразумевается, что мутации в Fc-полипептиде обозначены следующим образом. За аминокислотой (обозначенной с использованием однобуквенного кода), обычно присутствующей в конкретном положении в СН3-участке, обозначенном с использованием системы нумерации EU (которая представлена в Edelman et al. (1969), Proc. Natl. Acad. Sci. 63: 78-85), следует аминокислота с номером положения согласно EU, за которой следует альтернативная аминокислота, которая присутствует в этом положении. Например, Y407T означает, что тирозин, обычно присутствующий в положении 407 согласно EU, замещен на треонин. Для полной ясности система нумерации EU проиллюстрирована ниже в табл. 1. В качестве альтернативы или в дополнение к таким изменениям, замещения, при которых образуются новые дисульфидные мостики, могут способствовать образованию гетеродимеров. См., например, публикацию заявки на патент США 2003/0078385, во фрагментах которой описаны такие мутации и которая включена в настоящий документ посредством ссылки. Такие изменения в Fc-участке IgG1 включают, например, следующие замещения: Y349C в одной полипептидной цепи Fc-участка и S354C в другой; Y349C в одной полипептидной цепи Fc-участка и E356C в другой; Y349C в одной полипептидной цепи Fc-участка и E357C в другой; L351C в одной полипептидной цепи Fc-участка и S354C в другой; T394C в одной полипептидной цепи Fc-участка и E397C в другой; или D399C в одной полипептидной цепи Fc-участка и K392C в другой. Аналогичным образом замещения, при которых изменяется заряд одного или более остатков, например на стыке СН3-СН3, могут усиливать образование гетеродимеров согласно пояснениям, приведенным в WO 2009/089004, во фрагментах которого описаны такие замещения и который включен в настоящий документ посредством ссылки. Такие замещения в настоящем документе называются "парными замещениями с изменением заряда", и Fc-участок, содержащий одно парное замещение с изменением заряда, содержит одно замещение в одной тяжелой цепи и другое замещение в другой. Общие примеры парных замещений с изменением заряда включают следующие: 1) R409D, R409E, K409D или K409E в одной цепи в дополнение к D399K или D399R в другой; 2) N392D, N392E, K392D или K392E в одной цепи в дополнение к D399K или D399R в другой; 3) K439D или K439E в одной цепи в дополнение к E356K, E356R, D356K или D356R в другой; и 4) K370D или K370E в одной цепи в дополнение к E357K или E357R в другой. В дополнение к этому, замещения Q355D, Q355E, R355D, R355E, K360D или K360R в обеих цепях могут стабилизировать гетеродимеры при использовании с другими изменениями, обеспечивающими гетеродимеризацию. Такие парные замещения с изменением заряда могут быть использованы либо отдельно, либо с другими парными замещениями с изменением заряда. Конкретные примеры одиночных парных замещений с изменением заряда или их комбинаций включают следующие: 1) K409E в одной цепи в дополнение к D399K в другой; 2) K409E в одной цепи в дополнение к D399R в другой; 3) K409D в одной цепи в дополнение к D399K в другой; 4) K409D в одной цепи в дополнение к D399R в другой; 5) K392E в одной цепи в дополнение к D399R в другой; 6) K392E в одной цепи в дополнение к D399K в другой; 7) K392D в одной цепи в дополнение к D399R в другой; 8) K392D в одной цепи в дополнение к D399K в другой; 9) K409D и K360D в одной цепи в дополнение к D399K и E356K в другой; 10) K409D и K370D в одной цепи в дополнение к D399K и E357K в другой; 11) K409D и K392D в одной цепи в дополнение к D399K, E356K и E357K в другой; 12) K409D и K392D на одной цепи и D399K на другой; 13) K409D и K392D на одной цепи в дополнение к D399K и E356K на другой; 14) K409D и K392D на одной цепи в дополнение к D399K и D357K на другой; 15) K409D и K370D на одной цепи в дополнение к D399K и

D357K на другой; 16) D399K на одной цепи в дополнение к K409D и K360D на другой; и 17) K409D и K439D на одной цепи в дополнение к D399K и E356K на другой. Любые из этих изменений, обеспечивающих гетеродимеризацию, могут касаться тяжелой цепи иммуноглобулина IgG, что описано в настоящем документе.

В настоящем документе подразумевается, что "человеческое" антитело или белок представляет собой антитело или белок, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты человеческого происхождения. Человеческое антитело или белок могут быть получены с использованием культивированных клеток нечеловеческого происхождения или *in vivo* в трансгенном организме, в клетки которого была введена молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая человеческое антитело или белок. В альтернативном варианте человеческое антитело или белок могут быть получены с использованием культивированных клеток человека или из организма человека *in vivo*.

В настоящем документе подразумевается, что "антитело IgG" представляет собой антитело, которое, по существу, состоит из доменов иммуноглобулина, присутствующих в большинстве антител IgG природного происхождения, т.е. из тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащей вариабельный домен тяжелой цепи (VH), первый константный домен тяжелой цепи (CH1), шарнирную область, второй константный домен тяжелой цепи (CH2) и третий константный домен тяжелой цепи (CH3), и легкой цепи, содержащей вариабельный домен легкой цепи (VL) и константный домен легкой цепи (CL). В научной литературе сообщается о многочисленных последовательностях таких доменов иммуноглобулина, например, Sequences of Immunological Interest, Public Health Service, N.I.H., Bethesda, MD, 1991. В настоящем документе подразумевается, что антитело IgG представляет собой тетрамер, по существу, состоящий из двух тяжелых цепей и двух легких цепей. В настоящем документе подразумевается, что антитела природного происхождения, содержащие две тяжелые цепи иммуноглобулина и не содержащие легких цепей, как, например, некоторые антитела, характерные для верблюдов и акул (см., например, Muyldermans et al., 2001, J. Biotechnol. 74:277-302; Desmyter et al., 2001, J. Biol. Chem. 276:26285-90; Streltsov et al. (2005), Protein Science 14: 2901-2909), не являются антителами IgG. Антитело IgG может представлять собой антитело человека или может принадлежать другому виду. В дополнение к этому антитело IgG может содержать не более чем 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10 или 5 замещений, вставок и/или делеций одной аминокислоты по сравнению с аминокислотной последовательностью тяжелой или легкой цепей антитела IgG природного происхождения.

"Тяжелая цепь иммуноглобулина" относится к тяжелой цепи антител IgG, IgA, IgM, IgE или IgD или их вариантов, содержащих не более чем 40, 30, 25, 20, 15, 10 или 5 вставок, делеций или замещений одной аминокислоты по сравнению с тяжелой цепью иммуноглобулина, кодируемой последовательностями нуклеиновой кислоты природного происхождения. "Тяжелая цепь иммуноглобулина IgG" ограничивается тяжелыми цепями из антител IgG или их вариантов, содержащих не более чем 40, 30, 25, 20, 15, 10 или 5 вставок, делеций или замещений одной аминокислоты по сравнению с тяжелой цепью иммуноглобулина IgG, кодируемой последовательностями нуклеиновой кислоты природного происхождения. Тяжелая цепь иммуноглобулина, по существу, состоит из ряда различных участков или доменов, включая VH-участок, CH1-участок, шарнирную область, CH2-участок и CH3-участок. В некоторых других изоформах, т.е. IgM и IgA, включены дополнительные области за CH3-участок. Тяжелые цепи и участки иммуноглобулинов, входящие в их состав, в целом, описаны, например, в Carayannopoulos and Capra, Immunoglobulins: Structure and Function, pp. 283-314 в Fundamental Immunology, 3<sup>rd</sup> Ed, Paul, ed., Raven Press, New York, 1993, который включен в настоящий документ посредством ссылки. В дополнение к этому, в данной области техники известны многочисленные последовательности подобластей тяжелых цепей иммуноглобулина. См., например, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Public Health Service N.I.H., Bethesda, MD, 1991. В некоторых случаях полипептидная цепь, которая включает тяжелую цепь иммуноглобулина в дополнение к некоторым последовательностям неиммуноглобулиновой природы, в настоящем документе называется "тяжелой цепью".

В настоящем документе подразумевается, что "легкая цепь иммуноглобулина" представляет собой каппа- или лямбда- цепь из человеческого антитела или антитела, полученного из других видов. В настоящем документе подразумевается, что среди легких цепей иммуноглобулина также включены белки с не более чем 20, 15, 10 или 5 вставками, делециями и/или замещениями одной аминокислоты по сравнению с легкой цепью иммуноглобулина, кодируемой последовательностями нуклеиновой кислоты природного происхождения. Легкие цепи иммуноглобулинов, в целом, описаны, например, в Carayannopoulos and Capra, Immunoglobulins: Structure and Function, pp. 283-314 в Fundamental Immunology, 3<sup>rd</sup> Ed, Paul, ed., Raven Press, New York, 1993, который включен в настоящий документ посредством ссылки. Легкая цепь иммуноглобулина содержит VL-участок и CL-участок. В данной области техники известны многие последовательности этих участков. См., например, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Public Health Service N.I.H., Bethesda, MD, 1991. В некоторых случаях полипептидная цепь, которая включает легкую цепь иммуноглобулина в дополнение к некоторым последовательностям неиммуноглобулиновой природы, в настоящем документе называется "легкой цепью".

В настоящем документе подразумевается, что "вариабельный домен иммуноглобулина" представляет собой VH- или VL-домен, который может быть человеческого происхождения или может принадле-

лежать другому виду.

Вариабельные домены иммуноглобулинов, в целом, описаны, например, в Carayannopoulos and Carga, *Immunoglobulins: Structure and Function*, pp. 283-314 в *Fundamental Immunology*, 3<sup>rd</sup> Ed, Paul, ed., Raven Press, New York, 1993, который включен в настоящий документ посредством ссылки. В настоящем документе подразумевается, что среди вариабельных доменов иммуноглобулинов также включены белки с не более чем 20, 15, 10 или 5 вставками, делециями и/или замещениями одной аминокислоты по сравнению с вариабельным доменом иммуноглобулинов, кодируемой последовательностями нуклеиновой кислоты природного происхождения. Вариабельный домен иммуноглобулинов содержит три гипервариабельных участка, известные как определяющий комплементарность участок 1 (CDR1), определяющий комплементарность участок 2 (CDR2) и определяющий комплементарность участок 3 (CDR3). Эти участки формируют антигенсвязывающий сайт антитела. CDR встроены в менее вариабельные каркасные участки (FR1-FR4). Порядок этих подучастков в пределах вариабельного домена представлен ниже: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. В данной области техники известны многие вариабельные домены иммуноглобулинов. См., например, Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Public Health Service N.I.H., Bethesda, MD, 1991.

CDR могут располагаться в последовательности VH-участка следующим образом. CDR1 начинается с около 31-го остатка зрелого VH-участка и обычно имеет длину около 5-7 аминокислот, и почти всегда ей предшествует Cys-Xxx-Xxx-Xxx-Xxx-Xxx-Xxx-Xxx (SEQ ID NO: 20) (где "Xxx" представляет собой любую аминокислоту). Остаток, следующий за CDR1 тяжелой цепи, почти всегда представляет собой триптофан, часто Trp-Val, Trp-Ile или Trp-Ala. Четырнадцать аминокислот почти всегда расположены между последним остатком в CDR1 и первым в CDR2, и CDR2 обычно содержит от 16 до 19 аминокислот. CDR2 непосредственно может предшествовать Leu-Glu-Trp-Ile-Gly (SEQ ID NO: 21), и непосредственно за ней может следовать Lys/Arg-Leu/Ile/Val/Phe/Thr/Ala-Thr/Ser/Ile/Ala. Другие аминокислоты могут предшествовать или следовать за CDR2. Тридцать две аминокислоты почти всегда расположены между последним остатком в CDR2 и первым в CDR3, и длина CDR3 обычно составляет от около 3 до 25 аминокислот. Cys-Xxx-Xxx почти всегда непосредственно предшествует CDR3, и Trp-Gly-Xxx-Gly (SEQ ID NO: 22) почти всегда следует за CDR3.

CDR легкой цепи могут быть расположены в VL-области следующим образом. CDR1 начинается с около 24-го остатка зрелого антитела и почти всегда ее длина составляет от около 10 до 17 остатков. Почти всегда ей предшествует Cys. Почти всегда между последним остатком CDR1 и первым остатком CDR2 расположены 15 аминокислот, и длина CDR2 почти всегда составляет 7 остатков. CDR2 обычно предшествует Ie-Tyr, Val-Tyr, Ile-Lys или Ile-Phe. Почти всегда между CDR2 и CDR3 расположены 32 остатка, и длина CDR3 обычно составляет от 7 до 10 аминокислот. Почти всегда CDR3 предшествует Cys, и обычно за ней следует Phe-Gly-Xxx-Gly (SEQ ID NO: 23).

В настоящем документе подразумевается, что "линкер" представляет собой пептид, который связывает два полипептида. Длина линкера может составлять 1-80 аминокислот. В некоторых вариантах реализации изобретения длина линкера может составлять 2-40, 3-30 или 3-20 аминокислот. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер может представлять собой пептид, длина которого составляет не более чем 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 или 5 аминокислот. В других вариантах реализации изобретения длина линкера может составлять 5-25, 5-15, 10-20 или 20-30 аминокислот. В других вариантах реализации изобретения длина линкера может составлять около 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 аминокислот. Во многих случаях в линкерах отсутствуют остатки цистеина (т.е. они, таким образом, не вовлечены в образование дисульфидных связей), и также они не содержат сайтов N-гликозилирования (т.е. Asn-Xxx-Ser/Thr, где X может представлять собой любую аминокислоту кроме пролина).

В настоящем документе подразумевается, что "пептидное антитело" представляет собой один или более биологически активных пептидов, слитых с Fc-участком. Shimamoto et al. (2012), *mAbs* 4(5): 586-591, фрагменты которого, где объясняется структура пептидного антитела и как его получить, включены в настоящий документ посредством ссылки.

В настоящем документе подразумевается, что "пептид" представляет собой полипептид, который состоит из короткой аминокислотной последовательности, которая может быть или не быть гликозилированной и/или содержать модифицированные аминокислоты. Длина пептида может составлять от 2 до 75 аминокислот. В некоторых вариантах реализации изобретения длина пептида составляет 3-60, 3-50, 3-40, 3-30 или 3-20 аминокислот. В других вариантах реализации изобретения длина пептида может составлять 5-25, 5-15, 10-20 или 20-30 аминокислот. В других вариантах реализации изобретения длина пептида может составлять около 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 аминокислот.

"Терапевтически эффективное количество" лекарственного вещества, используемое для лечения заболевания - это количество, которое может обеспечивать уменьшение тяжести заболевания, уменьшение тяжести одного или более симптомов, ассоциированных с заболеванием или его лечением, или задерживать появление более тяжелых симптомов или более тяжелого заболевания, которые могут возникать с некоторой частотой после лечения заболевания.

"Лечение" любого заболевания, указанного в настоящем документе, охватывает облегчение по меньшей мере одного симптома заболевания, уменьшение тяжести заболевания, задержку или предотвращение развития заболевания до более тяжелых симптомов, которые в некоторых случаях могут сопровождать заболевание или приводить, по меньшей мере, к появлению еще одного заболевания. Под лечением не подразумевается полное излечение заболевания. Необходимо, чтобы пригодное к использованию терапевтическое средство уменьшало тяжесть заболевания, одного или более симптомов, ассоциированных с заболеванием или его лечением, или задерживать появление более тяжелых симптомов или более тяжелого заболевания, которые могут возникать с некоторой частотой после лечения заболевания. Например, если заболеванием является воспалительное заболевание кишечника, терапевтическое средство, используемое для лечения, может уменьшать количество отдельных очагов воспаления в кишечнике или общую степень поражения кишечника. Оно может уменьшать боль и/или отек, уменьшать симптомы, как, например, понос, запор или рвота, и/или предотвращать перфорацию кишечника. Состояние пациента можно оценить с помощью стандартных методов, таких как рентгеноскопия, которая проводится после бариевой клизмы или субкавального промывания кишечника, эндоскопия, колоноскопия и биопсия. Выбор подходящего метода будет зависеть от состояния и симптомов пациента. Аналогичным образом, если заболеванием является системная красная волчанка (СКВ), активность заболевания можно оценить с использованием индекса SLEDAI для балльной оценки, что объясняется ниже.

Биспецифические белки, которые связываются с BAFF и B7RP1.

В настоящем документе раскрыты биспецифические белки, которые связываются с B7RP1 и BAFF и/или которые могут ингибировать B7RP1-опосредованную пролиферацию Т-клеток и BAFF-опосредованную пролиферацию В-клеток *in vitro*. Белки BAFF и B7RP1, с которыми связывается биспецифический белок, который описан в настоящем документе, могут представлять собой человеческие белки или принадлежать другому виду, как, например, в числе прочих яванский макак, макак-резус, шимпанзе, мышь и/или кролик. В некоторых вариантах реализации изобретения биспецифический белок, который описан в настоящем документе, например, может связываться с белками B7RP1 и BAFF и человека (*Homo sapiens*), и яванского макака (*Macaca fascicularis*).

В некоторых вариантах реализации изобретения эти биспецифические белки могут представлять собой биспецифические антитела IgG, в которых каждый B7RP1-связывающий участок и BAFF-связывающий участок, по существу, состоит из тяжелой цепи иммуноглобулина IgG и легкой цепи иммуноглобулина. Следовательно, такое биспецифическое антитело содержит две разные тяжелые цепи иммуноглобулина и две разные легкие цепи иммуноглобулина. В целом, эти две пары тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина формируют полное биспецифическое антитело IgG. Биспецифические антитела IgG известны в данной области техники и также известен целый ряд других форм биспецифических антител. См., например, Kontermann, *Bispecific Antibodies: Developments and Current Perspectives*, pp. 1-28 in *Bispecific Antibodies*, Kontermann, ed., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2011, во фрагментах которого описаны такие антитела и который включен в настоящий документ посредством ссылки. В настоящем изобретении предусмотрено применение антител, которые могут связываться с BAFF и B7RP1 независимо от формы. Биспецифические антитела IgG могут быть человеческими, гуманизированными или химерными и могут принадлежать к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах реализации изобретения биспецифические антитела IgG могут быть конъюгированы с другими группами. Аминокислотные последовательности антител к BAFF и B7RP1 известны в данной области техники. См., например, патент США 7737111 и публикацию заявки на патент США 2011/0117093. Фрагменты этих документов, в которых описаны такие антитела, включены в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах реализации изобретения в таких биспецифических антителах могут происходить "изменения, обеспечивающие гетеродимеризацию", которые были описаны выше, включая замещения зарядов в парах остатков, которые способствуют образованию гетеротетрамерного биспецифического антитела IgG.

В других вариантах реализации изобретения биспецифические белки, описанные в настоящем документе, могут представлять собой слитые белки, содержащие антитело, которое связывается с B7RP1, которое содержит тяжелую цепь иммуноглобулина IgG и легкую цепь иммуноглобулина, и пептид, который связывается с BAFF. BAFF-связывающий пептид может присутствовать в одной или многих копиях, как, например, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми или вплоть до 16 копий. BAFF-связывающий пептид может связываться с BAFF-белками, принадлежащими видам, таким как, мышь, яванский макак и/или человек среди многих других возможных видов. Антитело может представлять собой антитело IgG к B7RP1, необязательно человеческое или гуманизированное антитело, которое связывается с B7RP1 человека и/или яванского макака. В некоторых вариантах реализации изобретения к C-концу тяжелой цепи антитела IgG к B7RP1 может быть присоединен линкер с последующим первым BAFF-связывающим пептидом, другим линкером и вторым BAFF-связывающим пептидом. За этими двумя пептидами могут следовать четыре, пять, шесть, семь, восемь или вплоть до шестнадцати BAFF-связывающих пептидов, необязательно перемежающихся линкерами. В альтернативном варианте или в дополнение к этому, один, два, три, четыре, пять, шесть, семь или восемь BAFF-связывающих пептидов могут быть встроены на другом участке в антителе к B7RP1, например на N-конце тяжелой цепи имму-

ноглобулина или легкой цепи иммуноглобулина, или в петельной области в СН2- или СН3-участке. Антитело IgG может представлять собой антитело млекопитающих, как, например, антитело человека или мыши. Антитело к B7RP1 может представлять собой человеческое или гуманизированное антитело IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В таких биспецифических слитых белках, содержащих антитело IgG к B7RP1, биспецифический белок может содержать тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 18, и легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19. Предусмотрены варианты, содержащие тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, содержащую не более чем 30, 25, 20, 15, 10, 5 или 3 вставки, делеции или замещения одной аминокислоты по сравнению с SEQ ID NO: 17 или 18. Аналогичным образом предусмотрены варианты, содержащие легкую цепь иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность, содержащую не более 20, 15, 10, 8, 7, 5 или 3 вставок, делеций или замещений одной аминокислоты по сравнению с SEQ ID NO: 19. Такие биспецифические белки могут представлять собой тетрамеры, содержащие два полипептида, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17 или 18 или ее вариант, и две легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 или ее вариант.

BAFF-связывающий участок биспецифического слитого белка, который описан выше, может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3. Такие BAFF-связывающие пептиды описаны в патенте США 7737111, соответствующие фрагменты которого включены в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах реализации изобретения в биспецифическом белке может присутствовать одна, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать или шестнадцать копий такого BAFF-связывающего пептида. BAFF-связывающий пептид может быть присоединен к карбоксильному концу антитела к B7RP1, например, через линкер. Например, за карбоксильным концом антитела IgG к B7RP1 может следовать линкер, имеющий, например, аминокислотную последовательность Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 4). Примеры других подходящих линкеров среди многих других включают Gly-Gly, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 37), Gly-Gly-Gly-Pro (SEQ ID NO: 38), Gly-Gly-Gly-Gln (SEQ ID NO: 39) и Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 40). За этим линкером может следовать BAFF-связывающий пептид. За BAFF-связывающим пептидом может следовать другой линкер, содержащий, например, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 24. Также может быть использован другой линкер. За этим линкером может следовать другой BAFF-связывающий пептид, содержащий, например, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

В биспецифических слитых белках, описанных непосредственно выше или в биспецифических гетеротетрамерных антителах IgG, описанных выше, VL-участок может содержать CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10 соответственно. CDR1, CDR2 и CDR3 VH-участки могут содержать аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 13 соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения VL-участок антитела IgG может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14 или ее вариант, и VH-участок может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 или ее вариант. Такие варианты последовательностей могут содержать не более 10 делеций, вставок замещений одной аминокислоты на 100 аминокислот в сравнении с эталонной последовательностью.

Белки, содержащие линкер.

В настоящем изобретении предложены линкеры, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5, 6 или 7, которые придают белку, который их содержит, удовлетворительные физические свойства. Как показано в примере 1 ниже, применение двух конкретных линкеров, т.е. линкеров, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7, оказывает положительное влияние на свойства, такие как экспрессия, стабильность и вязкость биспецифической молекулы. Следовательно, целый ряд белков, содержащих эти линкеры, могут обладать удовлетворительными свойствами по сравнению с подобными белками, содержащими другие линкеры.

Применение биспецифических белков в терапевтических целях.

Описанные в настоящем документе биспецифические белки, связывающиеся с BAFF и B7RP1, могут быть использованы в качестве терапевтических средств для лечения по целому ряду показаний, особенно состояний, вызванных аутоантителами, и/или состояний, опосредованных и Т-клетками, и В-клетками. Такие состояния включают, например, СКВ, волчаночный нефрит, АНЦА-положительный васкулит, ревматоидный артрит (РА), дерматомиозит, полимиозит, заболевания желудочно-кишечного тракта, такие как болезнь Крона, язвенный колит и целиакия, заболевания кожи, такие как пузырчатка, пемфигоид и подострая кожная красная волчанка (ПККВ), заболевания нервной системы, такие как рассеянный склероз и хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия (ХВДП), нервно-мышечные заболевания, такие как миастении гравис, заболевания, поражающие почки, такие как синдром Гудпасчера, гломерулонефрит, гематологические заболевания, такие как аутоиммунная гемолитическая анемия (АИГА), идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ИТП) и аутоиммунная нейтропения, заболевания печени, такие как хронический активный гепатит, первичный билиарный цирроз печени, синдром Шегрена, системный склероз, и заболевания эндокринной системы, такие как тиреоидит

Хашимото, болезнь Грейвса, болезнь Аддисона и множественная эндокринная неоплазия (МЭН) (обычно включающие виды сахарного диабета, гипотиреоз, болезнь Аддисона и гонадную дисфункцию). Пациенту, страдающему от любого из этих заболеваний, с лечебной целью можно вводить терапевтически эффективное количество описанного в настоящем документе биспецифического белка.

В одном варианте реализации изобретения биспецифический белок, который может ингибировать ВАФФ-опосредованную пролиферацию В-клеток и В7RP1-опосредованную пролиферацию Т-клеток, может быть использован для лечения пациента, страдающего от СКВ. СКВ представляет собой аутоиммунное заболевание неизвестной этиологии, отличающееся аутореактивностью на ядерные аутоантигены. Она характеризуется такими различными клиническими проявлениями, что возникает вопрос, действительно ли это одно заболевание или это группа родственных состояний. Kotzin (1996) *Systemic lupus erythematosus*. Cell 85: 303-306; Rahman and Isenberg (2008), *Systemic lupus erythematosus*. N. Engl. J. Med., 358: 929-939. Симптомы могут включать следующие: системные симптомы, такие как дискомфорт, утомляемость, лихорадка, отсутствие аппетита и потеря массы тела; разнообразные кожные симптомы, включающие острую, временную сыпь на лице у взрослых, буллезное заболевание и хроническую безобразную сыпь на голове и шее; артрит; мышечная боль и/или слабость; сердечно-сосудистые симптомы, такие как утолщение митрального клапана сердца, вегетации, регургитация, стеноз, перикардит и ишемическая болезнь сердца, некоторые из которых могут завершаться инсультом, эмболическим инфарктом, сердечной недостаточности, инфекционному эндокардиту или недостаточности клапанов; нефрит, который является основной причиной смертности при СКВ; неврологические симптомы, включающие когнитивную дисфункцию, депрессию, психоз, кому, эпилептические припадки, мигрень и другие синдромы, вызывающие головную боль, асептический менингит, хорею, инсульт и нейропатию черепных нервов; гематологические симптомы, включающие лейкопению, тромбоцитопению, серозит, анемию, нарушения свертываемости крови, спленомегалию и лимфаденопатию; и различные нарушения желудочно-кишечного тракта. Id; Vratsanos et al., "Systemic Lupus Erythematosus," Chapter 39 в Samter's *Immunological Diseases*, 6<sup>th</sup> Edition, Austen et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2001. Тяжесть симптомов широко варьирует, как и течение заболевания. СКВ может приводить к летальному исходу.

Пациента, больного СКВ, можно лечить с помощью биспецифического белка, который ингибирует ВАФФ и В7RP1, до, после и совместно с лечением с помощью существующей терапии для СКВ. Такие существующие препараты для лечения СКВ включают кортикостероиды, такие как преднизон, преднизолон и метилпреднизолон, противомаларийные средства, такие как гидроксихлорохин, квинакрин и хлорохин, ретиноевая кислота, аспирин и другие нестероидные противовоспалительные средства (НПВС), циклофосфамид, дегидроэпиандростерон, мофетила микофенолят, азатиоприн, хлорамбуцил, метотрексат, такролимус, дапсон, талидомид, лефлуномид, циклоспорин, белимумаб, антитела к CD20, такие как ритуксимаб, и слитые белки, такие как абатацепт.

Активность заболевания у пациентов, больных СКВ, можно рассчитать с помощью индекса активности системной красной волчанки (SLEDAI), который представляет собой показатель активности заболевания, что учитывает следующие симптомы, которые взвешиваются в соответствии с тяжестью заболевания: эпилептические припадки, психоз, органический мозговой синдром, нарушение зрения, расстройство черепно-мозговых нервов, головная боль, вызванная системной красной волчанкой, васкулит, артрит, миозит, цилиндры в моче, гематурия, протеинурия, пиурия, новая сыпь, алопеция, язвы слизистой оболочки, плеврит, перикардит, низкое содержание комплемента, повышенное связывания ДНК, лихорадка, тромбоцитопения и лейкопения. Bombardier et al. (1992), *Arthr. & Rheum.* 35(6): 630-640, соответствующие фрагменты которого включены в настоящий документ посредством ссылки. Виды лечения, описанные в настоящем документе, могут быть пригодными к использованию для ослабления или устранения симптомов СКВ, которые определяют по SLEDAI. Способы лечения, описанные в настоящем документе, могут способствовать улучшению показателя SLEDAI для пациента по сравнению с исходным значением, характерным для того же пациента до начала лечения с помощью биспецифического белка, который описан в настоящем документе.

Другим способом оценки активности заболевания при СКВ является индекс Британской группы по изучению системной красной волчанки (BILAG), который представляет собой систему оценки активности заболевания для пациентов, больных СКВ, исходя из намерений врача для проведения лечения. Stoll et al. (1996), *Ann. Rheum. Dis.* 55: 756-760; Hay et al. (1993), *Q.J. Med.J. Med.* 86: 447-458. Фрагменты этих литературных источников, в которых описан BILAG, включены в настоящий документ посредством ссылки. Показатель BILAG определяют путем присваивания отдельных числовых или буквенных баллов для определения активности заболевания в каждой из восьми систем органов, включая общие (как, например, лихорадка и утомляемость), кожно-слизистые (как, например, сыпь и алопеция помимо многих других симптомов), неврологические (как, например, эпилептические припадки, мигренозные головные боли и психоз помимо многих других симптомов) скелетно-мышечные (как, например, артрит), кардиореспираторные (как, например, сердечная недостаточность и ослабленная функция легких) васкулит и тромбоз, почечные (как, например, нефрит) и гематологические проявления. Id. Виды лечения, описанные в настоящем документе, могут быть пригодными к использованию для ослабления или устранения

симптомов СКВ, которые определяют по индексу BILAG, или для уменьшения показателя BILAG, полученного для пациента, по сравнению с исходным значением, характерным для того же пациента до начала лечения с помощью биспецифического белка, который описан в настоящем документе.

Биспецифический белок, который описан в настоящем документе, который ингибирует BAFF-опосредованную пролиферацию В-клеток человека и B7RP1-опосредованную пролиферацию Т-клеток человека, также может быть использован для лечения ревматоидного артрита (РА). РА представляет собой хроническое заболевание с системными проявлениями, а также проявлениями, ассоциированными конкретно с суставами. Проявления обычно включают синовит, приводящий к боли в суставах и припухлости суставов, и различные отклонения лабораторных показателей от нормы, как, например, повышение выше нормы уровней ревматоидного фактора, антител к цитруллин-модифицированному белку (антитела к ССР) и С-реактивного белка (CRP) и повышение скорости оседания эритроцитов (СОЭ). Реже встречающиеся проявления включают различные внесуставные проявления, при которых поражены, например, сухожилия, связки, кровеносные сосуды, сердце и легкие. Активность заболевания часто можно определить по многим показателям. См., например, Anderson et al. (2012), *Arthritis care & Res.* 64 (5): 640-647, во фрагментах которых обсуждаются такие показатели, включены в настоящий документ посредством ссылки. Элементами таких оценочных индексов являются число болезненных суставов, число припухших суставов, функциональная оценка и различные данные лабораторных исследований, как, например, CRP, СОЭ и т.д.

В некоторых вариантах реализации изобретения пациента, страдающего от РА, можно лечить с помощью биспецифического белка, который ингибирует BAFF-опосредованную пролиферацию В-клеток и B7RP1-опосредованную пролиферацию Т-клеток, до, после и совместно с лечением с помощью существующих лекарственных веществ, которые применяются в настоящее время для лечения РА. Терапевтические средства, которые применяются в настоящее время для лечения ревматоидного артрита (РА), включают в числе прочих нестероидные противовоспалительные средства (НПВС) (такие как, аспирин, ингибиторы циклооксигеназы-2 (COX-2)), болезнь-модифицирующие антиревматические препараты (БМАРП, такие как метотрексат, лефлуномид и сульфасалазин), противомалярийные средства (такие как гидроксихлорохин), циклофосфамид, D-пеницилламин, азатиоприн, соли золота, ингибиторы фактора некроза опухоли (такие как этанерцепт, инфликсимаб, адалимумаб, голимумаб и цертолизумаб пегол), ингибиторы CD20, такие как ритуксимаб, антагонисты ИЛ-1, такие как анакинра, ингибиторы ИЛ-6, такие как тоцилизумаб, ингибиторы Янус-киназы (JAK, такие как тофацитиниб), абацацепт и кортикостероиды.

Терапевтически эффективное количество биспецифического белка, который описан в настоящем документе, который ингибирует BAFF-опосредованную пролиферацию В-клеток человека и B7RP1-опосредованную пролиферацию Т-клеток человека, также может быть использовано для лечения воспалительного заболевания кишечника, как, например, болезни Крона или язвенного колита. Болезнь Крона характеризуется хроническим воспалением любого участка пищеварительного тракта от ротовой полости до анального отверстия, хотя у большинства пациентов такое воспаление ограничено илеоцекальной областью, областью тонкой кишки и областью ободочной и прямой кишок. Обычно воспаление - это прерывистый процесс. Общие симптомы включают боль в области живота, отсутствие аппетита и потерю массы тела, лихорадку, вздутие живота и/или болезненность в правой нижней части брюшной полости, запор, рвоту и перианальный дискомфорт и выделения. Другие возможные проявления включают в числе прочих периферический артрит, задержку роста, эписклерит, афтозный стоматит, узловатую эритему, гангренозную приодермию, камни в почках, нарушения процессов разведения мочи и подщелачивание мочи, малабсорбцию и камни в желчном пузыре. См., например, Strober et al., *Medical Immunology*, 10<sup>th</sup> Edition, Section III, Ch. 35 (2001); Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 17<sup>th</sup> Edition, Section 3, Ch. 31 (1999). Макрофаги, выделенные из крови пациентов с болезнью Крона, продуцируют повышенное количество ИЛ-12, ИФН- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$  и других провоспалительных цитокинов.

Несмотря на то что язвенный колит иногда сложно отличить от болезни Крона, он отличается от болезни Крона в нескольких отношениях. Во-первых, он, в целом, ограничивается толстой кишкой, тогда как болезнь Крона может поражать весь пищеварительный тракт. Во-вторых, язвенный колит, в основном, характеризуется только воспалением поверхностных слоев кишечника, в отличие от болезни Крона, при которой воспаление может воспалительный процесс может поражать все слои стенки кишечника или другой участок пищеварительного тракта. И, наконец, язвенный колит обычно характеризуется сплошной областью воспаления, а не прерывистыми очагами воспаления, характерными для болезни Крона. Подобно болезни Крона язвенный колит главным образом встречается в городской местности. Кроме того, очевидно, что в развитии язвенного колита некоторую роль играют генетические факторы, поскольку существует семейное накопление случаев заболевания. Наличие аутоантител наблюдается чаще у пациентов с язвенным колитом, чем у пациентов с болезнью Крона. Аутоантитела часто направлены против компонентов эпителиальных клеток ободочной кишки. Наиболее распространенными являются антитела к цитоплазме нейтрофилов, обладающие специфичностью к каталазе,  $\alpha$ -енолазе и лактоферрину. В некоторых случаях такие антитела перекрестно реагируют с белками микроорганизмов ободочной кишки.

В клинических испытаниях активность болезни Крона часто оценивают с использованием индекса

активности болезни Крона (СDAI). СDAI представляет собой показатель активности заболевания, учитывающий восемь факторов, включая (1) частоту жидкого или кашицеобразного стула в день, (2) оценку пациентом частоты приступов боли в животе в день, (3) оценку пациентом общего самочувствия, (4) сообщения пациента о других проявлениях, включая артрит, ирит, увеит, узловатую эритему, гангренозную приодермию, афтозный стоматит, анальную трещину, свищ или абсцесс, другой свищ или лихорадку, (5) сообщения пациента о приеме ломотила или других опиатов от поноса, (6) абдоминальную массу, (7) гематокритное число и (8) массу тела. См., например, Best et al. (1976), *Gastroenterol.* 70: 439-444, соответствующие фрагменты которого включены в настоящий документ посредством ссылки.

Симптомы язвенного колита многообразны. К ним могут относиться бледность, тошнота, рвота, диарея, боль в животе, головная боль, головокружение, боль в глазах, ухудшение зрения, сужение или расширение зрачков, слезоотделение, слюноотделение, потливость и спутанность сознания. Токсический мегаколон, потенциально состояние, опасное для жизни, при котором толстая кишка расширена на около 6 см и может потерять мышечный тонус и/или также может произойти перфорация. Другие симптомы, которые могут сопровождать язвенный колит, включают периферийный артрит, анкилозирующий спондилит, сакроилеит, передний увеит, узловатую эритему, гангренозную приодермию, эписклерит, аутоиммунный гепатит, первичный склерозирующий холангит, цирроз и замедленный рост и развитие у детей.

В некоторых вариантах реализации пациента, страдающего от воспалительного заболевания кишечника (ВЗК), как, например, болезнь Крона или язвенный колит, можно лечить с помощью биспецифического белка, который связывается с ВАFF и В7RP1, до, после и совместно с лечением с помощью существующей терапии для ВЗК. Существующие терапевтические средства для ВЗК включают, например, сульфасалазин, 5-аминосалициловую кислоту и ее производные (такие как олсалазин, балсалазид и месаламин), антитела к ФНО (включая инфликсимаб, адалимумаб, голимумаб, цертолизумаб пегол), кортикостероиды для перорального или парентерального применения (включая преднизон, метилпреднизон, будесонид или гидрокортизон), адренкортикотропный гормон, антибиотики (включая метронидазол, ципрофлоксацин или рифаксимин), азатиоприн, 6-меркаптопурин, метотрексат, циклоспорин, такролимус и талидомид.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие биспецифические белки.

В настоящем изобретении предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие биспецифический белок, который может ингибировать В7RP1-опосредованную пролиферацию Т-клеток и ВАFF-опосредованную пролиферацию В-клеток. Например, SEQ ID NO: 52 кодирует VL-участок, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и SEQ ID NO: 53 кодирует VH-участок, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15. Аналогичным образом SEQ ID NO: 55 и 56 кодируют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 17 и 18, соответственно, которые представляют собой полипептиды, содержащие тяжелую цепь антитела к В7RP1, слитую с двумя ВАFF-связывающими пептидами. SEQ ID NO: 57 кодирует легкую цепь антитела к В7RP1, которое может входить в состав гетеротетрамерного биспецифического антитела IgG или биспецифического слитого белка, которые описаны выше. Предусмотрены любая аминокислотная последовательность, кодирующая любую аминокислотную последовательность, предложенную в настоящем документе. Аналогичным образом варианты нуклеотидных последовательностей, включающие молчащие мутации, по сравнению с последовательностями, раскрытыми в настоящем документе, или кодирующие варианты аминокислотных последовательностей, описанные выше, также включены в объем настоящего изобретения. Более конкретно, предусмотрены нуклеотидные последовательности, кодирующие аминокислотные последовательности, которые отличаются не более чем на 10 вставок, делеций или замещений одной аминокислоты на 100 аминокислот от аминокислотных последовательностей, раскрытых в настоящем документе.

Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие биспецифические белки, раскрытые в настоящем документе, сможет определить специалист в данной области техники на основании аминокислотных последовательностей, предложенных в настоящем документе, и знаний, доступных в данной области техники. Помимо более традиционных способов получения сегментов клонированной ДНК, кодирующей конкретную аминокислотную последовательность, компании, такие как DNA 2.0 (Менло-Парк, Калифорния, США) и BlueHeron (Ботелл, Вашингтон, США) в числе прочих в настоящее время регулярно производят полученные путем химического синтеза ДНК, имеющие размер гена, любой желаемой последовательности под заказ, следовательно, оптимизируя процесс производства таких ДНК. Частоту использования кодона можно подобрать таким образом, чтобы оптимизировать экспрессию в предпочтительной системе.

Способы получения биспецифических белков, которые связываются с ВАFF и В7RP1.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие биспецифические белки, описанные в настоящем документе, могут быть встроены в векторы, подходящие для клетки-хозяина, в которой нуклеиновая кислота будет экспрессирована. Эти нуклеиновые кислоты могут быть введены в клетки-хозяева с помощью любых способов, хорошо известных в данной области техники. Клетки-хозяева, которые можно использовать, включают бактерии, включая *Escherichia coli*, дрожжи, включая *Saccharomyces cerevisia* или *Pichia pastoris*, клетки насекомых, включая клетки *Spodoptera frugiperda*, растительные клетки и клетки млекопитающих, включая, среди прочего, клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки почки новорожден-

ного хомячка (ВНК), клетки почек обезьян, HeLa клетки, клетки гепатоклеточной карциномы человека и клетки 293. Эти клетки-хозяева можно культивировать в условиях, которые обеспечивают экспрессию введенных нуклеиновых кислот, и биспецифический белок можно выделить из культурального супернатанта или клеточной массы.

Как правило, выбор метода, который используют для введения нуклеиновых кислот в клетки-хозяева, может зависеть от клетки-хозяина, в которую необходимо ввести нуклеиновые кислоты. Способы введения нуклеиновых кислот в клетки бактерий хорошо известны в данной области техники. Например, широко используется электропорация или трансформация с помощью обработки хлоридом кальция. Способы введения нуклеиновых кислот в клетки дрожжей также хорошо известны в данной области техники и включают, например, способы трансформации с использованием ацетата лития и полиэтиленгликоля. Способы введения гетерологичных полинуклеотидов в клетки млекопитающих хорошо известны в данной области техники и включают без ограничений декстран-опосредованную трансфекцию, осаждение фосфатом кальция, полибрен-опосредованную трансфекцию, слияние протопластов, электропорацию, инкапсуляцию полинуклеотида (полинуклеотидов) в липосомы и непосредственную микроинъекцию ДНК в ядра.

Экспрессирующие векторы, используемые в любых клетках-хозяевах, могут содержать последовательности, необходимые для репликации ДНК, селекции клеток-хозяев, содержащих вектор, и экспрессии экзогенных нуклеотидных последовательностей. Такие последовательности обычно могут включать одну или более из следующих нуклеотидных последовательностей: промотор, одну или более последовательностей энхансера, точку начала репликации, последовательность для терминации транскрипции, полную последовательность интрона, содержащую донорные и акцепторные сайты сплайсинга, последовательность, кодирующую лидерную последовательность для секреции полипептидов, сайт связывания рибосом, последовательность для полиаденилирования, полилинкерный участок для встраивания нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, который необходимо экспрессировать, и селективируемый маркерный элемент. В данной области техники известны и коммерчески доступны многочисленные экспрессирующие векторы для экспрессии в различных клетках-хозяевах.

Фармацевтические композиции, дозировка и способы введения.

В настоящем изобретении предложены фармацевтические композиции, содержащие биспецифические белки, описанные в настоящем документе. Такие композиции могут содержать терапевтически эффективное количество биспецифического белка с одним или более дополнительными компонентами, такими как физиологически приемлемый носитель, вспомогательное вещество или разбавитель. Примеры используемых наполнителей также включают консерванты, буферные растворы и прочие регуляторы уровня pH, регуляторы тоничности, поверхностно-активные вещества, антиоксиданты, а также хелатирующие агенты. Многие из таких дополнительных компонентов описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>th</sup> Edition, (A.R. Gennaro, ed.), 1990, Mack Publishing Company, соответствующие фрагменты которого включены в настоящий документ посредством ссылки.

Дозировку описанных в настоящем документе биспецифических белков можно подобрать с целью достижения желательного эффекта. Во многих случаях потребуется введение повторной дозы из-за хронической природы заболевания, по поводу которого проводится лечение. Например, описанный в настоящем документе биспецифический белок можно вводить два раза в неделю, один раз в неделю, один раз в две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять недель или один раз каждые два, три, четыре, пять или шесть месяцев. Количество биспецифического белка для введения каждые сутки может составлять от около 0,0036 мг до около 700 мг. В альтернативном варианте дозировку можно подобрать в соответствии с установленной площадью кожи пациента, и количество каждой дозировки может составлять от около 0,002 мг/м<sup>2</sup> до около 350 мг/м<sup>2</sup>. В другом альтернативном варианте дозировку можно подобрать в соответствии с массой тела пациента, и количество каждой дозировки может составлять от 0,000051 мг/кг до около 10,0 мг/кг.

Биспецифические белки или фармацевтические композиции, содержащие эти молекулы, можно вводить любым подходящим способом. Терапевтические средства, которые содержат белок, обычно вводят парентеральным путем, например с помощью инъекции, поскольку пероральный прием в отсутствие некоторых специальных лекарственных форм или условий будут приводить к гидролизу белка в кислой среде желудка. Возможными путями введения являются подкожная, внутримышечная, внутривенная, внутриартериальная, внутриочаговая и внутрибрюшинная болюсные инъекции. Биспецифические белки также могут вводиться посредством инфузии, например внутривенной или подкожной инфузии. Также можно использовать местное применение в случае заболеваний, поражающих кожу. В альтернативном варианте биспецифические белки могут приниматься через контакт со слизистой оболочкой, например путем интраназального, сублингвального или ректального применения или применения в качестве средства для ингаляции. В альтернативном варианте определенные соответствующие фармацевтические композиции, содержащие биспецифический белок, могут приниматься перорально.

После общего описания изобретения, приведенного выше, следующие ниже примеры приведены с целью иллюстрации и не предназначены для ограничения изобретения.

### Примеры

Пример 1. Конструирование и испытание биспецифической молекулы BAFF/B7RP1 для терапевтического использования при лечении людей.

Целью этой серии экспериментов было выявление биспецифической молекулы, которая (1) ингибирует BAFF-опосредованную пролиферацию В-клеток и B7RP1-опосредованную пролиферацию Т-клеток, (2) является высокоактивной в биологических анализах и (3) обладает удовлетворительными биофизическими свойствами. На фиг. 1 проиллюстрирован целый ряд схематических изображений для слияния пептида, который связывает BAFF человека с антителом IgG к B7RP1 человека (антитело к huB7RP1). Последовательность BAFF-связывающего пептида приведена в SEQ ID NO: 1, и последовательности тяжелой и легкой цепей антитела к huB7RP1 приведены в SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 19 соответственно.

Для определения того, какая структура обладает наилучшими биофизическими свойствами с сохранением биологической активности, были получены и исследованы биспецифические молекулы, проиллюстрированные на фиг. 1. В одной конструкции две tandemные копии BAFF-связывающего пептида с промежуточным линкером ("линкер 1К", имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24) были слиты с N-концом либо тяжелой цепи иммуноглобулина (P71617), либо легкой цепи (P71618) антитела к huB7RP1. См. фиг. 1. Аминокислотная последовательность тяжелой цепи P71617 приведена в SEQ ID NO: 26, и аминокислотная последовательность легкой цепи P71617 является такой же, как и аминокислотная последовательность легкой цепи антитела к huB7RP1 (SEQ ID NO: 19). Аминокислотная последовательность легкой цепи P71618 приведена в SEQ ID NO: 27, и аминокислотная последовательность тяжелой цепи P71618 является такой же, как и аминокислотная последовательность легкой цепи антитела к huB7RP1 (SEQ ID NO: 25). Две tandemные копии BAFF-связывающего пептида также были слиты с C-концом тяжелой цепи антитела к huB7RP1 (имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25) с использованием либо указанного выше линкера 1К (имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24; P71619), либо линкера 5X(G4S) (SEQ ID NO: 71) между двумя BAFF-связывающими пептидами (P71620). Аминокислотные последовательности тяжелых цепей этих двух слитых конструкций приведены в SEQ ID NO: 16 (P71619) и SEQ ID NO: 28 (P71620). В конструкции P71621 две tandemные копии BAFF-связывающего пептида с промежуточным линкером 1К были встроены в CH3-домен антитела между остатками 358 и 359 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25 (аминокислотная последовательность тяжелой цепи антитела к huB7RP1). Последовательность тяжелой цепи конструкции P71621 приведена в SEQ ID NO: 29. В конструкции P71622 BAFF-связывающий пептид был встроен в CH3-домен тяжелой цепи антитела к huB7RP1 (между остатками 358 и 359 SEQ ID NO: 25, и вторая копия BAFF-связывающего пептида была слита с C-концом тяжелой цепи. Аминокислотная последовательность тяжелой цепи P71622 приведена в SEQ ID NO: 30. В конструкции P71623 один BAFF-связывающий пептид был встроен в CH2-участок (между остатками 268 и 269 SEQ ID NO: 25), и второй BAFF-связывающий пептид был встроен в CH3-участок (между остатками 358 и 359 SEQ ID NO: 25). SEQ ID NO: 31 представляет собой аминокислотную последовательность тяжелой цепи P71623. Все конструкции P71619-P71623 имеют легкую цепь антитела к huB7RP1 (SEQ ID NO: 19).

В конструкциях P74293 и P74294 был модифицирован линкер между двумя tandemными копиями BAFF-связывающего пептида в конструкции P71619. Аминокислотные последовательности тяжелых цепей P74293 и P74294 приведены в SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18, соответственно. Легкие цепи этих конструкций также имеют аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие описанные выше конструкции, были получены следующим образом. Нуклеиновые кислоты, кодирующие N-концевой участок продуктов N-концевого слияния BAFF-пептида (P71617 и P71618), включая две копии BAFF-связывающего пептида в дополнение к варибельному домену тяжелой или легкой цепи иммуноглобулина, были получены синтетически. Они были лигированы через подходящие сайты эндонуклеаз рестрикции с нуклеиновыми кислотами, кодирующими константный домен тяжелой или легкой цепей, в соответствующие векторы. Все нуклеиновые кислоты, кодирующие продукты C-концевого слияния константного домена тяжелой цепи (P71619 и P71620), и вставки Fc-петли (P71621 и P71623), и вставку Fc-петли/продукт C-концевого слияния (P71622), были получены синтетически и лигированы в вектор, содержащий варибельный домен тяжелой цепи через подходящие сайты эндонуклеаз рестрикции.

Описанные выше различные биспецифические конструкции были экспрессированы и во временно трансфицированных клетках 293, и в стабильно трансфицированных клетках CHO. Слитые белки были выделены и исследованы на биологическую активность. Не наблюдалось никаких различий в экспрессии белков, полученных в этих двух разных видах клеток-хозяев.

Ингибирующее действие биспецифических молекул на BAFF было исследовано в анализе BAFF-опосредованной пролиферации человеческих В-клеток первичной культуры. Вкратце, В-клетки человека были выделены из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) с использованием набора II для негативной селекции В-клеток человека от Miltenyi Biotec (Оберн, Калифорния). Около  $10^5$  выделенных В-клеток культивировали в 96-луночных микротитрационных планшетах в минимальной питательной среде (MEM), дополненной 10% термоинактивированной фетальной бычьей сыворотки (ФБС) в присутствии 50 нг/мл BAFF-белка человека, 2 мкг/мл F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента козьего антитела к IgM человека

(Jackson ImmunoResearch) и различных концентраций одного из описанных выше биспецифических белков при 37°C в 5% CO<sup>2</sup> в течение 48 ч. Пептидное антитело к BAFF было использовано в качестве положительного контроля ("αBAFF", который представляет собой гомодимер, содержащий две полипептидные цепи, причем каждая цепь содержит два BAFF-связывающих пептида, слитых с Fc-полипептидом). Молекула αBAFF подробно описана в патенте США 7259137, и аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи этого гомодимера приведена в SEQ ID NO: 32. Фрагменты патента США 7259137, в котором описан αBAFF, включены в настоящий документ посредством ссылки. Скорость пролиферации определяли по включению радиоактивного <sup>3</sup>H-тимидина на протяжении последних 18 часов инкубации. Результаты проиллюстрированы на фиг. 2А и 2В.

Данные, приведенные на фиг. 2А, свидетельствуют о том, что две конструкции, слитые на С-конце (P71619 и P71620), были сопоставимыми друг с другом в отношении ингибирования BAFF-опосредованной пролиферации В-клеток и более эффективными, чем все другие слитые конструкции, исследованные в этом эксперименте. В дальнейшем конструкцию P71620 не использовали, поскольку она имела тенденцию к агрегации, а это свойство является очень нежелательным для терапевтического белка. Данные, приведенные на фиг. 2В, свидетельствуют о том, что P71619 сопоставима с двумя описанными выше незначительно модифицированными вариантами этой конструкции (P74293 и P74294) и с положительным контролем (αBAFF) в отношении ингибирования BAFF-опосредованной пролиферации В-клеток. Следовательно, среди исследованных биспецифических конструкций P71619, P71620, P74293 и P74294 обладали сопоставимой активностью в этом анализе BAFF-опосредованной пролиферации В-клеток и более высокой активностью, чем все другие исследованные конструкции.

Ингибирующее действие P71619, P74293 и P74294 на B7RP1 было исследовано с использованием анализа B7RP1-Fc-опосредованной пролиферации Т-клеток человека. Первичную культуру Т-клеток человека выделяли из МКПК здоровых доноров с использованием набора для выделения Т-клеток (Pan T cell isolation kit) от Miltenyi Biotec (Оберн, Калифорния) и стимулировали с использованием связанного с подложкой антитела к CD3 (1 мкг/мл) и слитого белка B7RP1-F (3 мкг/мл) в присутствии различных концентраций описанных выше биспецифических белков или антитела IgG2 к B7RP1 человека (называемого в настоящем документе "αB7RP1"). Через 48 ч к клеткам добавляли <sup>3</sup>H-тимидин, и включение <sup>3</sup>H-тимидина определяли через 24 ч. Все биспецифические антитела, которые были исследованы, имели сходные IC<sub>50</sub>, которые были сходны с IC<sub>50</sub> для αB7RP1 (фиг. 3). Следовательно, эти данные указывают на то, что конъюгация BAFF-связывающих пептидов с антителом huB7RP1 оказывает незначительное влияние на способность данного антитела ингибировать активность B7RP1 или не оказывает никакого влияния.

Аффинность связывания гетеродимерных биспецифических антител P74293 и P74294 с BAFF и B7RP1 определяли с использованием анализа кинетического исключения (KinExA®; Sapidyne Instruments, Бойсе, Айдахо). Оба антитела характеризуются высокой аффинностью связывания с BAFF человека (имея K<sub>d</sub> около 30 пМ) и с B7RP1 человека (имея K<sub>d</sub> около 40 пМ). См. ниже табл. 2. В дополнение к этому обе эти биспецифические молекулы характеризуются сходной аффинностью связывания с BAFF яванского макака по сравнению с BAFF человека и с B7RP1 яванского макака по сравнению с B7RP1 человека (табл. 2).

Таблица 2. Аффинность связывания и активность в отношении клеток P74293 и P74294

	<b>P74293</b>	<b>P74294</b>
K <sub>d</sub> (пМ) для связывания с BAFF человека	29	37
K <sub>d</sub> (пМ) для связывания с BAFF яванского макака	22,3	17,4
IC <sub>50</sub> (нМ) для ингибирования BAFF-опосредованной пролиферации В-клеток яванского макака	0,86	0,96
IC <sub>50</sub> (нМ) для ингибирования BAFF-опосредованной пролиферации В-клеток яванского макака	1,6	1,8
K <sub>d</sub> (пМ) для связывания с B7RP1 человека	38	41
K <sub>d</sub> (пМ) для связывания с B7RP1 яванского макака	49,4	45,2
IC <sub>50</sub> (нМ) для ингибирования B7RP1-опосредованной пролиферации Т-клеток человека	1,36	0,98
IC <sub>50</sub> (нМ) для ингибирования B7RP1-опосредованной пролиферации Т-клеток яванского макака	0,29	Н/О*

\*Н/О означает "не определяли".

Для дальнейшей оценки активности P74293 в системе *in vitro* с использованием клеток человека оценивали продукцию цитокинов клетками миндалин человека, активированными энтеротоксином В Staphylococcus (SEB), в присутствии различных исследуемых молекул. Вкратце, клетки миндалин человека выделяли из ткани и стимулировали SEB (1 мкг/мл) в присутствии одной из следующих молекул: (1)  $\alpha$ B7RP1, (2) P74293, (3) CTLA4-Ig (положительный контроль) или (4) IgG человека (отрицательный контроль). Через 72 ч культивирования собирали клеточный супернатант и оценивали уровни цитокинов с использованием наборов от Meso Scale Discovery согласно инструкции производителя. Результаты проиллюстрированы на фиг. 4.

Все три молекулы  $\alpha$ B7RP1, P74293 и CTLA4-Ig, столбцы 1, 2 и 3 соответственно, на всех панелях фиг. 4, ингибировали высвобождение ИЛ-17, ИЛ-10, ИЛ-4 и ИФН $\gamma$ . Высвобождение ИЛ-2 ингибировал только CTLA4-Ig. Следовательно,  $\alpha$ B7RP1 и биспецифический P74293 к BAFF/B7RP1 оказывали сопоставимое и специфическое воздействие на секрецию цитокинов SEB-активированными клетками миндалин человека.

Были исследованы дополнительные свойства трех гетеродимерных биспецифических белков, т.е. P71619, P74293 и P74294. Титры белков, выделенных из культур клеток-хозяев, продуцирующих эти белки, свидетельствовали о том, что уровни продукции P74293 и P74294 были приблизительно в два раза выше уровней продукции P71619. P74293 и P74294 также были более стабильными, чем P71619 после хранения в течение двух недель при 40°C, что было оценено с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC). P74293 формировал прозрачный раствор на начальном этапе хранения и через 4 недели хранения, тогда как растворы, содержащие P74394, были мутными на всех этапах хранения. Растворы P74293 и P74294 были менее вязкими, чем растворы P71619. Следовательно, P74293 и P74294 характеризовались более высокими уровнями экспрессии, чем P71619, а также большей стабильностью и меньшей вязкостью в диапазоне исследованных концентраций, чем P71619. Наиболее очевидное различие между этими молекулами заключается в наличии линкера между двумя BAFF-связывающими пептидами. Эти данные указывают на то, что линкеры, присутствующие в P74293 и P74294 (SEQ ID NO: 6 и 7), могут улучшать свойства этих молекул.

Фармакокинетические свойства описанных биспецифических молекул были изучены на мышах. Самцам мышей линии CD-1 внутривенно (IV) вводили однократную дозу (5 мг/кг) биспецифических слитых белков P71617, P71619, P71621, P71622, P74293 или P74294. Образцы сыворотки крови собирали перед введением и через 0,5, 2, 8, 24, 48, 72, 96, 168, 240, 336, 408, 504 ч после введения. Концентрацию биспецифической молекулы в сыворотке крови определяли с помощью двух методов ИФА, один из них позволяет обнаружить Fc-участок, а другой - Fc-участок, и участок BAFF-связывающего пептида. Для определения Fc-участка в качестве улавливающего реагента было использовано биотинилированное антитело к Fc-участку, а в качестве детектирующего реагента было использовано меченное ALEXA FLUOR® 647 антитело к Fc-участку. Для обнаружения участка BAFF-связывающего пептида и Fc-участка биспецифической молекулы в качестве улавливающего реагента был использован биотинилированный BAFF-белок, а в качестве детектирующего реагента было использовано меченное ALEXA FLUOR® 647 антитело к Fc-участку. Биспецифические белки с двумя tandemными копиями BAFF-связывающих пептидов, слитых с N-концом (P71617), C-концом (P71619, P74293 и P74294) или CH3-доменом (P71621) тяжелой цепи, характеризуются очень похожими фармакокинетическими профилями (PK) у мышей (фиг. 5). Биспецифический белок с одной копией BAFF-связывающего пептида, встроенной в CH3-домен, и другой копией, слитой с C-концом тяжелой цепи (P71622), оказывал менее выраженное влияние по сравнению с другим биспецифическими белками (фиг. 5). В дополнение к этому, с помощью двух разных ИФА-анализов были установлены сходные концентрации биспецифических белков в сыворотке крови, что указывает на то, что расщепление биспецифических белков *in vivo* было незначительным.

Также были оценены фармакокинетические и фармакодинамические параметры гетеродимерных биспецифических антител P74293 и P74294 в исследовании однократного введения на яванских макаках. Интактным самцам яванского макака (n=4) внутривенно или подкожно вводили однократную дозу P74293 (10 мг/кг) или подкожно вводили однократную дозу P74294 (10 мг/кг). Фармакокинетические профили обеих биспецифических молекул были сходны с такими профилями антитела IgG. Наблюдаемые фармакокинетические параметры для P74293 и P74294, а также для антитела к huB7RP1 представлены ниже в табл. 3.

Таблица 3. Фармакокинетические параметры у яванского макака

	P74293		P74294	Антитело к huB7RP1	
	10 мг/кг, IV	10 мг/кг, SC	10 мг/кг, SC	10 мг/кг, IV	10 мг/кг, SC
Максимальная концентрация лекарственного вещества ( $C_{max}$ ; мкг/мл)	323	90	74	264	112
Время, когда достигается $C_{max}$ ( $T_{max}$ ; часы)		45	51		72
Площадь под кривой ( $AUC_{0-inf}$ ; мкг*час/мл)	33800	20300	22000	26100	23800
Среднее время удержания ( $MRT_{0-inf}$ ; час)	136	132	148	138	144
Общий клиренс (ОК; мл/ч/кг)	0,303	0,491	0,484	0,383	0,427
Объем распределения в равновесном состоянии ( $V_{ss}$ ; мл/кг)	42,5			52,1	

Данные, приведенные в табл. 3, свидетельствуют о том, что фармакокинетические параметры P74293 и P75294 сопоставимы друг с другом и с параметрами антитела к huB7RP1.

Пример 2. Конструирование и испытание мышинной биспецифической гомологичной молекулы.

Для проведения доклинических исследований на мышах были сконструированы мышинные биспецифические гомологичные молекулы, которые могут связываться с мышинным B7RP1 и мышинным BAFF (в дальнейшем "мышинная гомологичная молекула"). Антитело к huB7RP1, использованное для конструирования биспецифических конструкций, описанных в примере 1, не связывается с B7RP1 мыши, тогда как BAFF-связывающий пептид, использованный в этих конструкциях, все-таки связывается с BAFF и человека, и мыши. Данные не показаны. Мышинная гомологичная молекула включает антагонистическое антитело IgG к B7RP1 мыши (называемое в настоящем документе "антителом к mB7RP1", которое представляет собой химерную молекулу, состоящую из константных доменов иммуноглобулина мыши и переменных доменов иммуноглобулина крысы к B7RP1 мыши. Применение антитела к mB7RP1 описано в следующем источнике Hu et al. (2009), J. Immunol. 182:1421, в котором оно обозначено 1B7-V2. Мышинная гомологичная молекула имеет две копии BAFF-связывающего пептида (SEQ ID NO: 1), слитые через короткий линкер (длиной пять аминокислот) с С-концом тяжелой цепи иммуноглобулина к mB7RP1. Две копии BAFF-связывающего пептида разделены другим линкером, длина которого составляет 23 аминокислоты. Нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелую цепь мышинной гомологичной молекулы, были получены с использованием ПЦР с перекрывающимися праймерами для соединения нуклеиновых кислот, кодирующих BAFF-связывающий участок  $\alpha$ BAFF с 5'-концом нуклеиновых кислот, кодирующих тяжелую цепь 1B7-V2, т.е. антитело к mB7RP1.

Ингибирование BAFF с использованием мышинной гомологичной молекулы оценивали в анализе BAFF-опосредованной пролиферации В-клеток. В-лимфоциты мыши выделяли из селезенок мышей линии C57BL/6 путем негативной селекции с использованием микрогранул MACS CD43 (ly-48) согласно инструкциям производителя (Miltenyi Biotec, Оберн, Калифорния) или из МКПК с использованием набора для выделения В-клеток (Miltenyi Biotec, Оберн, Калифорния). Выделенные В-клетки стимулировали с использованием 0,1 мкг/мл антитела к IgM и 200 нг/мл BAFF в присутствии различных концентраций гомологичной молекулы или  $\alpha$ BAFF. Пролиферацию В-клеток определяли по включению  $^3$ H-тимидина на 4-е сутки.  $IC_{50}$  мышинной гомологичной молекулы и  $\alpha$ BAFF составляла 0,59 и 0,73 нМ соответственно. См. фиг. 6А. Следовательно, мышинная гомологичная молекула эффективно ингибировала BAFF с активностью, сопоставимой с активностью  $\alpha$ BAFF.

Для определения степени ингибирования мышинной гомологичной молекулой связывания B7RP1 с рецептором клетки селезенки мыши вначале активировали для повышения экспрессии рецептора B7RP1 путем инкубации их в лунках микротитрационного планшета, покрытых антителом к CD3 (5 мкг/мл) в

течение 24 ч. Активированные клетки селезенки промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) и затем инкубировали с 5 мкг/мл биотинилированного mB7RP1:Fc в присутствии различных концентраций мышинной гомологичной молекулы при 4°C в течение 30 мин. Клетки промывали и затем окрашивали конъюгированным с аллофикоцианином (APC) антителом к CD3 мыши и стрептавидино-фикоэритрином (стрептавидин-ФЭ) еще в течение 20 мин. Связывание B7RP1-FC с Т-клетками анализировали с помощью проточной цитометрии. IC<sub>50</sub> мышинной гомологичной молекулы и антитела к mB7RP1 составляла 4,01 пМ и 2,8 пМ соответственно. См. фиг. 6В. Таким образом, в этом анализе активность мышинной гомологичной молекулы была сходна с активностью антитела к mB7RP1. Следовательно, мышинная гомологичная молекула ингибирует и BAFF, и B7RP1.

Фармакодинамические эффекты мышинной гомологичной молекулы *in vivo* оценивали на мышах, иммунизированных эритроцитами барана (ЭБ). Вкратце, проводили первичную иммунизацию мышей линии (в возрасте 8 недель) на 0-е сутки и бустер-иммунизацию на 28-е сутки с использованием  $2 \times 10^8$  ЭБ в 0,2 мл PBS путем внутрибрюшинной инъекции. Мыши (n=5 для каждой молекулы) получали два раза в неделю с 0-х суток по 33-и сутки одну из следующих молекул в концентрации 5 мг/кг: мышинная гомологичная молекула; αBAFF; антитело к mB7RP1; или IgG1 мыши. Мыши, получавшие ЭБ, но не получавшие других веществ, служили в качестве положительных контролей. Мышей умерщвляли на 34-е сутки и выделяли селезенки.

Для измерения соотношения В-клеток и Т-клеток памяти в селезенке клетки селезенки выделяли путем измельчения ткани селезенки через клеточные фильтры. Клетки селезенки предварительно инкубировали с немеченым антителом к CD16/32 для блокирования неспецифического связывания антител с Fc-гамма рецепторами (FcγR). Долю В-клеток определяли по окрашиванию меченым ФЭ антителом к B220 (который экспрессирован на В-клетках). Долю Т-клеток памяти (CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>lo</sup>CD4 Т-клеток) определяли по окрашиванию конъюгированным с FITC антителом к CD44, конъюгированным с ФЭ антителом к CD62L, конъюгированным с APC антителом к CD4 и конъюгированным с PerCP антителом к CD3. Все антитела для окрашивания были приобретены в BD Bioscience (Сан-Диего, Калифорния). Для определения количества В- и Т-клеток проводили проточную цитометрию с использованием проточного цитометра FACSCALIBUR™ (BD Bioscience, Сан-Хосе, Калифорния), и данные анализировали с использованием программного обеспечения FLOWJO® (TreeStar Inc., Ашленд, Орегон) для анализа данных проточной цитометрии. Результаты проиллюстрированы на фиг. 7.

Для измерения уровней антител к ЭБ в сыворотке крови микротитрационные планшеты, покрытые 10 мкг/мл растворимого антигена ЭБ, инкубировали в течение двух часов при комнатной температуре с разбавленной сывороткой крови мышей, подвергавшихся воздействию. Уровень связавшегося Ig, специфического по отношению к ЭБ, определяли в сыворотке крови с использованием конъюгированных с пероксидазой хрена (HRP) поликлональных козьих антител к IgG и IgM мыши (Southern Biotech, Бирмингем, Алабама). Реакцию с субстратом проводили с использованием субстрата пероксидазы SURE-BLUE™ TMB (KPL, Гейтерсберг, Мэриленд) согласно инструкции производителя, и оптическую плотность измеряли с использованием планшетного спектрофотометра Spectrum Max (Molecular Devices). В качестве положительного контроля в каждый планшет добавляли образцы после серийного разведения смеси сывороток мышей, иммунизированных ЭБ, в отсутствие какого-нибудь воздействия, и составляли стандартную кривую на основе данных оптической плотности для этих лунок. Уровни антител к ЭБ других образцов представлены на фиг. 7 в виде процентного содержания от положительного контроля.

Процентное содержание клеток селезенки, которые представляли собой В-клетки, было сниженным у мышей, получавших мышиную гомологичную молекулу, по сравнению с процентным содержанием, наблюдаемым у мышей, получавших IgG1 мыши. Фиг. 7 (верхняя панель). Аналогичное уменьшение наблюдалось у мышей, получавших αBAFF или αBAFF и антитело к mB7RP1, но не у мышей, получавших только антитело к mB7RP1. Фиг. 7 (верхняя панель). Что касается Т-клеток памяти, у мышей, получавших мышиную гомологичную молекулу, антитело к mB7RP1 или антитело к mB7RP1 и αBAFF, количественное соотношение Т-клеток памяти по сравнению с количественным соотношением, наблюдаемым у мышей, получавших muIgG1, было сниженным. Фиг. 7 (средняя панель). В отличие от этого воздействие αBAFF не влияло на популяцию Т-клеток памяти в селезенке по сравнению с воздействием, наблюдаемым для muIgG. Фиг. 7 (средняя панель). Мышинная гомологичная молекула также обеспечивала значительное уменьшение уровня антител к ЭБ в сыворотке крови аналогично уменьшению, наблюдаемому при воздействии антитела к mB7RP1 или антитела к mB7RP1 и αBAFF, или у мышей, которым не вводили ЭБ. Фиг. 7 (нижняя панель). У мышей, получавших только αBAFF, наблюдалось умеренное снижение уровня антител к ЭБ по сравнению с уровнем, наблюдаемым при воздействии muIgG1. Фиг. 7 (нижняя панель). Эти данные свидетельствуют о том, что мышинная гомологичная молекула оказывает двойное ингибирующее воздействие на В-клеточный и Т-клеточный компартменты у мышей *in vivo*.

Влияние мышинной гомологичной молекулы на активность заболевания оценивали в модели волчанки на мышах линии NZB/W F<sub>1</sub> с использованием разных объемов доз для каждой исследуемой молекулы. Самкам мышей линии NZB/W F<sub>1</sub> (в возрасте 4,5 месяца, n=20) два раза в неделю путем внутрибрюшинной инъекции в течение 18 недель вводили вещества с использованием каждого из следующих

режимов дозирования: 5 или 15 мг/кг мышинной гомологичной молекулы ( $MW \approx 160$  кДа); 4,68 или 14 мг/кг антитела к mB7RP1 ( $MW \approx 150$  кДа); 1,88 или 5,6 мг/кг  $\alpha$ BAFF ( $MW \approx 64$  кДа); комбинация  $\alpha$ BAFF (1,88 или 5,6 мг/кг) и антитела к mB7RP1 (4,68 или 14 мг/кг); IgG1 мыши (15 мг/кг; изотипический контроль); или фосфатно-буферный раствор (PBS) (отрицательный контроль). Протеинурию определяли в моче с использованием ALBUSTIX® (Bayer, Элхарт, Индиана) каждые две недели, начиная с возраста 5 месяцев. Частоту случаев возникновения протеинурии выражали в виде процентного соотношения мышей с белком в моче в концентрации по меньшей мере 300 мг/дл с использованием двух последовательных измерений. Уровень антител к дцДНК измеряли с помощью ИФА. Балльную оценку заболевания почек проводили путем исследования образцов ткани почек на наличие восьми разных видов повреждений, а именно разрастание капилляров сосудистых клубочков, гиперплазия мезангиальных клеток, накопление мезангиального матрикса, гиперплазия париетальных эпителиальных клеток, интерстициальный нефрит, дилатация канальцев/белковые цилиндры и атрофия канальцев/интерстициальный фиброз. Каждому типу повреждения был присвоен показатель тяжести заболевания от 0 до 5 с максимально возможным показателем 32. Показатели для каждой группы мышей усредняли. Проводили мониторинг выживаемости.

В возрасте 12 месяцев ни у одной из мышей, получавших мышиную гомологичную молекулу в любой дозировке, не развивалась протеинурия. В отличие от этого у 100% мышей, получавших IgG1 или PBS в обеих исследованных дозировках, была отмечена протеинурия. Фиг. 8А и 9В. У около 60 и 35%, мышей, получавших антитело к mB7RP1 и  $\alpha$ BAFF в меньшей дозировке, соответственно, и у около 50 и 25% мышей, получавших антитело к mB7RP1 и  $\alpha$ BAFF соответственно, в большей дозировке развивалась протеинурия. Фиг. 8А и 9В. В дополнение к этому воздействие мышинной гомологичной молекулы в обеих дозировках приводило к уменьшению уровней IgG к дцДНК в сыворотке крови по сравнению с отрицательным контролем при воздействии mIgG1. Фиг. 8В и 9А. При воздействии биспецифической молекулы выживаемость животных значительно повышалась по сравнению с контрольными группами животных, получавших mIgG и PBS. Данные не показаны. Однако никакой явной разницы в выживаемости не наблюдалось после воздействия биспецифической молекулы по сравнению с воздействием одной молекулы на момент завершения эксперимента.

Почки всех мышей, получавших исследуемые вещества, включая мышей, умерших перед завершением исследования, выделяли для гистологической балльной оценки тяжести заболевания почек. Группы мышей, получавших  $\alpha$ BAFF, комбинацию  $\alpha$ BAFF и антитело к mB7RP1 или мышиную гомологичную молекулу, характеризовались более низкими показателями тяжести заболевания почек по сравнению с контрольной группой, получавшей mIgG1. Фиг. 10. У групп, получавших мышиную биспецифическую гомологичную молекулу или комбинацию, была отмечена тенденция к уменьшению патологических изменений почек по сравнению с группами, получавшими одно вещество, причем данный результат явно коррелирует с описанными выше результатами по протеинурии. Можно сопоставить фиг. 10 с фиг. 8А и 9В. Таким образом двойное ингибирование BAFF и B7RP1 при воздействии мышинной гомологичной молекулы или комбинации  $\alpha$ BAFF и антитела к mB7RP1 было более эффективным, чем ингибирование при воздействии только BAFF ( $\alpha$ BAFF) или только B7RP1 (антитело к mB7RP1) в отношении предотвращения начала и развития заболевания в модели волчанки на мышах линии NZB/W F<sub>1</sub>.

Для определения того, может ли ингибирование и BAFF, и B7RP1 эффективно подавлять симптомы коллаген-индуцированного артрита у мышей, проводили следующий эксперимент. Самцов мышей DBA иммунизировали 100 мкг бычьего коллагена II типа, эмульгированного в 2× полном адьюванте Фрейнда (CFA) на 0-е сутки повторно иммунизировали бычьим коллагеном II типа в неполном адьюванте Фрейнда (IFA) на 21-е сутки. Мыши получали одно из исследуемых веществ два раза в неделю на протяжении исследования продолжительностью 41 недели, начиная с 0-х суток. Через каждый интервал времени для каждой группы оценивали количество мышей в процентах в каждой группе, у которых проявлялись симптомы артрита, и средний показатель степени тяжести артрита. Показатели степени тяжести артрита определяли путем обследования каждой конечности и путем определения балла от 0 до 3 для каждой конечности, причем более высокие баллы были использованы для более припухших и/или более воспаленных конечностей. Таким образом, максимальный общий показатель степени тяжести артрита был равен 12. Считалось, что мышь имела артрит, если у нее был показатель степени тяжести артрита по меньшей мере 1 для любой конечности.

Результаты проиллюстрированы на фиг. 11. Эти данные свидетельствуют о том, что эффективность комбинации  $\alpha$ BAFF и антитела к mB7RP1 (закрашенные круги, соединенные жирными линиями) была более высокой в отношении подавления симптомов артрита, чем  $\alpha$ BAFF (незакрашенные круги, соединенные жирными линиями) или только антитела к mB7RP1 (закрашенные круги, соединенные пунктирными линиями). Группы отрицательного контроля, получавшие mIgG (закрашенные квадраты, соединенные жирными линиями) или PBS (закрашенные квадраты, соединенные пунктирными линиями), характеризовались самой высокой частотой случаев возникновения артрита и наиболее высокими показателями степени тяжести артрита. Эти результаты указывают на то, что ингибирование и BAFF, и B7RP1 в отличие от ингибирования только одного из этих путей могло бы быть эффективным методом лечения

аутоиммунного и/или воспалительного заболевания артритной природы, как, например, ревматоидный артрит (РА).

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Биспецифический белок, содержащий антитела IgG, определяющий комплементарность участок 1 (CDR1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, определяющий комплементарность участок 2 (CDR2) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, определяющий комплементарность участок 3 (CDR3) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, антитела IgG CDR1 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, отличающийся тем, что указанный белок может ингибировать BAFF-опосредованную пролиферацию В-клеток человека и при этом указанный белок может ингибировать B7RP1-опосредованную пролиферацию Т-клеток человека.

2. Биспецифический белок по п.1, отличающийся тем, что антитело IgG содержит две тяжелые цепи иммуноглобулина, имеющие разные аминокислотные последовательности, и две легкие цепи иммуноглобулина, имеющие разные аминокислотные последовательности.

3. Биспецифический белок по п.2, отличающийся тем, что антитело IgG представляет собой антитело IgG1.

4. Биспецифический белок по п.2, отличающийся тем, что антитело IgG представляет собой антитело IgG2.

5. Биспецифический белок по п.2, отличающийся тем, что антитело IgG представляет собой антитело IgG4.

6. Биспецифический белок по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что указанный биспецифический белок представляет собой человеческое или гуманизированное антитело IgG.

7. Биспецифический белок, содержащий антитело IgG, который содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 15, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 14, отличающийся тем, что указанный белок может ингибировать BAFF-опосредованную пролиферацию В-клеток человека и при этом указанный белок может ингибировать B7RP1-опосредованную пролиферацию Т-клеток человека.

8. Биспецифический белок, содержащий:

(а) полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую следующую формулу: A-L1-P-L2-P, где А представляет собой тяжелую цепь антитела IgG, содержащую CDR1 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, CDR2 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и CDR3 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, L1 представляет собой первый линкер, длина которого составляет от 3 до 40 аминокислот, P представляет собой BAFF-связывающий пептид, имеющий SEQ ID NO: 1, 2 или 3, длина которого составляет от 10 до 40 аминокислот, и L2 представляет собой пептидный линкер, длина которого составляет от 5 до 50 аминокислот; и

(б) легкую цепь иммуноглобулина, содержащую CDR1 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, CDR2 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и CDR3 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

9. Биспецифический белок по п.8, отличающийся тем, что тяжелая цепь иммуноглобулина (а) и легкая цепь иммуноглобулина (б) формируют антитело IgG, содержащее две молекулы полипептида (а) и две молекулы легкой цепи (б), которое может связываться с B7RP1.

10. Биспецифический белок по п.8 или 9, отличающийся тем, что в тяжелой цепи иммуноглобулина отсутствует лизин на С-конце сразу перед L1.

11. Биспецифический белок по любому из пп.8-10, отличающийся тем, что антитело IgG представляет собой человеческое или гуманизированное антитело IgG1 к B7RP1.

12. Биспецифический белок по любому из пп.8-10, отличающийся тем, что антитело к B7RP1 представляет собой человеческое или гуманизированное антитело IgG2.

13. Биспецифический белок по любому из пп.8-10, отличающийся тем, что антитело к B7RP1 представляет собой человеческое или гуманизированное антитело IgG4.

14. Биспецифический белок по любому из пп.8-13, отличающийся тем, что P имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 (LPGCKWDLLIKQWVCDPL).

15. Биспецифический белок по любому из пп.8-14, отличающийся тем, что L1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40 (GGGGG).

16. Биспецифический белок по любому из пп.8-15, отличающийся тем, что L2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5.

17. Биспецифический белок по п.16, отличающийся тем, что L2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

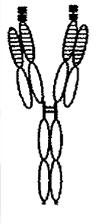
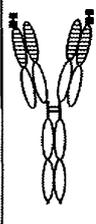
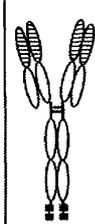
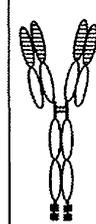
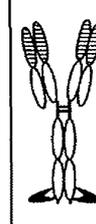
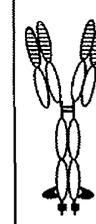
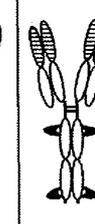
18. Биспецифический белок по п.16, отличающийся тем, что L2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.
19. Биспецифический белок по любому из пп.8-18, содержащий переменный домен легкой цепи иммуноглобулина, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.
20. Биспецифический белок по любому из пп.8-19, содержащий переменный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15.
21. Биспецифический белок по любому из пп.14-20, отличающийся тем, что легкая цепь иммуноглобулина (б) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.
22. Биспецифический белок по любому из пп.14-21, отличающийся тем, что полипептид (а) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17 или 18.
23. Биспецифический белок, содержащий: (а) полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 18, и (б) полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, отличающийся тем, что указанный белок может ингибировать BAFF-опосредованную пролиферацию В-клеток человека и при этом указанный белок может ингибировать B7RP1-опосредованную пролиферацию Т-клеток человека.
24. Биспецифический белок по п.23, который представляет собой тетрамер, содержащий две молекулы полипептида (а) и две молекулы полипептида (б).
25. Биспецифический белок по п.23 или 24, отличающийся тем, что полипептид (а) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.
26. Биспецифический белок по п.23 или 24, отличающийся тем, что полипептид (б) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.
27. Белок, содержащий линкер, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7, отличающийся тем, что указанный белок может ингибировать BAFF-опосредованную пролиферацию В-клеток человека и при этом указанный белок может ингибировать B7RP1-опосредованную пролиферацию Т-клеток человека.
28. Белок по п.27, который содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 14 и/или SEQ ID NO: 15.
29. Фармацевтическая композиция, содержащая биспецифический белок по любому из пп.1-26 или белок по п.27 или 28, и физиологически приемлемое вспомогательное вещество, пригодная для ингибирования BAFF-опосредованной пролиферации В-клеток человека и B7RP1-опосредованной пролиферации Т-клеток человека.
30. Нуклеиновая кислота, кодирующая биспецифический белок по любому из пп.1-26 или белок по п.27 или 28.
31. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.30.
32. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п.30 и/или вектор по п.31.
33. Способ получения биспецифического белка, включающий культивирование клетки-хозяина по п.32 в таких условиях, которые обеспечивают экспрессию нуклеиновой кислоты, и выделение белка из клеточной массы или культуральной среды.
34. Способ по п.33, отличающийся тем, что клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего.
35. Способ по п.34, отличающийся тем, что клетка-хозяин представляет собой клетку CHO.
36. Способ по п.33, отличающийся тем, что клетка-хозяин представляет собой клетку *Escherichia coli*.
37. Способ лечения системной красной волчанки, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества биспецифического белка по любому из пп.1-26, белка по п.27 или 28 или фармацевтической композиции по п.29.
38. Способ по п.37, отличающийся тем, что пациенту дополнительно вводят другое терапевтическое средство до, после или одновременно с биспецифическим белком и причем другое терапевтическое средство представляет собой кортикостероид, противомаларийное средство, ретиноевую кислоту, НПВС, циклофосфамид, дегидроэпиандростерон, мофетила микофенолят, азатиоприн, хлорамбуцил, метотрексат, такролимус, дапсон, талидомид, лефлуномид или циклоспорин.
39. Способ по п.38, отличающийся тем, что другое терапевтическое средство представляет собой мофетила микофенолят, кортикостероид, противомаларийное средство, метотрексат или азатиоприн.
40. Способ лечения, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества биспецифического белка по любому из пп.1-26, белка по п.27 или 28 или фармацевтической композиции по п.29, причем пациент имеет заболевание, выбранное из группы, состоящей из АНЦА-положительного васкулита, ревматоидного артрита (РА), болезни Крона, язвенного колита, целиакии, пузырчатки, пемфигоида, подострой кожной красной волчанки (ПККВ), рассеянного склероза, хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии (ХВДП), миастении гравис, синдрома Гудпасчера, гломерулонефрита, аутоиммунной гемолитической анемии (АИГА), идиопатической тромбоцитопенической пурпуры (ИТП), хронического активного гепатита, первичного билиарного цирроза печени, синдрома Шег-

рена, системного склероза, тиреоидита Хашимото, болезни Грейвса, болезни Аддисона и множественной эндокринной неоплазии (МЭН).

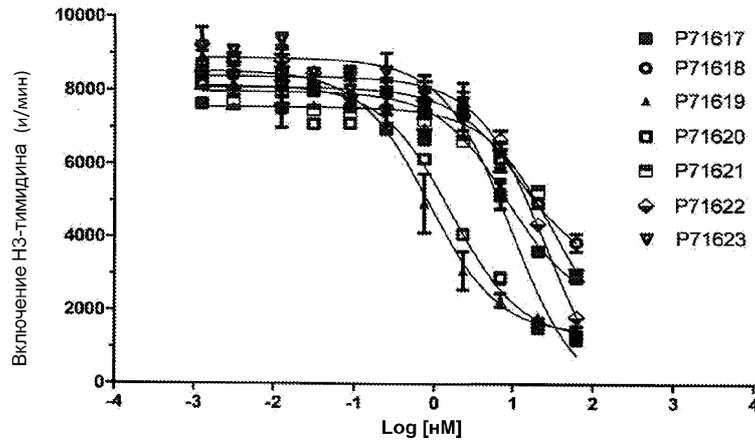
41. Применение биспецифического белка по любому из пп.1-26 или белка по п.27 или 28 в качестве лекарственного вещества, пригодного для ингибирования BAFF-опосредованной пролиферации В-клеток человека и В7RP1-опосредованной пролиферации Т-клеток человека.

42. Фармацевтическая композиция, пригодная для лечения системной красной волчанки, содержащая биспецифический белок по любому из пп.1-26 или белок по п.27 или 28.

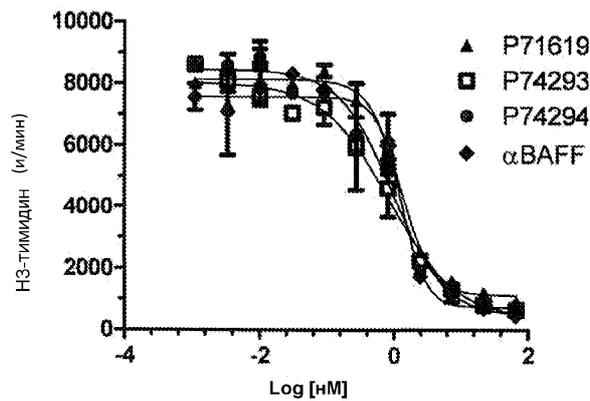
43. Фармацевтическая композиция, пригодная для лечения волчаночного нефрита, содержащая биспецифический белок по любому из пп.1-26 или белок по п.27 или 28.

Название конструкции	P71917	P71618	P71619	P71620	P71621	P71622	P71523
Характеристика конструкции	N-слияние-НС	N-слияние-LC	C-слияние-1K	C-слияние - G4S	2×Fc-петля	1×Fc-петля 1×C-слияние	1×CH2 1×CH3
Структура конструкции							

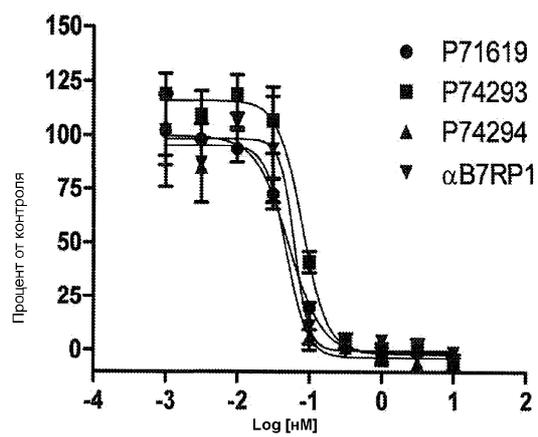
Фиг. 1



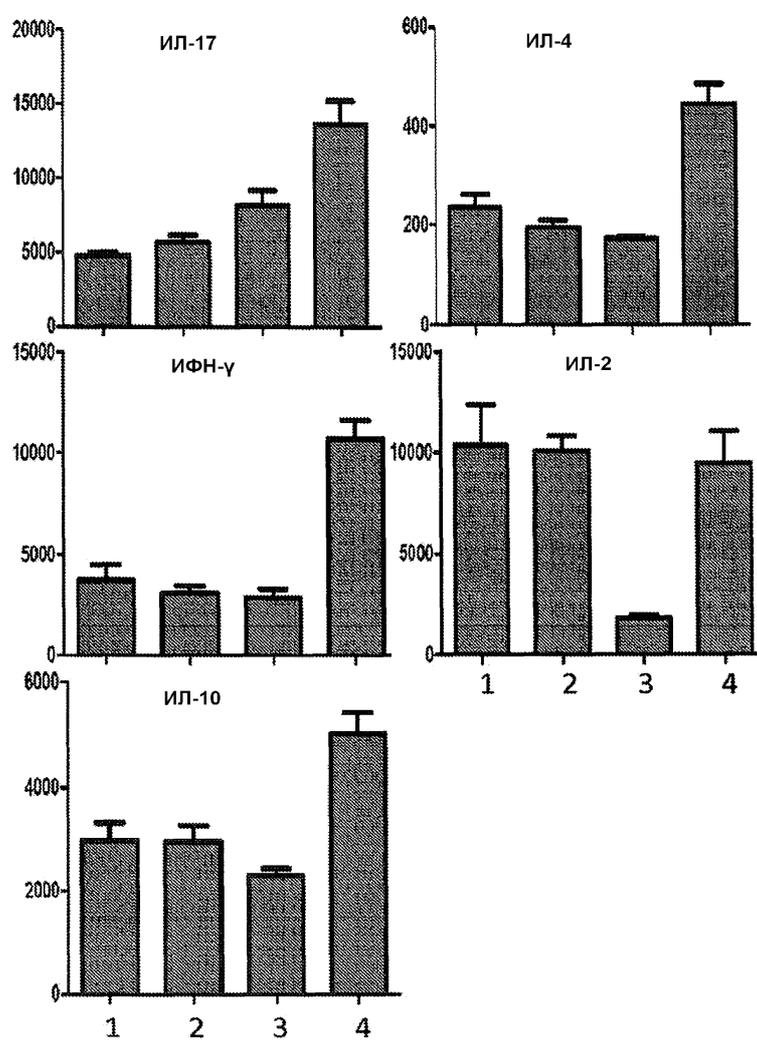
Фиг. 2А



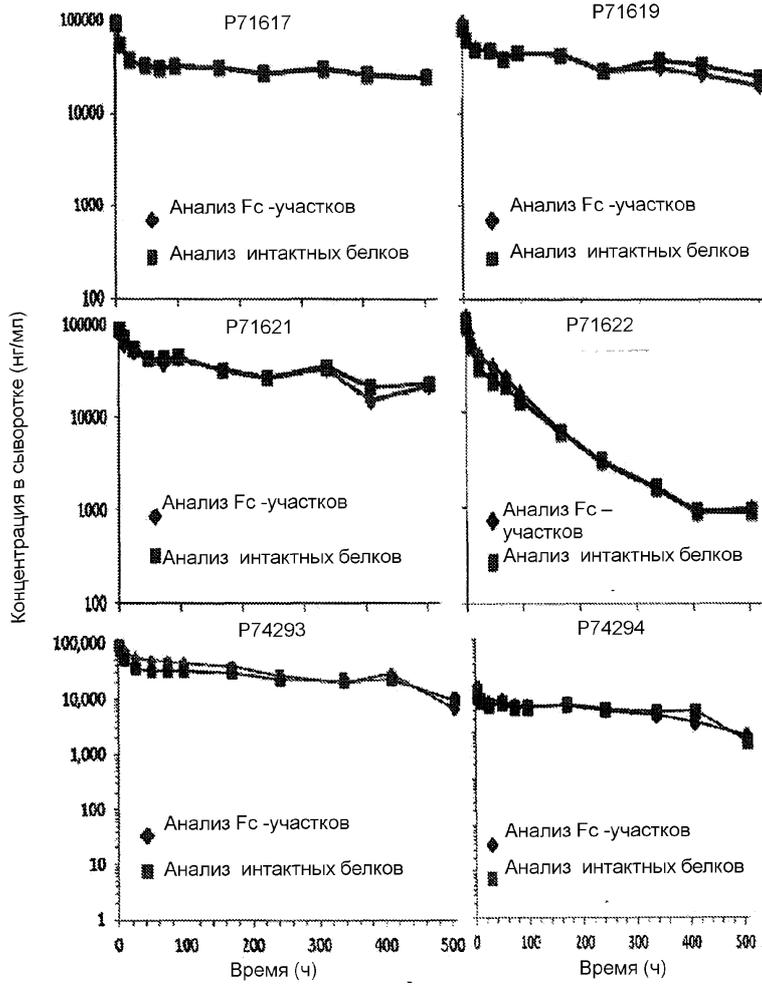
Фиг. 2В



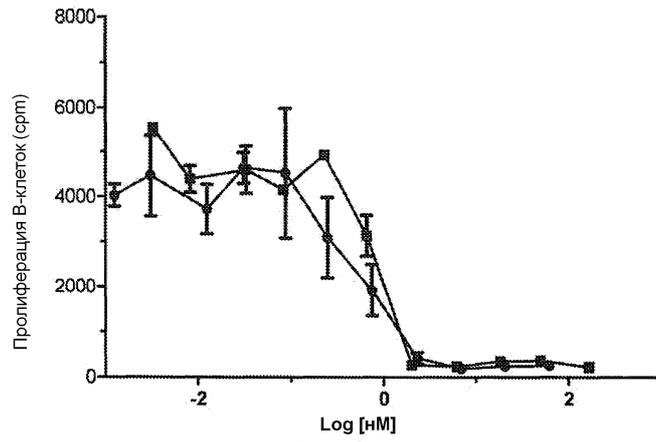
Фиг. 3



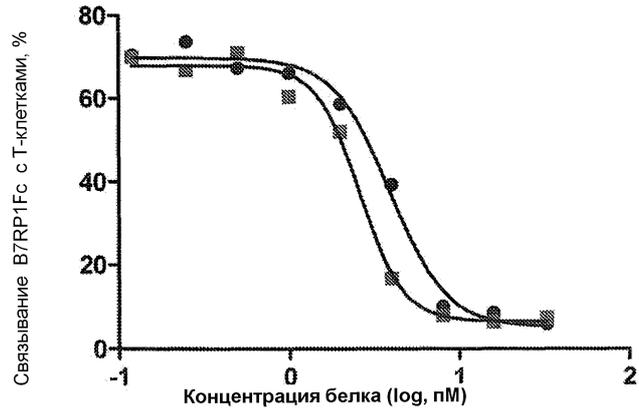
Фиг. 4



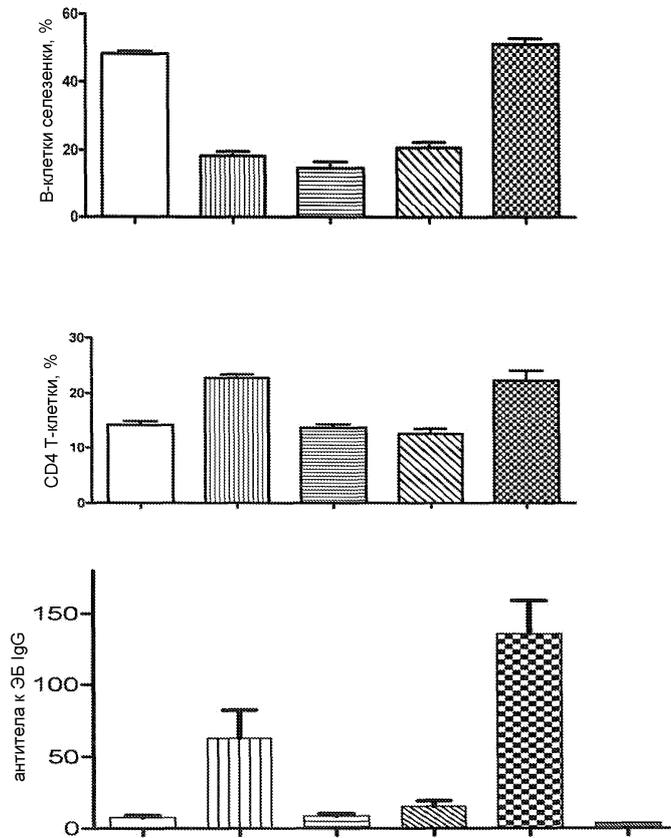
Фиг. 5



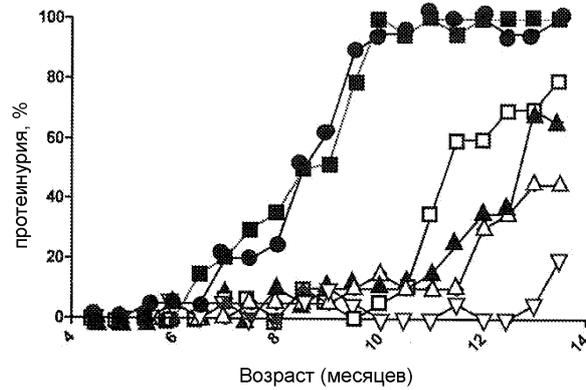
Фиг. 6А



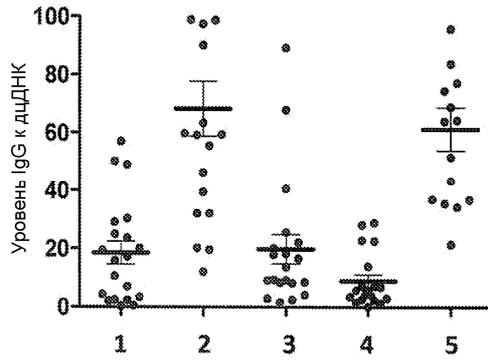
Фиг. 6В



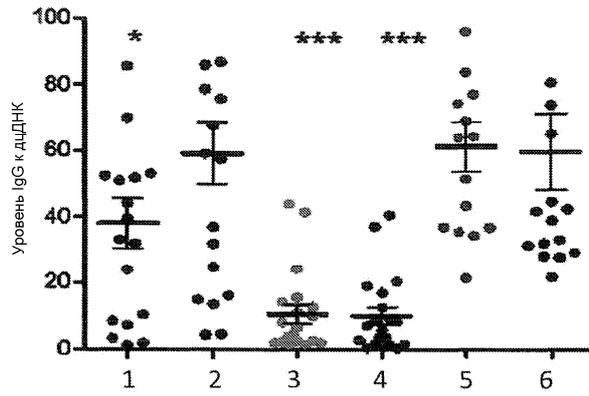
Фиг. 7



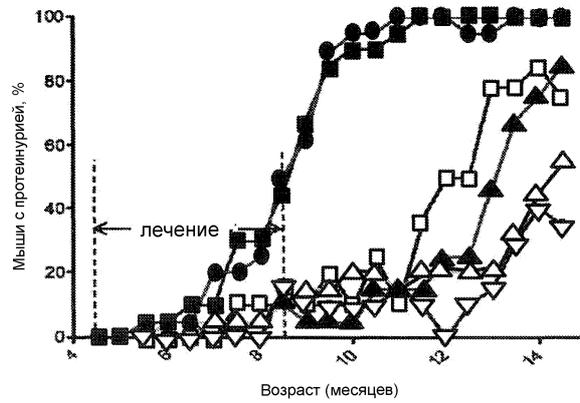
Фиг. 8А



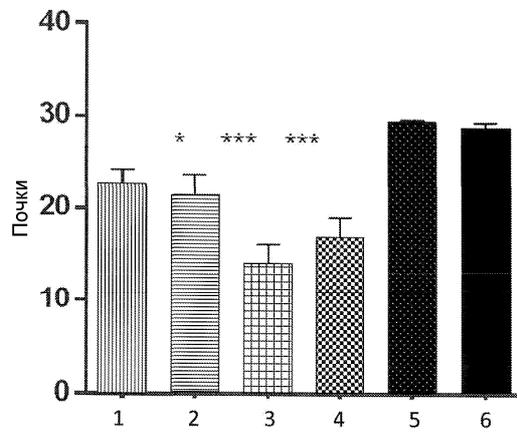
Фиг. 8В



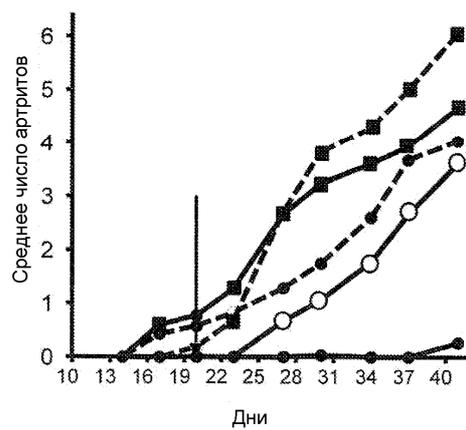
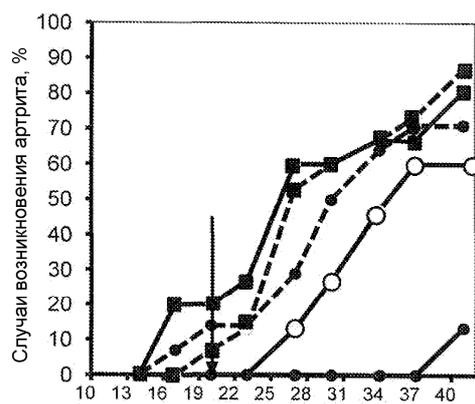
Фиг. 9А



Фиг. 9В



Фиг. 10



Фиг. 11