

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201992467** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.05.28

(22) Дата подачи заявки
2018.06.01

(51) Int. Cl. *C07K 16/00* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

(54) ГЕТЕРОДИМЕРИЗУЮЩИЕСЯ ДОМЕНЫ Ig

(31) 17174087.1

(32) 2017.06.01

(33) EP

(86) PCT/EP2018/064538

(87) WO 2018/220216 2018.12.06

(71) Заявитель:
УНИВЕРЗИТЕТ ШТУТГАРТ (DE)

(72) Изобретатель:
**Рихтер Фабиан, Сейферт Оливер,
Контерман Роланд (DE)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) В соответствии с настоящим изобретением предложен белковый комплекс, содержащий гетеродимеризующиеся области HRI и HRII, каждая из которых состоит из антипараллельных β -цепей и промежуточных областей, причем каждая из HRI и HRII представляет собой перемежающийся слитый белок из двух человеческих константных областей иммуноглобулина или подобных иммуноглобулинам белков. В соответствии с настоящим изобретением также предложены молекулы нуклеиновых кислот, содержащие последовательность, кодирующую указанные белковые комплексы, и векторы, содержащие указанную нуклеиновую кислоту. В соответствии с настоящим изобретением также предложены указанный белковый комплекс, указанная нуклеиновая кислота и указанный вектор для применения в качестве лекарственного средства. Согласно настоящему изобретению дополнительно предложен способ определения последовательности аминокислот HRI и/или последовательности аминокислот HRII. В соответствии с настоящим изобретением также предложен способ получения цепей аминокислот HRI и/или цепей аминокислот HRII. Согласно настоящему изобретению дополнительно предложен белковый комплекс для применения для профилактики, лечения или диагностики расстройства или заболевания.

201992467

A1

A1

201992467

ГЕТЕРОДИМЕРИЗУЮЩИЕСЯ ДОМЕНЫ Ig

В соответствии с настоящим изобретением предложен белковый комплекс, содержащий гетеродимеризующиеся области HRI и HRII, каждая из которых состоит из антипараллельных β -цепей и промежуточных областей, причем каждая из HRI и HRII представляет собой перемежающийся слитый белок из двух человеческих константных областей иммуноглобулина или подобных иммуноглобулинам белков. В соответствии с настоящим изобретением также предложены молекулы нуклеиновых кислот, содержащие последовательность, кодирующую указанные белковые комплексы, и векторы, содержащие указанную нуклеиновую кислоту. В соответствии с настоящим изобретением также предложены указанный белковый комплекс, указанная нуклеиновая кислота и указанный вектор для применения в качестве лекарственного средства. Согласно настоящему изобретению дополнительно предложен способ определения последовательности аминокислот HRI и/или последовательности аминокислот HRII. В соответствии с настоящим изобретением также предложен способ получения цепей аминокислот HRI и/или цепей аминокислот HRII. Согласно настоящему изобретению дополнительно предложен белковый комплекс для применения для профилактики, лечения или диагностики расстройства или заболевания.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Интерес к биспецифическим антителам для применения в диагностике и терапии все больше возрастает. Подробный обзор представлен в Kontermann RE и Brinkmann U (2015) Drug Discovery Today; 20(7): 883 и в цитируемых в нем источниках. Тогда как природные антитела являются моноспецифическими, биспецифические антитела распознают два различных эпитопа либо на одном и том же, либо на различных антигенах. Использование биспецифических антител охватывает широкий спектр применений в диагностике, визуализации и терапии. Изначально терапевтические применения в основном были ориентированы на перенацеливание эффекторных клеток для терапии рака, включая Т-клетки, которые обычные антитела не могут привлечь к опухолевым клеткам. Тем не менее, в течение последнего десятилетия разработали множество других терапевтических стратегий, основанных на биспецифических антителах, включая, помимо перенацеливания эффекторных молекул, клеток и генетических носителей, также стратегии двойного нацеливания, увеличения периода полувыведения и доставки через гематоэнцефалический

барьер. Показания включают рак, хронические воспалительные заболевания, аутоиммунитет, нарушения свертываемости крови и инфекции.

Биспецифические антитела с определенными специфичностями представляют собой искусственные молекулы, сами по себе не встречающиеся в природе. Следовательно, их нужно получать с помощью молекулярных или генетических средств. С получением биспецифических молекул IgG связано две основные проблемы вследствие того, что антигенсвязывающие области образованы переменными доменами легкой и тяжелой цепей (VL, VH). Во-первых, для биспецифического антитела необходимы две различные тяжелые цепи и во-вторых, для него также необходимы две различные легкие цепи. Следовательно, биспецифическим антителам IgG свойственна асимметрия благодаря присутствию по меньшей мере двух различных областей переменного домена (Fv). Неизбирательное спаривание тяжелых и легких цепей двух антител, экспрессированных в одной клетке, теоретически может привести к 10 различным комбинациям, при этом только одна будет биспецифической, а остальные спаривания приведут к образованию нефункциональных или моноспецифических молекул (Schaefer и др., 2016). Одной из задач при получении биспецифических антител будет направить и вынудить правильную сборку правильных сайтов связывания, т.е., тяжелых и легких цепей.

Генная инженерия для вынужденной гетеродимеризации тяжелых цепей, описанная в следующем разделе, нацелена на одну из проблем образования биспецифических IgG. Хотя гетеродимерные тяжелые цепи по-прежнему соединяются с двумя различными легкими цепями, приводя к четырем возможным комбинациям: одна биспецифическая молекула, одна нефункциональная комбинация и две моноспецифические молекулы, - это уменьшает количество возможных комбинаций из 10 различных молекул до 4 комбинаций. Спаривание тяжелых цепей опосредовано последним доменом константной области, т.е., CH3 в молекулах IgG, который образует высокоаффинные гомодимерные комплексы. Дополнительные взаимодействия находятся в шарнирной области, отвечающей за ковалентное связывание двух тяжелых цепей, которое образуется после сборки тяжелых цепей.

В различных стратегиях применяют либо стерические эффекты, либо электростатические наводящие эффекты, или их комбинации, для образования комплементарной контактирующей поверхности, способствующей гетеродимеризации вместо гомодимеризации.

Ridgway и коллеги получили контактирующую поверхность СНЗ, способствующую гетеродимерной сборке, путем замены на контактирующей поверхности одного СНЗ малых боковых цепей на большие с образованием выступа и замены на другом домене СНЗ больших боковых цепей на меньшие с образованием впадины (Ridgway и др., 1996). Тестирование различных вариантов продемонстрировало предпочтительную гетеродимеризацию для замены Т366У в одной цепи и У407Т на другой цепи. Данные первые мутации выступы-во-впадины, например, применяли для получения IgG, направленного против HER2 и IGF-1R. Подход выступы-во-впадины впоследствии расширили, идентифицируя дополнительные подходящие комбинации с помощью фагового дисплея. Данные мутации затем применяли для получения биспецифических антител IgG, чтобы проверить, позволяют ли дополнительные замены образовываться дисульфидной связи. Для одного варианта выявили образование > 95% гетеродимера (S354C, Т366W/У349C, Т366S, L368A, У407V). Данную гетеродимерную тяжелую цепь затем применяли для конструирования биспецифического антитела против Mlr и HER3 из одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), применяя идентичный домен VL, таким образом экспрессируя общую легкую цепь (Merchant и др., 1998). Гетеромерные тяжелые цепи образовывали функциональные биспецифические антитела, их можно было выделить с помощью хроматографии на основе белка А, и у них сохранялись опосредованные Fc эффекторные функции, такие как антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ). Данный подход внедрили для получения различных биспецифических антител, и, в настоящее время, он представляет собой универсальную основу для получения биспецифических молекул IgG и их производных, включая трехвалентные Ig-подобные антитела, и биспецифических слитых белков Fc и СНЗ.

Одним примером являются перенацеливающие Т-клетки биспецифические антитела. Для того чтобы избежать системной активации Т-клеток посредством бивалентного связывания с CD3, были разработаны молекулы, содержащие только один сайт связывания для CD3. Они включают scFv-Fc(kih) с одним scFv на каждой цепи Fc и tandem-scFv-Fc(kih) (BiTE-KIH) с tandemным scFv, слитым с одной из цепей Fc (Xu и др., 2015). В данном исследовании связывающая CD3 молекула была слита либо с содержащей выступ, либо с содержащей впадину Fc-цепью (KIH, KIH'), соответственно. Интересно, что BiTE-KIHг превосходила BiTE-KIH в отношении титров экспрессии. Тем не менее, не наблюдали различий в отношении активации Т-клеток и лизиса опухолевых клеток. В сходном подходе Fc-KIH применяли для получения бивалентных, биспецифических слитых белков scFv-Fc,

направленных против CD16 и HER2, для перенацеливания NK-клеток на опухолевые клетки (Xie и др., 2005).

Моновалентное связывание также может быть необходимо для антител, нацеленных на рецепторы на поверхности клетки, такие как c-MET, чтобы избежать перекрестного связывания и активации рецепторов. Биспецифические антитела, моновалентно связывающиеся с рецепторами на поверхности клетки, для применения для двойного нацеливания и нейтрализации двух различных рецепторов, получали путем слияния плеча Fab с N-концом содержащей впадину Fc-цепи и стабилизированного дисульфидом scFv с C-концом той же Fc-цепи, и коэкспрессии с неслитой содержащей выступ Fc.

Слияние домена VH с C-концом одной цепи Fc (kih) и домена VL, экспрессированного либо отдельно, либо слитым с C-концом другой, приводило к получению биспецифического трехвалентного слитого белка IgG-Fv (MAT-Fv), в котором фрагмент Fv был стабилизирован дисульфидной связью между доменами (Metz и др., 2012). Гибкость фрагмента Fv в слитом IgG-Fv можно повысить путем введения сайта протеолитического расщепления, например, для фурина или MMP, в линкер, соединяющий домен VL с Fc-цепью. После расщепления это привело к получению биспецифической молекулы с C-концевым фрагментом Fv, соединенным только через домен VH с IgG. Аналогично, получили слитый белок scFv-Fc-Fv, на котором экспонированы два сайта связывания для EGFR (scFv, слитый с N-концом Fc-цепи) и один для LPS (VH, слитый с C-концом Fc (выступ), и VL, слитый с C-концом Fc (впадина)). Дополнительные производные биспецифических IgG (kih) антител включают TriMAb. Здесь один или два стабилизированных дисульфидом scFv сливают с одной или обеими цепями Fc (kih) с получением триспецифических трехвалентных или четырехвалентных антител, соответственно. Это было показано для TriMAb, нацеленных на EGFR, IGF-1R и либо cMet, либо HER3. В данном подходе фрагмент Fab состоял из одноцепочечного фрагмента Fab со стабилизированными дисульфидом доменами Fv.

Недавно стратегию выступы-во-впадины расширили на другие изотипы IgG с получением гетеродимеров IgG4, которые сами по себе лишены опосредованных Fcγ эффекторных функций, например, для получения биспецифических антител, направленных против IL-4 и IL-13.

Применение подходов, основанных на структуре и последовательности, для исследования энергий комбинаций спаренных вариантов на контактирующей поверхности димера CH3 позволило получить вариант HA-TF (S364N, F405A/Y349T, 394F), у которого

выявили образование приблизительно 83% гетеродимера в контексте биспецифической молекулы MAT-Fv (IgG-Fv), разработанный для одновременного нацеливания на HER2 (бивалентное связывание) и CD3 (моновалентное связывание). Дополнительные примеры применения данного модуля гетеродимеризации CH3 включают моно- и бивалентные слитые белки scFv-Fc.

Другой рациональный основанный на структуре подход привел к выявлению набора мутаций, с которыми, как сообщалось, наблюдали высокую термостабильность и образование чистых гетеродимеров без детектируемых гомодимеров. Дизайн Fc (ZW1) включал замены T350V, L351Y, F405A и Y407V в первой Fc-цепи и замены T350V, T366L, K392L и T394W во второй Fc-цепи.

Хотя описанные выше стратегии преимущественно зависят от гидрофобных взаимодействий, в других подходах используют электростатические взаимодействия (наведение), чтобы избежать гомодимеризации доменов CH3 путем электростатического отталкивания и направить гетеродимеризацию путем электростатического притяжения. В доменах CH3 дикого типа обнаружили взаимодействия двух зарядов между K409 и D399 на контактирующей поверхности CH3-CH3. Обнаружили, что замена в одном домене CH3 K409 на аспарат и в другом домене CH3 D399 на лизин способствует образованию гетеродимеров CH3. Ввели дополнительные замены, например, K392D в одной цепи и E356K в другой цепи. Введение дополнительных пар зарядов нарушало продуктивность. Данный подход с применением двух замен пар зарядов (K409D, K392D/D399K, E356K; пары зарядов CH3) применяли для получения биспецифического слитого белка scFv-Fc, направленного против CD3 и TARTK, а позже для получения биспецифических IgG, направленных против EGFR и HER2 или склеростина и DKK-1. Он включал внедрение новых пар зарядов в плечи Fab для направления правильного спаривания легких цепей.

Электростатические наводящие эффекты также применяют в Biclomics - биспецифических антителах, в которых используют общую легкую цепь и гетеродимеризующиеся тяжелые цепи (Geuijen и др., 2014). Здесь остатки в одном CH3 (366, 366 + 351) заменили на положительно заряженный остаток лизина, а один или более остатков во втором CH3 (например, 349, 351, 355, 368) заменили на отрицательно заряженные остатки глутаминовой кислоты или аспарагиновой кислоты. Одно биспецифическое антитело, основанное на данной технологии (MCLA-128), направленное против HER2 и HER3, на сегодняшний день находится в фазе I/II клинических испытаний.

Предпочтительной гетеродимеризации тяжелых цепей также добились путем введения пары зарядов в шарнирную область IgG1 и IgG2. Для IgG1 данные замены в шарнирах включали D221E, P228E в первом шарнире и D221R и P228R во втором шарнире. Для IgG2 замены включали C223E и P228E в одной шарнирной области и C223R, E225R, P228R в другой шарнирной области. Здесь E225R приводит к электростатическому взаимодействию с встречающейся в природе глутаминовой кислотой в положении 225, следовательно, в первом шарнире IgG2 необходимы только две замены. Данные мутации комбинировали с L368E и K409R, соответственно, чтобы вынудить гетеродимерную сборку доменов CH3. Была показана применимость биспецифических антител IgG против EGFR x против HER2, а также антитела против CE x против CD20, при отдельной экспрессии двух антител и последующей сборке из полуантител.

В другом исследовании идентифицировали мутации, способствующие гетеродимерной сборке доменов CH3, путем сначала замены заряженных остатков около края сохраненной гидрофобной сердцевины (L351, T366, L368, Y407) на большие или меньшие гидрофобные аминокислоты, чтобы заменить симметричные электростатические взаимодействия на асимметричные гидрофобные, и, во-вторых, чтобы заменить аминокислоты, слабо участвующие во взаимодействии, на аминокислоты, несущие заряженные длинные боковые цепи, чтобы получить асимметричные электростатические взаимодействия на большом расстоянии. Это привело к конечной комбинации K360E, K409W в одном CH3 и Q347R, D399V, F405T в другом CH3 (EW-RVT). Функциональность была продемонстрирована для биспецифического гетеродимера scFv-Fc, нацеленного на VEGFR-2 и Met. Введение дисульфидной связи в домен CH3 (Y349C в первом домене и S354C во втором домене) повышало образование гетеродимера и термодинамическую стабильность. Более того, используя воспроизведенные на поверхности дрожжей комбинаторные библиотеки Fc, выбрали варианты, несущие различные мутации и имеющие высокие выходы гетеродимеризации (80 - 90%).

На основании наблюдения, что антитела IgG4 способны обмениваться своими плечами Fab, динамический процесс включает отделение двух тяжелых цепей и повторную сборку в целый IgG4. Данный процесс приписывался последовательностям шарнира сердцевины IgG4, конъюгированным с остатками в домене CH3. Этот природный процесс обмена плечами Fab в IgG4 приспособили для получения биспецифических молекул IgG1 путем контролируемого обмена плечами Fab (сFAE). Скрининг мутаций в домене CH3, позволяющих сFAE в контексте мутации K409R в соответствующем CH3, привел к

выявлению мутации F405L, которая позволяла эффективный обмен половинами отдельно экспрессированных антител после смешивания и слабого восстановления β -меркаптоэтанолом. Масштабируемость данного процесса продемонстрировали для биспецифического IgG против EGFR x против CD20 (DuoBody) с получением > 95% биспецифических молекул.

Комплементарность в контактирующей поверхности CH3, позволяющая гетеродимерную сборку Fc-цепей, была разработана путем дизайна гетеродимеров доменов, сконструированных путем обмена между цепями (SEED). Данные домены SEED CH3 состоят из чередующихся фрагментов, полученных из последовательностей CH3 IgA и IgG человека (AG SEED CH3 и GA SEED CH3), и их использовали для получения так называемых SEEDbody (Davis и др., 2010). Так как по молекулярным моделям предположили, что взаимодействие с неонатальным Fc-рецептором (FcRn) нарушалось в AG SEED CH3, то остатки в месте соединения CH2-CH3 заменили обратно на таковые из последовательностей IgG. Фармакокинетические исследования подтвердили длительный период полувыведения SEEDbody по сравнению с другими слитыми с Fc белками и IgG1 (Muda и др., 2011). Одним примером SEEDbody является получение биспецифического слитого с Fab белка scFv-Fc, нацеленного на два различных эпитопа на EGFR. Данное бипаратопное антитело продемонстрировало повышенную активность, сходную с таковой у комбинации двух исходных антител.

Дополнительную гетеродимеризующую контактирующую поверхность CH3 получали, имитируя природное соединение α - и β -цепей T-клеточного рецептора. Данную технологию BEAT (биспецифическое соединение антителами, основанное на T-клеточном рецепторе) применяли для получения слитого белка Fab/scFv-Fc, чтобы избежать неправильного спаривания легких цепей. Данный подход применяли для получения биспецифического антитела, направленного против CD3 и HER2, для перенацеливания T-клеток.

Leaver-Fay и коллеги (Leaver-Fay и др., 2016) применили дизайн множества состояний (MSD) – подход, который конструирует множество состояний белка одновременно с получением набора мутаций CH3 на контактирующей поверхности Fc. Два набора (7.8.60 и 20.8.34) применяли для получения биспецифических IgG, полученных из пертузумаба (против HER2), матузумаба (против EGFR), BHA10 (против LT α R) и MetMAb (против cMet), в комбинации с ортогональными мутациями контактирующих поверхностей Fab, что позволяло во всех случаях получить по меньшей мере 93% биспецифических антител.

Гетеродимерной сборки тяжелых цепей также можно добиться, применяя отдельный модуль гетеродимеризации, который впоследствии удаляют из биспецифического антитела. Данную стратегию применяли, используя структуру лейциновой молнии, полученную из пептидов Acid.p1 (Ap1) и Base.p1 (Bp1), слитую с С-концом двух тяжелых цепей. Данную платформу LUZ-Y применяли для получения моновалентных слитых белков Fab-Fc, но также биспецифических IgG на основе общей легкой цепи или плеч scFab, направленных против EGFR и HER3. Внедрение сайта протеолитического расщепления между С-концом Fc-цепи и последовательностями лейциновой молнии позволит удалить лейциновую молнию с получением биспецифического антитела IgG с природным составом.

Хотя применение модификаций, чтобы вынудить гетеродимеризацию Fc-областей, решает проблему с тяжелыми цепями, в данных подходах все еще присутствует проблема с легкими цепями. Таким образом, применение двух различных легких цепей все еще позволяет образование четырех различных комбинаций, только одна из которых биспецифическая. Следовательно, были разработаны подходы, чтобы добиться правильного спаривания когнатных тяжелых и легких цепей в комбинации с Fc-модифицированными тяжелыми цепями.

Первый описанный подход состоял в использовании общей легкой цепи (Merchant и др., 1998). Данный подход был основан на наблюдении, что в антителах, выделенных из библиотек фагового дисплея с помощью разнообразных антигенов, часто использовался один и тот же домен VL, отражая очень ограниченный размер репертуара L-цепей в фаговой библиотеке. В комбинации с модификацией выступы-во-впадины тяжелой цепи получали биспецифические молекулы IgG, например, направленные против HER3 и Mpl. Различные биспецифические IgG с общей легкой цепью впоследствии получали, применяя, например, модификацию выступы-во-впадины, но также другие модификации Fc.

В нескольких модификациях Fc, описанных выше, используются фрагменты scFv, слитые с цепями Fc с получением биспецифических антител, чтобы обойти проблему легких цепей. На основании открытия, что фрагменты Fab можно экспрессировать в виде одноцепочечного производного (scFab, чтобы соединить С-конец легкой цепи с N-концом домена VH), получали полноразмерные молекулы IgG путем экспрессии одного полипептида, содержащего легкую цепь, соединенную с тяжелой цепью. Использовали линкер длиной от 30 остатков, например, (G₄S)₆, до 38 остатков, включая делеции соединяющей дисульфидной связи между CH1 и CL. Усовершенствованная платформа scFab была описана для связанных дисульфидной связью молекул scFab с применением

линкера из 60 гибких остатков. Линкер G₄S₆ применяли для получения биспецифического слитого белка Fab-Fc в комбинации с мутациями выступы-во-впадины в Fc-области, который дополнительно модифицировали путем С-концевого слияния с scFv фрагментами с получением триспецифических трехвалентных и четырехвалентных молекул, описанных на примере нацеливания на EGFR, IGF-1R и либо cMet, либо HER3. Формат scFab также комбинировали со стратегией гетеродимеризации LUZ-Y Fc. Здесь сайты протеолитического расщепления внедряли в линкер Fab, чтобы обеспечить возможность удаления линкеров из правильно соединенных биспецифических молекул IgG. Более того, scFab комбинировали с немодифицированными фрагментами Fab с получением биспецифических слитых белков Fab-scFab-Fc в комбинации с Fc(kih) (формат OAscFab-IgG), как показано для биспецифического IgG, нацеленного на EGFR и IGF-1R, который можно было экспрессировать с высоким выходом.

Отличный подход используется в технологии CrossMab. Здесь, в контексте тяжелых цепей выступы-во-впадины, либо легкую цепь одного плеча Fab заменяли на фрагмент Fd соответствующей тяжелой цепи (CrossMab^{Fab}), либо происходил обмен только одной парой переменных (CrossMab^{VH-VL}) или константных доменов (CrossMab^{CH1-CL}) одного Fab между легкой и тяжелой цепями. Это приводило к спариванию немодифицированной легкой цепи с соответствующей немодифицированной тяжелой цепью и спариванию модифицированной легкой цепи с соответствующей модифицированной тяжелой цепью. На примере биспецифического CrossMab, направленного против VEGF и Ang-2, продемонстрировали одновременное связывание антигена с неизменной аффинностью, при этом у CrossMab^{CH1-CL} наблюдали лучший профиль побочных продуктов. В последующем исследовании показали, что данное антитело (A2V) было способно репрограммировать связанные с опухолью макрофаги, что приводило к пролонгированной выживаемости во множестве моделей внечерепных опухолей. Антитело (RG7716) на сегодняшний день проходит клинические испытания. В недавнем исследовании формат CrossMab^{CH1-CL} применяли для получения биспецифических антител, направленных против белка Env ВИЧ и CD4/CCR5, для нейтрализации вируса. Здесь гетерогенность наблюдали в исходных CrossMab, вследствие неправильного спаривания немодифицированной легкой цепи, которое можно было улучшить путем введения дополнительных мутаций в данную цепь. Подход CrossMab развился в универсальную платформенную технологию, позволяющую получать не только бивалентные биспецифические молекулы IgG, но также три- и четырехвалентные биспецифические слитые белки IgG, например, путем слияния

дополнительного фрагмента Fab с N-концом одной из тяжелых цепей выступы-во-впадины, или двух плеч Fab CrossMab с C-концом гомодимеризующихся тяжелых цепей, при этом технология CrossMab позволяет множество других форматов, включая биспецифические, трехвалентные и четырехвалентные слитые белки IgG-Fab, например, для получения биспецифических молекул с одним сайтом связывания для CD3 и двумя для связанного с опухолью антигена. Данная концепция дополнительно развилась для получения четырехвалентных тетраспецифических антител «четыре в одном» путем применения Fc-области выступы-во-впадины и технологии CrossMab для плеч Fab «два в одном» (см. ниже).

Другой подход к проблеме легких цепей представляет собой генную инженерию контактирующей поверхности легкой и тяжелой цепей с получением ортогональной контактирующей поверхности, которая позволяет легкой цепи взаимодействовать с более высокой аффинностью с распознаваемой тяжелой цепью. Здесь модифицируют взаимодействие между переменными доменами (парой VH-VL) и первыми константными доменами (CH1-CL). В результате тестирования различных модификаций, обнаруженных путем применения дизайна множества состояний, установили набор мутаций, который благоприятствовал спариванию ортогональных фрагментов Fab. Данные модификации применяли для получения различных биспецифических молекул IgG, например, направленных против EGFR x cMET, EGFR x HER2, Axl x cMet, и EGFR x LTβR, или против двух эпитопов на HER2, путем комбинирования сайта связывания трастузумаба с таковым для пертузумаба. Здесь гетеродимеризация Fc проходила под действием электростатических наводящих эффектов, введенных в домен CH3 (Gunasekaran и др., 2010). Например, биспецифическое антитело с ортогональными плечами Fab на основе пертузумаба (против HER2) и матузумаба (против EGFR), оба с легкой цепью лямбда, получали путем замены Q39K, R62E, H172A, F174G в тяжелой цепи и D1R, Q38R, L135Y, S176W в легкой цепи пертузумаба (модификации VRD1CRD2) в комбинации с Q39Y в тяжелой цепи и Q38R в легкой цепи матузумаба (модификации VRD2), на выходе получая 90% правильно собранных легких цепей.

Дополнительной попыткой направить спаривание легкой цепи с распознаваемым фрагментом Fc тяжелой цепи была замена доменов CH1 и CL из одного плеча Fab на домены Cα и Cβ из Т-клеточного рецептора (TCR). Данный подход применяли для получения либо молекулы Fab-IgG с плечом Fab, слитым с помощью линкера (G₄S)₅ с N-концом тяжелой цепи, либо молекулы IgG-Fab с плечом Fab, слитым с помощью линкера

(G₄S)₄ с С-концом тяжелой цепи, что показано на примере биспецифических антител, полученных из трастузумаба и пертузумаба. Тем не менее, вероятно вследствие сильного взаимодействия VH/VL в сайте связывания трастузумаба, лишь в малой фракции выявили правильное спаривание плеч Fab. Это удалось до некоторой степени улучшить путем введения дополнительной мутации в домены VL (Y36F), чтобы ослабить взаимодействие VH-VL, а также введения взаимодействия заряд-заряд между доменами VL и VH (Q38D VL, Q39K VH) в Fv трастузумаба.

Тем не менее, хотя существует множество подходов для направления гетеродимеризации мультиспецифических антител, данные молекулы имеют искусственное происхождение. Особенно важным вопросом, который необходимо решить, остается иммуногенность. Более того, степень гетеродимеризации часто неудовлетворительна, и термическая стабильность и биофизические свойства, например, период полувыведения, часто не такие, как ожидается.

Для того чтобы преодолеть недостатки известного уровня техники, авторы настоящего изобретения дополнительно исследовали получение доменов Ig, которые собирались в гетеродимеры, которые можно применять в качестве строительных блоков для получения молекул с одной, двумя или более специфичностями и валентностями. Главная особенность состоит в том, что данные гетеродимерные пары состоят только из человеческих последовательностей, и данные пары создают полностью естественную поверхность гетеродимеризации без каких-либо введенных мутаций, следовательно минимизируя возможность вызывать иммунный ответ. Кроме того, гетеродимеризующиеся домены Ig можно соединить дисульфидной связью, которая образуется между остатками цистеина, содержащимися во встречающихся в природе последовательностях, и они представлены в развившейся в процессе эволюции и, следовательно, оптимальной конформации. Более того данные домены можно дополнительно обеспечить способностью взаимодействовать, например, с FcRn или со смежными доменами Ig, такими как CH2 или переменные домены, которые придают дополнительные предпочтительные свойства гетеродимеризующимся доменам. Неожиданно обнаружили, что можно улучшить конечный период полувыведения полученного бивалентного формата и повысить биодоступность. Более того, данные гетеродимеризующиеся строительные блоки Ig применяли для получения двух- или трехвалентных и биспецифических слитых белков scFv-Fc для перенацеливания экспрессирующих CD3 T-клеток на экспрессирующие FAP

(белок активации фибробластов) или Her3 опухолевые клетки или на опухолевые клетки, которые окружены экспрессирующими FAP фибробластами.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Основополагающим принципом настоящего изобретения является получение новых гетеродимеризующихся областей или гетеродимеризующихся доменов белков (HRI и HRII), которые можно включить в два или более белков белкового комплекса, причем константные домены иммуноглобулина естественным образом гетеродимеризуются (первая и третья CRI), и их модифицируют, чтобы придать HRI и HRII дополнительные свойства. Данные свойства переносят с одного или более дополнительных константных доменов иммуноглобулина (второй и четвертой CRI), которые отличаются от первой и второй CRI, на гетеродимеризующиеся константные домены иммуноглобулина (первая и третья CRI) путем замены аминокислот гетеродимеризующихся константных доменов иммуноглобулинов (первой и третьей CRI) на аминокислоты из альтернативных константных доменов иммуноглобулинов (второй и четвертой CRI). Данные свойства представляют собой, например, взаимодействие с неонатальным Fc-рецептором (FcRn) или взаимодействие с присоединенными к N- или C-концам доменами белков (например, дополнительными константными доменами иммуноглобулинов, которые не являются первой, второй, третьей или четвертой CRI).

Таким образом, в первом аспекте настоящего изобретения предложен белковый комплекс, содержащий по меньшей мере две цепи аминокислот I и II, которые нековалентно связаны друг с другом посредством области гетеродимеризации I (HRI), содержащейся в цепи аминокислот I, и области гетеродимеризации II (HRII), содержащейся в цепи аминокислот II, причем HRI и HRII, соответственно, содержат гетеродимеризующиеся домены константной области иммуноглобулина человека или подобного иммуноглобулином белка, причем каждый гетеродимеризующийся домен модифицирован таким образом, что последовательности аминокислот дополнительного иммуноглобулина или подобного иммуноглобулином белка встроены в по меньшей мере две, предпочтительно по меньшей мере три области соответствующего гетеродимеризующегося домена, которые находятся снаружи поверхности гетеродимеризации соответствующих HRI и HRII, т.е., которые предпочтительно доступны растворителю после гетеродимеризации HRI и HRII.

В частности белковый комплекс согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере две цепи аминокислот I и II, которые нековалентно связаны друг с другом посредством области гетеродимеризации I (HRI), содержащейся в цепи аминокислот I, и области гетеродимеризации II (HRII), содержащейся в цепи аминокислот II, причем

- (a) HRI содержит семь антипараллельных бета-цепей AI, BI, CI, DI, EI, FI и GI, шесть промежуточных областей bI, cI, dI, eI, fI и gI, N-концевую область aI и C-концевую область hI, расположенные от N-конца к C-концу в следующем порядке:

aI-AI-bI-BI-cI-CI-dI-DI-eI-EI-fI-FI-gI-GI-hI,

причем HRI представляет собой слитый белок первой человеческой константной области иммуноглобулина или подобного иммуноглобулину белка (первой CRI, акцептора), аминокислоты которой перемежаются с аминокислотами второй человеческой константной области иммуноглобулина или подобного иммуноглобулину белка (второй CRI, донора),

где первая CRI содержит семь антипараллельных бета-цепей A1, B1, C1, D1, E1, F1 и G1, шесть промежуточных областей b1, c1, d1, e1, f1 и g1, N-концевую область a1 и C-концевую область h1, расположенные от N-конца к C-концу в следующем порядке:

a1-A1-b1-B1-c1-C1-d1-D1-e1-E1-f1-F1-g1-G1-h1,

где вторая CRI содержит семь антипараллельных бета-цепей A2, B2, C2, D2, E2, F2 и G2, шесть промежуточных областей b2, c2, d2, e2, f2 и g2, N-концевую область a2 и C-концевую область h2, расположенные от N-конца к C-концу в следующем порядке:

a2-A2-b2-B2-c2-C2-d2-D2-e2-E2-f2-F2-g2-G2-h2,

причем HRI имеет последовательность аминокислот первой CRI, и по меньшей мере следующие аминокислоты первой CRI заменены на следующие аминокислоты из второй CRI:

- (i) по меньшей мере 1 аминокислота из a1 заменена на по меньшей мере 1 аминокислоту из a2 (Замена 1);
 - (ii) по меньшей мере 1 аминокислота из c1 заменена на по меньшей мере 1 аминокислоту из c2 (Замена 2); и
 - (iii) по меньшей мере 1 аминокислота из g1 заменена на по меньшей мере 1 аминокислоту из g2 (Замена 3); и где
- (b) HRII содержит семь антипараллельных бета-цепей AII, BII, CII, DII, EII, FII и GII, шесть промежуточных областей bII, cII, dII, eII, fII и gII, N-концевую область aII и C-концевую область hII, расположенные от N-конца к C-концу в следующем порядке:

aII-AII-bII-BII-cII-CII-dII-DII-eII-EII-fII-FII-gII-GII-hII,

причем HRII представляет собой слитый белок третьей человеческой константной области иммуноглобулина или подобного иммуноглобулину белка (третьей CRI, акцептора), аминокислоты которой перемежаются с аминокислотами четвертой человеческой константной области иммуноглобулина или подобного иммуноглобулину белка (четвертой CRI, донора), и

где третья CRI содержит семь антипараллельных бета-цепей A3, B3, C3, D3, E3, F3 и G3, шесть промежуточных областей b3, c3, d3, e3, f3 и g3, N-концевую область a3 и C-концевую область h3, расположенные от N-конца к C-концу в следующем порядке:

a3-A3-b3-B3-c3-C3-d3-D3-e3-E3-f3-F3-g3-G3-h3,

где четвертая CRI содержит семь антипараллельных бета-цепей A4, B4, C4, D4, E4, F4 и G4, шесть промежуточных областей b4, c4, d4, e4, f4 и g4, N-концевую область a4 и C-концевую область h4, расположенные от N-конца к C-концу в следующем порядке:

a4-A4-b4-B4-c4-C4-d4-D4-e4-E4-f4-F4-g4-G4-h4,

причем HRII имеет последовательность аминокислот третьей CRI, и по меньшей мере следующие аминокислоты третьей CRI заменены на следующие аминокислоты из четвертой CRI:

- (i) по меньшей мере 1 аминокислота из a3 заменена на по меньшей мере 1 аминокислоту из a4 (Замена 4);
- (ii) по меньшей мере 1 аминокислота из c3 заменена на по меньшей мере 1 аминокислоту из c4 (Замена 5); и
- (iii) по меньшей мере 1 аминокислота из g3 заменена на по меньшей мере 1 аминокислоту из g4 (Замена 6),

где первая CRI и третья CRI отличаются друг от друга и специфично связываются друг с другом при физиологических условиях.

Во втором аспекте настоящего изобретения предложена нуклеиновая кислота, кодирующая цепь аминокислот I и/или II согласно первому аспекту.

В третьем аспекте настоящего изобретения предложен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту согласно второму аспекту.

В четвертом аспекте настоящего изобретения предложен способ определения (установления) последовательности аминокислот HRI с цепью аминокислот I и/или HRII с последовательностью аминокислот II, включающий следующие этапы:

- (i) выбора первой CRI, второй CRI, третьей CRI и четвертой CRI;

- (ii) определения (установления) семи бета-цепей A, B, C, D, E, F и G первой CRI, второй CRI, третьей CRI и четвертой CRI, промежуточных последовательностей b, c, d, e, f и g первой CRI, второй CRI, третьей CRI и четвертой CRI, N- и C-концевых последовательностей a и h, соответственно, первой CRI, второй CRI, третьей CRI и четвертой CRI;
- (iii) замены по меньшей мере 1 аминокислоты из a из первой CRI на по меньшей мере 1 аминокислоту из a из второй (Замена 1); замены по меньшей мере 1 аминокислоты из c из первой CRI на по меньшей мере 1 аминокислоту из c из второй CRI (Замена 2); замены по меньшей мере 1 аминокислоты из g из первой CRI на по меньшей мере 1 аминокислоту из g из второй CRI (Замена 3); замены по меньшей мере 1 аминокислоты из a из третьей CRI на по меньшей мере 1 аминокислоту из a из четвертой CRI (Замена 4); замены по меньшей мере 1 аминокислоты из c из третьей на по меньшей мере 1 аминокислоту из c из четвертой CRI (Замена 5); и замены по меньшей мере 1 аминокислоты из g из третьей на по меньшей мере 1 аминокислоту g из четвертой CRI (Замена 6),

где первая CRI и третья CRI отличаются друг от друга и специфично связываются друг с другом при физиологических условиях.

В пятом аспекте настоящего изобретения предложен способ получения цепи аминокислот I, содержащей последовательность HRI, определенную (установленную) согласно четвертому аспекту, и/или цепи аминокислот II, содержащей последовательность HRII, определенную (установленную) согласно четвертому аспекту.

В шестом аспекте настоящего изобретения предложен белковый комплекс согласно первому аспекту для применения в качестве лекарственного средства.

ПЕРЕЧЕНЬ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фигура 1. Схематическое изображение последовательности константного домена Ig. Представлен рисунок последовательности домена Ig, на котором стрелки указывают на положение бета-цепей, а прямоугольники описывают области петли.

Фигура 2. Схематичный вид гетеродимеризующихся доменов Ig. Пример набора гетеродимеризующихся областей I и II (HRI и HRII) с человеческими константными областями иммуноглобулина или подобного иммуноглобулину белка (CRI). Возможные последовательности первой и третьей CRI происходят из двух различных гетеродимеризующихся доменов Ig (белая часть, первая CRI и третья CRI), у которых,

например, остается способность образовывать межцепочечные дисульфидные связи (черный прямоугольник). Возможные последовательности второй и четвертой CRI доменов Ig, которые взаимодействуют, например, с FcRn или со второй CRI и четвертой CRI других доменов Ig, обозначены черным.

Фигура 3. Графическое изучение набора доменов Ig. Показан рисунок наложения остовов аминокислот набора доменов Ig (см. фиг. 4), где β-цепи изображены черным, тогда как области петли изображены серым.

Фигура 4. Выравнивание последовательностей нескольких доменов Ig. Остатки, которые, как предсказано, будут образовывать бета-цепи, выделены черным шрифтом и темно-серым фоном. Остатки, которые, как предсказано, будут образовывать бета-цепи, но исключены из бета-цепей A - G в силу структуры или выравнивания последовательностей, выделены черным шрифтом и светло-серым фоном. Остатки, которые, как предсказано, не будут образовывать бета-цепи, но включены в бета цепь A - G в силу структуры или выравнивания последовательностей, выделены белым шрифтом и темно-серым фоном.

Фигура 5. Схематическое изображение определения последовательностей второй/четвертой CRI и первой/третьей CRI. Представлена последовательность гетеродимеризующихся доменов Ig, где стрелки указывают на положение бета-цепей и прямоугольники описывают области петли. Белый цвет указывает на последовательности **первой/третьей CRI**, тогда как черно-белый цвет указывает на участки последовательностей, происходящие из последовательностей **второй CRI/четвертой CRI**. Различные длины последовательностей **второй/четвертой CRI** предусмотрены для особых применений (A: CH31, B: CH3k, C: другие домены).

Фигура 6. Графическое изучение дополнительных замен остатков первой/третьей CRI на аминокислоты второй CRI/четвертой CRI. а) Взаимодействие Val37 (серый, палки) из CH3 из IgG1 с Ile46 и Val48 (серые сферы), привитыми из CH3 из IgG1 (серый) на домен **первой/третьей CRI** (черный). б) Взаимодействие Glu49, Ala47 и Met107 из CH3 из IgG (серые палки) с остатками из домена CH2 IgG (серые сферы), слитого с N-концом гетеродимеризующегося домена Ig (черный). с) Взаимодействие Tyr81 из CH1 из IgG (серые палки) или любого константного домена легкой цепи с переменным доменом (серые сферы), слитым с N-концом гетеродимеризующегося домена Ig (черный).

Фигура 7. Удлинение гетеродимеризующихся доменов Ig. N- и C-концы многофункционального белкового комплекса (например, ковалентно связанных гетеродимеров со способностью связывать FcRn) могут быть слиты с дополнительными

доменами белков, включающими различные домены Ig, представители TNFSF, другие цитокины, токсины и т.д.

Фигура 8. Выравнивание последовательностей доменов CH31 (HRI) и CH3k (HRII) Ig. Показано выравнивание IgG1-CH1 (первая CRI) с IgG1-CH3 (вторая CRI, сверху) и выравнивание Ig-каппа-CL (третья CRI) с IgG1-CH3 (четвертая CRI, снизу). Части последовательности, которые применяли для создания гетеродимеризующихся доменов Ig со способностью связывать FcRn, подчеркнуты. Остатки, которые, как предсказано, будут образовывать бета-цепи, выделены черным шрифтом и темно-серым фоном. Остатки, которые, как предсказано, будут образовывать бета-цепи, но исключены из бета-цепей А - G в силу структуры или выравнивания последовательностей, выделены черным шрифтом и светло-серым фоном. Остатки, которые, как предсказано, не будут образовывать бета-цепи, но включены в бета-цепи А - G в силу структуры или выравнивания последовательностей, выделены белым шрифтом и темно-серым фоном.

Фигура 9. Гетеродимеризующаяся часть Fc. В примере 1 показано применение представленной системы для создания части Fc гетеродимеризующегося антитела. Следовательно, IgG1-CH1 и Ig-каппа CL применяли в качестве первой CRI и третьей CRI, соответственно, при этом привитые последовательности второй CRI и четвертой CRI IgG1-CH3 были слиты с С-концами последовательностей шарнира IgG1 и CH2 (назвали Fc1k).

Фигура 10. Генотип контрольных конструкций scFv13.7-Fc1k и scFv13.7-Fc. а) Генетическое расположение гетеродимеризующихся доменов IgG тяжелой и легкой цепей scFv13.7-Fc1k, включая сайты рестрикции, применяемые для клонирования. б) Генетическое расположение гомодимеризующихся доменов IgG тяжелой и легкой цепей scFv13.7-Fc, включая сайты рестрикции, применяемые для клонирования.

Фигура 11. Экспрессия контрольных конструкций scFv13.7-Fc1k и scFv13.7-Fc. а) Схематическое иллюстрирование scFv13.7-Fc1k. б) ЭФ в ПААГ/ДСН очищенного scFv13.7-Fc1k (5% концентрирующий гель, 12% разделяющий гель). в) Эксклюзионная хроматография scFv13.7-Fc1k. г) Схематическое иллюстрирование scFv13.7-Fc. д) ПААГ/ДСН очищенного scFv13.7-Fc (5% концентрирующий гель, 12% разделяющий гель). е) Эксклюзионная хроматография scFv13.7-Fc.

Фигура 12. Схематичный вид примера 2: Fv13.7-Fc1k. Сверху: получение многофункциональных доменов Ig. Для этого IgG1-CH1 и Ig-каппа-CL применяли в качестве первой CRI и третьей CRI, соответственно, при этом привитые последовательности второй CRI и четвертой CRI IgG1-CH3 были слиты с С-концами IgG1-

CH2 (назвали Fc1k). Слияние одного VH13.7 или VL13.7 с каждым из доменов CH2, соединенных посредством линкерных последовательностей, привело к получению моновалентного Fv13.7-Fc1k. Снизу: генетическое расположение доменов IgG тяжелой и легкой цепей Fv13.7-Fc1k, включая сайты рестрикции, применяемые для клонирования.

Фигура 13. Экспрессия Fv13.7-Fc1k. а) Схематическое иллюстрирование Fv13.7-Fc1k. б) ЭФ в ПААГ/ДСН очищенного Fv13.7-Fc1k (5% концентрирующий гель, 12% разделяющий гель). с) Эксклюзионная хроматография Fv13.7-Fc1k.

Фигура 14. Равновесное связывание Fv13.7-Fc1k с TNFR1-Fc человека. Исследовали связывание его возрастающих концентраций с huTNFR1-Fc в твердофазном иммуноферментном анализе (ELISA) ($n = 3$, среднее $\pm$ стандартное отклонение (CO)). Fab13.7 служил в качестве контроля.

Фигура 15. Биологическая активность Fv13.7-Fc1k. а) Высвобождение IL-8 из клеток HT1080, запускаемое Fv13.7-Fc1k. Нестимулированные клетки, TNF (33 нМ), атросаб и Fab13.7 служили в качестве контролей. Представлены средние значения и CO по двум отдельным экспериментам. б) Представлено ингибирование IL-8, вызванное 0,1 нМ TNF. атросаб, Fab13.7, 0,1 нМ TNF и нестимулированные клетки служили в качестве контролей. Показаны средние значения и CO по двум отдельным экспериментам.

Фигура 16. Фармакокинетическое исследование Fv13.7-Fc1k. Исходный и конечный периоды полувыведения из плазмы после инъекции одной дозы (25 мкг), а также биодоступность (площадь под кривой) определяли, используя мышей C57BL/6J ($n = 3/n = 4$ в случае атросаб), несущих в гомозиготном состоянии внеклеточный домен TNFR1 человека в локусе гена мыши. Оставшееся активное антитело в образцах сыворотки детектировали с помощью ELISA. атросаб и Fab13.7 служили в качестве контролей.

Фигура 17. Схематичный вид примера 3 - FAP_N -CH3N-hFc и FAP_N -CH3N-Fc. Два фрагмента scFv, нацеленных либо на FAP, либо на CD3, соединяли с N-концом шарнирной области гетеродимеризующейся части Fc - Fc1k (пример 3a). Такую же конструкцию получали, применяя шарнирную последовательность без цистеинов, чтобы избежать опосредованного шарниром образования ковалентных перекрестных связей (пример 3b).

Фигура 18. Схематичный вид примера 4 - FAP_N -CH3C-hFc и FAP_N -CH3C-Fc. Два фрагмента scFv, нацеленных либо на FAP, либо на CD3, соединяли с N-концом (FAP) или C-концом (CD3) гетеродимеризующейся части Fc - Fc1k (пример 4a). Такую же конструкцию получали, применяя шарнирную последовательность без цистеинов, чтобы

избежать опосредованного шарниром образования ковалентных перекрестных связей (пример 4b).

Фигура 19. Схематичный вид примера 5 - FAP_{NN}-CH3_C-hFc и FAP_{NN}-CH3_C-Fc.

Два фрагмента scFv, нацеленных на FAP, соединяли с N-концом гетеродимеризующейся части Fc - Fc1k, и другой scFv, нацеленный на CD3, соединяли с C-концом Fc1k (пример 5a). Такую же конструкцию получали, применяя шарнирную последовательность без цистеинов, чтобы избежать опосредованного шарниром образования ковалентных перекрестных связей (пример 5b).

Фигура 20. Схематичный вид примера 6 - FAP_{NC}-CH3_C-hFc и FAP_{NC}-CH3_C-Fc.

Два фрагмента scFv, нацеленных на FAP, соединяли либо с N-концом, либо с C-концом гетеродимеризующейся части Fc - Fc1k, и другой scFv, нацеленный на CD3, соединяли с C-концом Fc1k (пример 6a). Такую же конструкцию получали, применяя шарнирную последовательность без цистеинов, чтобы избежать опосредованного шарниром образования ковалентных перекрестных связей (пример 6b).

Фигура 21. Выравнивание последовательностей первой CRI/третьей CRI и последовательностей второй CRI/четвертой CRI для получения биспецифического IgG. Последовательности доменов первой CRI и третьей CRI альфа-3- и бета-2-микроглобулинов FcRn выравнивали с последовательностями доменов второй CRI и четвертой CRI CH3 из IgG (a), и последовательности доменов первой CRI и третьей CRI TCR-альфа-2 и TCR-бета-2 выравнивали с последовательностями второй CRI и четвертой CRI CH1 из IgG и константного домена Ig-каппа, соответственно (b). Части последовательностей, которые использовали для создания гетеродимеризующихся доменов Ig со связыванием FcRn (a) или возможностью взаимодействия между доменами Ig (b), подчеркнуты. Остатки, которые, как предсказано, будут образовывать бета-цепи, выделены черным шрифтом и темно-серым фоном. Остатки, которые, как предсказано, будут образовывать бета-цепи, но исключены из бета-цепей A - G в силу структуры или выравнивания последовательностей, выделены черным шрифтом и светло-серым фоном. Остатки, которые, как предсказано, не будут образовывать бета-цепи, но включены в бета-цепи A - G в силу структуры или выравнивания последовательностей, выделены белым шрифтом и темно-серым фоном.

Фигура 22. Схематичный вид примера 7 - биспецифический IgG. Нужно было создать два многофункциональных домена Ig, чтобы обеспечить гетеродимеризацию Fc и решить проблему легких цепей. Fcb2Rn состоит из последовательностей доменов первой

CRI и третьей CRI альфа-3- и бета-2-микроглобулина FcRn и привитых последовательностей второй CRI и четвертой CRI CH3 из IgG (7a). FabTCR состоит из последовательности доменов первой CRI и третьей CRI TCR-альфа-2 и TCR-бета-2 и привитых последовательностей второй CRI и четвертой CRI CH1 из IgG и константного домена Ig-каппа (7b).

Фигура 23. Схематичный вид примера 8 - Fv13.7х-Fc1k. Сверху: получение многофункциональных доменов Ig. Для этого IgG1-CH1 и Ig-каппа-CL применяли в качестве первой CRI и третьей CRI, соответственно, при этом привитые последовательности второй CRI и четвертой CRI IgG1-CH3 были слиты с С-концами IgG1-CH2 (назвали Fc1k). Слияние одного VH13.7 или VL13.7 с каждым из доменов CH2, соединенных посредством линкерных последовательностей, привело к получению моновалентного Fv13.7х-Fc1k. Снизу: генетическое расположение доменов IgG тяжелой и легкой цепей Fv13.7х-Fc1k, включая сайты рестрикции, применяемые для клонирования.

Фигура 24. Продукция и биологическая активность Fv13.7х-Fc. а) Генотип Fv13.7х Fc1k. б) Очищенный белок анализировали с помощью ЭФ в ПААГ/ДСН (10%, окрашивали кумасси), а затем с помощью эксклюзионной хроматографии ЭХ (с, колонка SEC-3000 Yarra, скорость потока 0,5 мл/мин). d) Связывание Fv13.7х Fc1k с TNFR1 человека-Fc исследовали с помощью ELISA (n = 1, среднее ± СО по двум повторам, атросаб и Fab13.7 служили в качестве контролей). е) Анализировали высвобождение IL-8 из клеток HT1080, запускаемое Fv13.7х Fc1k (n = 1, среднее ± СО по двум повторам, атросаб, Fab13.7, нестимулированные клетки и рекомбинантный TNF человека служили в качестве контролей), а также ингибирование вызванного TNF высвобождения IL-8, применяя 0,1 нМ рекомбинантный TNF человека (f, n = 1, среднее ± СО по двум повторам, атросаб, Fab13.7, нестимулированные клетки и рекомбинантный TNF человека служили в качестве контролей).

Фигура 25. Схематичный вид примера 9 - FvCD3-Fc1k-scFvHer3₂. Сверху: получение многофункциональных доменов Ig. Для этого IgG1-CH1 и Ig-каппа-CL применяли в качестве первой CRI и третьей CRI, соответственно, при этом привитые последовательности второй CRI и четвертой CRI IgG1-CH3 были слиты с С-концами IgG1-CH2 (назвали Fc1k). Слияние одного из VHCD3 и VLCD3 с каждым из доменов CH2, соединенных посредством линкерных последовательностей, и, кроме того, слияние одного нацеленного на Her3 фрагмента scFv с каждым С-концом Fc1k привело к получению биспецифических и трехвалентных FvCD3-Fc1k-scFvHer3₂. Снизу: генетическое

расположение доменов IgG цепей FvCD3-Fc1k-scFvHer3₂, включая сайты рестрикции, применяемые для клонирования.

Фигура 26. Схематичный вид примера 10 - 13.7_NCD3_N-hFc1k. Сверху: получение многофункциональных доменов Ig. Для этого IgG1-CH1 и Ig-каппа-CL применяли в качестве первой CRI и третьей CRI, соответственно, при этом привитые последовательности второй CRI и четвертой CRI IgG1-CH3 были слиты с С-концами IgG1-CH2 (назвали Fc1k). Два фрагмента scFv, нацеленных либо на TNFR1 человека (scFv13.7), либо на CD3, соединяли с N-концом шарнирной области гетеродимеризующейся части Fc - Fc1k. Снизу: генетическое расположение доменов IgG цепей 13.7_NCD3_N-hFc1k, включая сайты рестрикции, применяемые для клонирования.

Фигура 27. Получение и биологическая активность 13.7_NCD3_N-hFc1k. а) Генотип 13.7_NCD3_N-hFc1k. б) Очищенный белок анализировали с помощью ЭФ в ПААГ/ДСН (10%, окрашивали кумасси), а затем с помощью ЭХ (с, колонка SEC-3000 Yarra, скорость потока 0,5 мл/мин). d) Связывание 13.7_NCD3_N-hFc1k с TNFR1 человека-Fc исследовали с помощью ELISA (n = 1, среднее ± СО по двум повторам). е) Связывание 13.7_NCD3_N-hFc1k с экспрессирующими TNFR1 клетками HT1080 (n = 1, среднее ± СО по двум повторам), а также с экспрессирующими CD3 клетками Jurkat анализировали с помощью проточной цитометрии (f, n = 1, среднее ± СО по двум повторам). г) Привлечение к экспрессирующим TNFR1 клеткам HT1080 и активацию мононуклеарных клеток периферической крови человека исследовали *in vitro* путем окрашивания кристаллическим фиолетовым выживших клеток-мишеней после 5 дней стимуляции (n = 1, среднее ± СО по двум повторам).

Фигура 28. Схематичный вид примера 10 – Her3_NCD3_N-hFc1k. Сверху: получение многофункциональных доменов Ig. Для этого IgG1-CH1 и Ig-каппа-CL применяли в качестве первой CRI и третьей CRI, соответственно, при этом привитые последовательности второй CRI и четвертой CRI IgG1-CH3 были слиты с С-концами IgG1-CH2 (назвали Fc1k). Два фрагмента scFv, нацеленных либо на Her3, либо на CD3, соединяли с N-концом шарнирной области гетеродимеризующейся части Fc - Fc1k. Снизу: генетическое расположение доменов IgG цепей Her3_NCD3_N-hFc1k, включая сайты рестрикции, применяемые для клонирования.

Фигура 29. Получение и биологическая активность Her3_NCD3_N-hFc1k. а) Генотип Her3_NCD3_N-hFc1k. б) Очищенный белок анализировали с помощью ЭФ в ПААГ/ДСН (10%, окрашивали кумасси), а затем с помощью ЭХ (с, колонка SEC-3000 Yarra,

скорость потока 0,5 мл/мин). d) Связывание Her3_NCD3_N-hFc1k с Her3-Fc исследовали с помощью ELISA (n = 1, среднее ± СО по двум повторам).

Фигура 30. Схематичный вид примера 10 – MSCP_NCD3_N-hFc1k. Сверху: получение многофункциональных доменов Ig. Для этого IgG1-CH1 и Ig-каппа-CL применяли в качестве первой CRI и третьей CRI, соответственно, при этом привитые последовательности второй CRI и четвертой CRI IgG1-CH3 были слиты с С-концами IgG1-CH2 (назвали Fc1k). Два фрагмента scFv, нацеленные либо на MCSP, либо на CD3, соединяли с N-концом шарнирной области гетеродимеризующейся части Fc Fc1k. Снизу: генетическое расположение доменов IgG цепей MSCP_NCD3_N-hFc1k, включая сайты рестрикции, применяемые для клонирования.

Фигура 31. Получение и биологическая активность MSCP_NCD3_N-hFc1k. а) Генотип MSCP_NCD3_N-hFc1k. b) Очищенный белок анализировали с помощью ЭФ в ПААГ/ДСН (10%, окрашивали кумасси), а затем с помощью ЭХ (с, колонка SEC-3000 Yarra, скорость потока 0,5 мл/мин). d) Привлечение и активацию мононуклеарных клеток периферической крови человека к клеткам WM35, экспрессирующим MCSP, исследовали *in vitro* путем окрашивания кристаллическим фиолетовым выживших клеток-мишеней после 5 дней стимуляции (n = 1, среднее ± СО по двум повторам).

Фигура 32. Схематичный вид примера 10 – Her3_NCD3_C-hFc1k. Сверху: получение многофункциональных доменов Ig. Для этого IgG1-CH1 и Ig-каппа-CL применяли в качестве первой CRI и третьей CRI, соответственно, при этом привитые последовательности второй CRI и четвертой CRI IgG1-CH3 были слиты с С-концами IgG1-CH2 (назвали Fc1k). Два фрагмента scFv, нацеленных либо на Her3, либо на CD3, соединяли с N- или С-концом шарнирной области гетеродимеризующейся части Fc - Fc1k, соответственно. Снизу: генетическое расположение доменов IgG цепей Her3_NCD3_C-hFc1k, включая сайты рестрикции, применяемые для клонирования.

Фигура 33. Получение и биологическая активность Her3_NCD3_C-hFc1k. а) Генотип Her3_NCD3_C-hFc1k. b) Очищенный белок анализировали с помощью ЭФ в ПААГ/ДСН (10%, окрашивали кумасси), а затем с помощью ЭХ (с, колонка SEC-3000 Yarra, скорость потока 0,5 мл/мин). d) Исследовали связывание Her3_NCD3_C-hFc1k с Her3-Fc с помощью ELISA (n = 1, среднее ± СО по двум повторам).

Фигура 34. Последовательности.

Перечень последовательностей – информация в произвольной форме

SEQ ID NO: 1

Последовательность аминокислот CH1 из IgG1

SEQ ID NO: 2	Последовательность аминокислот CH1 из IgG2
SEQ ID NO: 3	Последовательность аминокислот CH1 из IgG3
SEQ ID NO: 4	Последовательность аминокислот CH1 из IgG4
SEQ ID NO: 5	Последовательность аминокислот CH1 IgA1
SEQ ID NO: 6	Последовательность аминокислот CH1 IgA2
SEQ ID NO: 7	Последовательность аминокислот CH1 IgD
SEQ ID NO: 8	Последовательность аминокислот CH1 IgE
SEQ ID NO: 9	Последовательность аминокислот CH1 IgM
SEQ ID NO: 10	Последовательность аминокислот TCR α
SEQ ID NO: 11	Последовательность аминокислот TCR β
SEQ ID NO: 12	Последовательность аминокислот альфа-3 FcRn
SEQ ID NO: 13	Последовательность аминокислот β -2-микроглобулина
SEQ ID NO: 14	Последовательность аминокислот HLA-A
SEQ ID NO: 15	Последовательность аминокислот α 3 HLA-B
SEQ ID NO: 16	Последовательность аминокислот α 2 HLA-D
SEQ ID NO: 17	Последовательность аминокислот β 2 HLA-D
SEQ ID NO: 18	Последовательность аминокислот константной области Ig κ
SEQ ID NO: 19	Последовательность аминокислот константной области Ig λ
SEQ ID NO: 20	Последовательность аминокислот CH3 ₁ , первая CRI: CH1 (IgG1), вторая CRI: CH3 (IgG1)
SEQ ID NO: 21	Последовательность аминокислот CH3 _к , третья CRI: CL _к , вторая CRI: CH3 (IgG1)
SEQ ID NO: 22	Последовательность аминокислот CH1H3, первая CRI: CH1 (IgG1), вторая CRI: CH3 (IgG1)
SEQ ID NO: 23	Последовательность аминокислот CLkH3, третья CRI: CL _к , четвертая CRI: CH3 (IgG1)
SEQ ID NO: 24	Последовательность аминокислот b2mH3, первая CRI: бета-2-микроглобулин, вторая CRI: CH3 (IgG1)
SEQ ID NO: 25	Последовательность аминокислот FcRnH3, третья CRI: домен альфа-3 FcRn, четвертая CRI: CH3 (IgG1)
SEQ ID NO: 26	Последовательность аминокислот TCRaH3, первая CRI: константный домен альфа-цепи TCR, вторая CRI: CH3 (IgG1)
SEQ ID NO: 27	Последовательность аминокислот TCRbH3, третья CRI: константный домен бета-цепи TCR, четвертая CRI: CH3 (IgG1)
SEQ ID NO: 28	Последовательность аминокислот TCRaH1, первая CRI: константный домен альфа-цепи TCR, вторая CRI: CH1 (IgG1)

SEQ ID NO: 29	Последовательность аминокислот TCRaLk, третья CRI: константный домен альфа-цепи TCR, четвертая CRI: CL κ
SEQ ID NO: 30	Последовательность аминокислот TCRaLL, третья CRI: константный домен альфа-цепи TCR, четвертая CRI: CL λ
SEQ ID NO: 31	Последовательность аминокислот TCRbH1, первая CRI: константный домен бета-цепи TCR, вторая CRI: CH1 (IgG1)
SEQ ID NO: 32	Последовательность аминокислот TCRb1Lk, третья CRI: константный домен бета-цепи TCR, четвертая CRI: CL κ
SEQ ID NO: 33	Последовательность аминокислот TCRbLL, третья CRI: константный домен бета-цепи TCR, четвертая CRI: CL λ
SEQ ID NO: 34	Последовательность аминокислот VH13.7-CH2-CH31
SEQ ID NO: 35	Последовательность аминокислот VL13.7-CH2-CH3 κ
SEQ ID NO: 36	Последовательность аминокислот scFv13.7-шарнир-CH2-CH31
SEQ ID NO: 37	Последовательность аминокислот шарнир-CH2-CH3 κ
SEQ ID NO: 38	Последовательность аминокислот scFvhuU3-шарнир-CH2-CH3 κ
SEQ ID NO: 39	Последовательность аминокислот scFv3-43-шарнир-CH2-CH31
SEQ ID NO: 40	Последовательность аминокислот scFhuMCSP-шарнир-CH2-CH31
SEQ ID NO: 41	Последовательность аминокислот VH13.7-CH2-CH3 κ
SEQ ID NO: 42	Последовательность аминокислот VL13.7-CH2-CH31
SEQ ID NO: 43	Последовательность аминокислот VHCD3-CH2-CH3 κ -scFvHer3
SEQ ID NO: 44	Последовательность аминокислот VLCD3-CH2-CH31-scFvHer3
SEQ ID NO: 45	Последовательность аминокислот CH3 из IgG1
SEQ ID NO: 46	Последовательность аминокислот IgG2 CH3
SEQ ID NO: 47	Последовательность аминокислот IgG3 CH3
SEQ ID NO: 48	Последовательность аминокислот IgG4 CH3
SEQ ID NO: 49	Последовательность аминокислот IgM CH4
SEQ ID NO: 50	Последовательность аминокислот IgA1 CH3
SEQ ID NO: 51	Последовательность аминокислот IgA2 CH3
SEQ ID NO: 52	Последовательность аминокислот IgD CH3
SEQ ID NO: 53	Последовательность аминокислот IgE CH4
SEQ ID NO: 54	Последовательность аминокислот константной области Ig λ
SEQ ID NO: 55	Последовательность аминокислот константной области Ig λ
SEQ ID NO: 56	Последовательность аминокислот константной области Ig λ
SEQ ID NO: 57	Последовательность аминокислот β 1 TCR
SEQ ID NO: 58	Последовательность аминокислот β 2 HLA-D

Фигура 35. Определение биохимических параметров Fv13.7X-Fc1k. Fv13.7X-Fc1k получали из пула клеток CHO после стабильной трансдукции лентивирусом и очищали с помощью хроматографии на основе белка А и последующей препаративной ЭХ. Определение параметров проводили с помощью аналитической ЭХ (а, TSKgel SuperSW mAb HR, скорость потока 0,5 мл/мин, подвижная фаза $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) и ЭФ в ПААГ/ДСН (b, 4 - 12% Bis-TRIS Midi Gel NuPAGE™) в восстанавливающих (В) и невосстанавливающих (НВ) условиях. М: маркер. с) Температуру плавления определяли с помощью динамического рассеяния света и визуальной оценки полученных результатов. Анализ стабильности в плазме проводили после инкубации в плазме человека для указанных моментов времени, с последующим анализом значений EC_{50} остаточного связывающего белка с помощью ELISA (d).

Фигура 36. Связывание Fv13.7X-Fc1k с антигеном и рецептором Fc. Связывание Fv13.7X-Fc1k с TNFR1 человека-Fc анализировали с помощью ELISA (а, $n = 3$, среднее $\pm$ СО) и пьезокварцевого микровзвешивания (QCM) (b). Для получения кинетических данных в b) использовали пять концентраций от 128 нМ до 4 нМ, и алгоритм связывания один к одному использовали для аппроксимации. С) Связывание человек рецепторов Fc-гамма I, II и III и белка комплемента C1q с иммобилизованным Fv13.7X-Fc1k анализировали в ELISA. Ритуксимаб (часть Fc дикого типа) и атросаб (молчащий Fc) использовали в качестве контролей ($n = 2$, среднее $\pm$ СО).

Фигура 37. Отсутствие агонистической и антагонистической биологической активности у Fv13.7X-Fc1k. Свойственное Fv13.7X-Fc1k отсутствие агонистической активности в отношении активации TNFR1 продемонстрировали в трех отдельных анализах. А) Высвобождение IL-6 из клеток HeLa, b) высвобождение IL-8 из клеток HT1080 и в анализе индукции гибели клеток с применением клеток Кум-1 (с). Ингибиторная способность Fv13.7X-Fc1k была также показана в анализе высвобождения IL-6 с применением клеток HeLa (d), анализе высвобождения IL-8 с применением клеток HT1080 (е) и в анализе индукции гибели клеток с применением клеток Кум-1 (f), которые проводили в присутствии постоянной концентрации 0,1 нМ TNF (d и е) или 0,01 нМ TNF (f). Fab 13.7, атросаб и TNF отдельно служили в качестве контрольных молекул для активации TNFR1 (TNF и атросаб в а, b и с), а также для ингибирования вызванной TNF активации TNFR1 (Fab 13.7 и атросаб в d, е и f). Все графики представляют собой среднее значение по трем отдельным экспериментам, планки погрешностей показывают СО .

Фигура 38. Отсутствие агонистической биологической активности у Fv13.7X-Fc1k в присутствии антител к IgG человека. Активацию TNFR1 на поверхности клеток HT1080 под действием Fv13.7X-Fc1k в присутствии постоянной концентрации (прибл. 15,8 нМ) трех различных препаратов сыворотки против IgG человека (a, b и c) определяли по обнаружению высвобождения IL-8 в культуральный супернатант. Клетки отдельно и 33 нМ TNF использовали в качестве контролей. Агонистическое действие потенциально связывающихся посредством перекрестных связей антител сравнивали с Fab 13.7 и атросабом. Результаты всех экспериментов представлены в виде среднего значения $\pm$ СО по трем отдельным экспериментам.

Фигура 39. Фармакокинетический анализ Fv13.7X-Fc1k. 400 мкг Fv13.7X-Fc1k вводили путем инъекции мышам C56BL/6J с нокином, несущим ген внеклеточного домена TNFR1 человека, соединенного с трансмембранным и внутриклеточным доменами мыши, вместо гена мыши дикого типа. Оставшейся интактный белок в сыворотке определяли с помощью ELISA после связывания с TNFR1 в указанные моменты времени. Представлено среднее значение $\pm$ СО по пяти мышам.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Перед подробным описанием настоящего изобретения, приведенным ниже, отметим, что должно быть понятно, что настоящее изобретение не ограничено конкретными методиками, протоколами и реагентами, описанными в данной заявке, так как они могут изменяться. Также должно быть понятно, что терминология, применяемая в данной заявке, используется лишь с целью описания конкретных вариантов реализации, и не предполагается, что она ограничивает объем настоящего изобретения, который будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения. Если не указано иначе, все технические и научные термины, используемые в данной заявке, имеют те же значения, которые обычно понимает средний специалист в данной области.

Предпочтительно термины, используемые в данной заявке, имеют определения, описанные в «A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)», Leuenberger, H.G.W, Nagel, B. и Kölbl, H., ред. (1995), Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Базель, Швейцария).

По всему тексту данного описания цитируется несколько документов. Каждый из документов, цитированных в данной заявке (включая все патенты, заявки на патент, научные публикации, спецификации производителей, инструкции, номера доступа в

GenBank депонированных последовательностей и т.д.), либо выше, либо ниже, настоящим полностью включен посредством ссылки. Ни один материал, включенный в описание, не должен рассматриваться как признание того, что настоящее изобретение не дает права датировать такую публикацию более ранним числом в силу предшествующего изобретения.

Определения

Термин «включают» и его варианты, такие как «включает» и «включающий», следует понимать подразумевающим включение заявленного целого числа или этапа или группы целых чисел или этапов, но не исключение какого-либо другого целого числа или этапа или группы целых чисел или этапов.

В настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают множественное число, если в контексте явно не указано иное.

Концентрации, количества и другие числовые данные могут быть выражены или представлены в данной заявке в формате «диапазона». Должно быть понятно, что такой формат диапазона применяют лишь для удобства и краткости, и, следовательно, его следует интерпретировать гибко как включающий не только числовые значения, явно перечисленные как пределы данного диапазона, но также включающий все отдельные числовые значения или поддиапазоны, находящиеся внутри данного диапазона, как если бы каждое числовое значение и поддиапазон были явно перечислены. В качестве примера, числовой диапазон «от 150 мг до 600 мг» следует понимать как включающий не только явно перечисленные значения от 150 мг до 600 мг, но также включающий отдельные значения и поддиапазоны внутри указанного диапазона. Следовательно, в данный числовой диапазон включены отдельные значения, такие как 150, 160, 170, 180, 190, ... 580, 590, 600 мг, и поддиапазоны, такие как от 150 до 200, от 150 до 250, от 250 до 300, от 350 до 600, и т.д. Те же самые принципы распространяются на диапазоны, перечисляющие только одно числовое значение. Более того, такое толкование должно быть применимо независимо от широты диапазона или описанных свойств.

Подразумевают, что термин «приблизительно», когда его используют по отношению к числовому значению, включает числовые значения внутри диапазона, нижний предел которого на 5% меньше, чем указанное числовое значение, и верхний предел которого на 5% больше, чем указанное числовое значение.

Термин «нуклеиновая кислота» и «молекула нуклеиновой кислоты» используют синонимично в данной заявке и понимают как одно- или двухцепочечные олиго- или полимеры дезоксирибонуклеотидных или рибонуклеотидных оснований, или обоих видов оснований. Нуклеотидные мономеры состоят из азотистого основания, сахара из пяти атомов углерода (такого как, но не ограниченного рибозой или 2'-дезоксирибозой) и от одной до трех фосфатных групп. Обычно нуклеиновая кислота образуется посредством фосфодиэфирных связей между отдельными нуклеотидными мономерами. В контексте настоящего изобретения термин нуклеиновая кислота включает, но не ограничен молекулами рибонуклеиновой кислоты (РНК) и дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), и также включает синтетические формы нуклеиновых кислот, содержащие другие связи (например, пептидные нуклеиновые кислоты, как описанные в Nielsen и др. (Science 254:1497-1500, 1991)). Обычно нуклеиновые кислоты представляют собой одно- или двухцепочечные молекулы и состоят из встречающихся в природе нуклеотидов. Изображение одной цепи нуклеиновой кислоты также определяет (по меньшей мере частично) последовательность комплементарной цепи. Нуклеиновая кислота может быть одно- или двухцепочечной или может содержать части как двух-, так и одноцепочечных последовательностей. В качестве примера, двухцепочечные молекулы нуклеиновых кислот могут содержать 3'- или 5'-липкие концы, и, соответственно, не требуется и не предполагается, что они полностью двухцепочечные по всей длине. Нуклеиновую кислоту можно получить с помощью способов биологического, биохимического или химического синтеза или любого из способов, известных в данной области, включая, но не ограничиваясь способами амплификации и обратной транскрипции РНК. Термин нуклеиновая кислота включает хромосомы или фрагменты хромосом, векторы (например, векторы экспрессии), кассеты экспрессии, полимер голый ДНК или РНК, праймеры, зонды, кДНК, геномную ДНК, рекомбинантную ДНК, комплементарную РНК (кРНК), мРНК, тРНК, микроРНК или малую интерферирующую РНК (миРНК). Нуклеиновая кислота может быть, например, одноцепочечной, двухцепочечной или трехцепочечной, и не ограничена какой-либо конкретной длиной. Если не указано иначе, отдельная последовательность нуклеиновой кислоты включает или кодирует комплементарные последовательности дополнительно к любой явно указанной последовательности.

Нуклеиновые кислоты могут разрушаться эндонуклеазами или экзонуклеазами, в частности, ДНКазами и РНКазами, которые могут находиться в клетке. Следовательно, может быть предпочтительной модификация нуклеиновых кислот согласно настоящему

изобретению, чтобы стабилизировать их от деградации, тем самым гарантируя, что в клетке сохраняется высокая концентрация нуклеиновой кислоты в течение длительного периода времени. Обычно такой стабилизации можно добиться путем введения одной или более межнуклеотидных фосфатных групп или путем введения одной или более нефосфорных промежуточных нуклеотидов. Соответственно, нуклеиновые кислоты могут состоять из не встречающихся в природе нуклеотидов и/или модифицированных встречающихся в природе нуклеотидов, и/или могут содержать измененный остов молекулы. Модифицированные межнуклеотидные фосфатные радикалы и/или нефосфорные мостики в нуклеиновой кислоте включают, но не ограничены перечисленными: метилфосфонат, фосфоротриат, фосфорамидат, фосфородитриат и/или сложные эфиры фосфорной кислоты, тогда как нефосфорные межнуклеотидные аналоги включают, но не ограничены перечисленными: силоксановые мостики, карбонатные мостики, карбоксиметилловые эфиры, ацетамидатные мостики и/или тиоэфирные мостики. Дополнительные примеры модификаций нуклеотидов включают, но не ограничены перечисленными: фосфорилирование 5'- или 3'-нуклеотидов, чтобы обеспечить возможность лигирования или предотвращения разрушения экзонуклеазами/удлинения полимеразой, соответственно; модификации амином, тиолом, алкином или биотином для ковалентных и почти ковалентных присоединений; флуорофоры и гасители; и модифицированные основания, такие как дезоксиинозин (dI), 5-бром-дезоксиуридин (5-бром-dU), дезоксиуридин, 2-уминопурин, 2,6-диаминопурин, инвертированный dT, инвертированный дидезокси-T, дидезоксицитидин (ddC 5-метилдезоксицитидин (5-метил-dC), запертые нуклеиновые кислоты (ЗНК), 5-нитроиндол, изо-dC- и -dG-основания, 2'-О-метил-основания РНК, гидроксиметил-dC, 5-гидроксипутирил-2'-дезоксиуридин, 8-аза-7-деазагуанозин и модифицированные фтором основания. Таким образом, нуклеиновая кислота также может представлять собой искусственную нуклеиновую кислоту, которая включает, но не ограничена полиамидом или пептид-нуклеиновой кислотой (ПНК), морфолиновой и запертой нуклеиновой кислотой (ЗНК), а также гликоль-нуклеиновой кислотой (ГНК) и тетрозо-нуклеиновой кислотой (ТНК).

Нуклеиновая кислота «функционально связана», когда она помещена в функциональную взаимосвязь с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию последовательности; или сайт

связывания рибосомы функционально связан с кодирующей последовательностью, если он расположен таким образом, чтобы способствовать трансляции.

Термин «полинуклеотид», когда его используют в контексте настоящего изобретения, относится к нуклеиновой кислоте длиной более чем приблизительно 50 нуклеотидов, например, длиной 51 или более нуклеотидов.

Полипептиды согласно настоящему изобретению получают с помощью любого подходящего способа, включая, но не ограничиваясь перечисленными: выделение существующей или природной последовательности, репликацию ДНК или амплификацию, обратную транскрипцию, клонирование и рестрикционное расщепление соответствующих последовательностей, или прямой химический синтез с помощью такого способа, как фосфотриэфирный способ, описанный у Narang и др. (Meth. Enzymol. 68:90-99, 1979); фосфодиэфирный способ, описанный у Brown и др. (Meth. Enzymol. 68:109-151, 1979); диэтилфосфорамидитный способ, описанный у Beaucage и др. (Tetrahedron Lett. 22:1859-1862, 1981); триэфирный способ, описанный у Matteucci и др. (J. Am. Chem. Soc. 103:3185-3191, 1981); автоматизированные способы синтеза; или способ с применением твердой подложки, описанный в патенте США номер 4458066, или другие способы, известные специалистам в данной области.

В данной заявке термин «вектор» относится к белку или полинуклеотиду, или к их смеси, которые допускают их введение или введение содержащихся в них белков и/или нуклеиновых кислот в клетку. Примеры векторов включают, но не ограничены перечисленными: плазмиды, космиды, фаги, вирусы или искусственные хромосомы. В частности, вектор применяют для перемещения интересующего продукта гена, такого как, например, чужеродная или гетерологичная ДНК, в подходящую клетку-хозяина. Векторы могут содержать полинуклеотидные последовательности «репликаона», которые способствуют автономной репликации вектора в клетке-хозяине. Чужеродной ДНК называют гетерологичную ДНК, которая представляет собой ДНК, в природе не находящуюся в клетке-хозяине, которая, например, реплицирует молекулу вектора, кодирует селективируемый или позволяющий скрининг маркер, или кодирует трансген. После проникновения в клетку-хозяина вектор может реплицироваться независимо или совместно с хромосомной ДНК хозяина, и может образоваться несколько копий вектора и встроенной в него ДНК. Кроме того, вектор также может содержать необходимые элементы, которые позволяют транскрипцию встроенной ДНК в молекулу мРНК, или другим образом вызывают репликацию встроенной ДНК с получением множества копий

РНК. Векторы могут дополнительно содержать «контролирующие экспрессию последовательности», которые регулируют экспрессию интересующего гена. Обычно контролирующие экспрессию последовательности представляют собой полипептиды или полинуклеотиды, такие как, но не ограниченные перечисленными: промоторы, энхансеры, сайленсеры, инсуляторы или репрессоры. В векторе, содержащем более чем один полинуклеотид, кодирующий один или более интересующих продуктов генов, экспрессию можно контролировать совместно или отдельно с помощью одной или более контролирующих экспрессию последовательностей. В частности, каждый полинуклеотид, содержащийся в векторе, можно контролировать с помощью отдельной контролирующей экспрессию последовательности, или все полинуклеотиды, содержащиеся в векторе, можно контролировать с помощью одной контролирующей экспрессию последовательности. Полинуклеотиды, содержащиеся на одном векторе, контролируемые одной контролирующей экспрессию последовательностью, могут образовывать открытую рамку считывания. Некоторые векторы экспрессии дополнительно содержат элементы последовательности, расположенные рядом со встроенной ДНК, которые увеличивают период полувыведения экспрессированной мРНК и/или позволяют трансляцию мРНК с получением молекулы белка. Таким образом, можно быстро синтезировать множество молекул мРНК и полипептида, кодируемых встроенной ДНК.

Термин «аминокислота» в общем смысле относится к любой мономерной единице, которая содержит содержащую заместители или не содержащую заместителей аминокислотную группу, содержащую заместители или не содержащую заместителей карбоксильную группу и одну или более боковых цепей или групп, или аналоги любой из данных групп. Примеры боковых цепей включают, например, тиольную группу, селеновую группу, сульфонильную, алкильную, арильную, ацильную, кетольную, азидную, гидроксильную, гидразиновую группу, цианогруппу, галогеновую, гидразидную, алкенильную, алкинильную, эфирную, боратную, боронатную, фосфатную, фосфонатную, фосфиновую, гетероциклическую, еноновую, иминовую, альдегидную, сложноэфирную, тиокислотную, гидроксиламиновую группу или любую комбинацию данных групп. Другие примеры аминокислот включают, но не ограничены перечисленными: аминокислоты, содержащие фотоактивируемые перекрестносшивающие агенты, связывающие металл аминокислоты, спин-меченые аминокислоты, флуоресцентные аминокислоты, содержащие металл аминокислоты, аминокислоты с ранее не известными функциональными группами, аминокислоты, которые ковалентно или нековалентно взаимодействуют с другими

молекулами, фотоэкранированные (photocaged) и/или фотоизомеризуемые аминокислоты, радиоактивные аминокислоты, аминокислоты, содержащие биотин или аналог биотина, гликозилированные аминокислоты, модифицированные другим углеводом аминокислоты, аминокислоты, содержащие полиэтиленгликоль или полиэфир, аминокислоты, содержащие в качестве заместителей тяжелые атомы, химически расщепляемые и/или фоторасщепляемые аминокислоты, аминокислоты, содержащие связанный с углеродом сахар, редокс-активные аминокислоты, содержащие аминокислоты и аминокислоты, содержащие одну или несколько токсичных молекул. В данной заявке в объем термина «аминокислота» входят следующие двадцать природных или генетически закодированных альфа-аминокислот: аланин (Ala или A), аргинин (Arg или R), аспарагин (Asn или N), аспарагиновая кислота (Asp или D), цистеин (Cys или C), глутамин (Gln или Q), глутаминовая кислота (Glu или E), глицин (Gly или G), гистидин (His или H), изолейцин (Ile или I), лейцин (Leu или L), лизин (Lys или K), метионин (Met или M), фенилаланин (Phe или F), пролин (Pro или P), серин (Ser или S), треонин (Thr или T), триптофан (Trp или W), тирозин (Tyr или Y) и валин (Val или V). В случаях, когда остатки «X» не определены, их следует понимать как «любая аминокислота». Структуры данных двадцати природных аминокислот представлены, например, у Stryer и др., *Biochemistry*, 5ое изд., Freeman и Company (2002). Дополнительные аминокислоты, такие как селеноцистеин и пирролизин, также могут быть генетически закодированы (Stadtman (1996) «Selenocysteine», *Annu Rev Biochem.* 65:83-100, и Ibba и др. (2002) «Genetic code: introducing pyrrolysine», *Curr Biol.* 12(13):R464-R466). В объем термина «аминокислота» также входят неприродные аминокислоты, модифицированные аминокислоты (например, содержащие модифицированные боковые цепи и/или остовы) и аналоги аминокислот. См., например, Zhang и др. (2004) «Selective incorporation of 5-hydroxytryptophan into proteins in mammalian cells», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101(24):8882-8887, Anderson и др. (2004) «An expanded genetic code with a functional quadruplet codon», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101(20):7566-7571, Ikeda и др. (2003) «Synthesis of a novel histidine analogue and its efficient incorporation into a protein in vivo», *Protein Eng. Des. Sel.* 16(9):699-706, Chin и др. (2003) «An Expanded Eukaryotic Genetic Code», *Science* 301(5635):964-967, James и др. (2001) «Kinetic characterization of ribonuclease S mutants containing photoisomerizable phenylazophenylalanine residues», *Protein Eng. Des. Sel.* 14(12):983-991, Kohrer и др. (2001) «Import of amber and ochre suppressor tRNAs into mammalian cells: A general approach to site-specific insertion of amino acid analogues into proteins», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98(25):14310-14315, Bacher и др.

(2001) «Selection and Characterization of Escherichia coli Variants Capable of Growth on an Otherwise Toxic Tryptophan Analogue», J. Bacteriol. 183(18):5414-5425, Hamano-Takaku и др. (2000) «A Mutant Escherichia coli Tyrosyl-tRNA Synthetase Utilizes the Unnatural Amino Acid Azatyrosine More Efficiently than Tyrosine», J. Biol. Chem. 275(51):40324-40328, и Budisa и др. (2001) «Proteins with {beta}-(thienopyrrolyl) alanines as alternative chromophores and pharmaceutically active amino acids», Protein Sci. 10(7):1281-1292. Аминокислоты можно соединить в пептиды, полипептиды или белки.

В контексте настоящего изобретения термин «пептид» относится к короткому полимеру аминокислот, связанных пептидными связями. Он содержит такие же химические (пептидные) связи, как и белки, но его длина обычно меньше. Самый короткий пептид представляет собой дипептид, состоящий из двух аминокислот, соединенных одной пептидной связью. Также существуют трипептид, тетрапептид, пентапептид и т.д. Обычно длина пептида составляет до 8, 10, 12, 15, 18 или 20 аминокислот. Пептид содержит аминоконец и карбоксильный конец, если только он не является циклическим пептидом.

В контексте настоящего изобретения термин «полипептидная цепь» или «цепь аминокислот» относится к одной линейной цепи аминокислот, связанных пептидными связями, и обычно содержит по меньшей мере приблизительно 21 аминокислоту.

Термин «белковый комплекс» в данной заявке, относится к группе из двух или более соединенных полипептидных цепей или цепей аминокислот. У различных полипептидных цепей могут быть различные функции. Белковые комплексы представляют собой форму четвертичной структуры. Белки в белковом комплексе связаны нековалентными белок-белковыми взаимодействиями и необязательно дополнительно ковалентными связями, например, образованными между двумя соседними остатками Cys в двух различных полипептидных цепях. В зависимости от стабильности нековалентных и необязательных ковалентных связей, у различных белковых комплексов различны степени стабильности с течением времени.

Термин «человеческая константная область иммуноглобулина или подобного иммуноглобулином белка (CRI)» используют в контексте настоящего изобретения по отношению к последовательности аминокислот длиной от 60 до 150 аминокислот, содержащей семь антипараллельных бета-цепей, образующих многослойную глобулярную структуру из двух соединенных цистеином складчатых бета-слоев. Пример складчатой структуры показан на фиг. 3. Последовательности аминокислот наиболее предпочтительных CRI для применения в контексте настоящего изобретения указаны на

фиг. 4. В объем данного термина также входят варианты особо указанных последовательностей, при условии что данные варианты все еще могут образовывать бета-складчатую подобную домену Ig многослойную конформацию.

Термин «гетеродимеризующаяся область» (HRI, HRII) в данной заявке относится к последовательности участка аминокислот внутри соответствующих цепей аминокислот I и II большего размера, которые специфично связываются друг с другом предпочтительно при физиологических условиях и которые, следовательно, определяют гетеродимеризацию цепей аминокислот I и II. Термин гетеродимеризующаяся область также подразумевает, что последовательности аминокислот цепей аминокислот I и II различны. В отношении приведенного выше определения белкового комплекса, связывание между HRI и HRII главным образом опосредовано нековалентным взаимодействием. Тем не менее, если каждая из HRI и HRII содержит остаток Cys в соседних положениях на поверхности связывания HRI и HRII, ковалентные связи между данными остатками Cys могут стабилизировать связывание между HRI и HRII. Каждая из HRI и HRII образует бета-складчатую структуру, аналогичную таковой, показанной на фиг. 3.

Термин «Fc-функция» применяют по отношению к способности иммуноглобулинов стимулировать фагоцитарные или цитотоксические клетки к уничтожению микробов или инфицированных клеток путем опосредованного антителами фагоцитоза, антителозависимой клеточной цитотоксичности или опосредованного комплементом цитолиза. Данная функция основана на связывании антитела с Fc-рецепторами, присутствующими на поверхностях некоторых из иммунных клеток, в частности, В-лимфоцитов, фолликулярных дендритных клеток, естественных клеток-киллеров, макрофагов, нейтрофилов, эозинофилов, базофилов, тромбоцитов человека и тучных клеток. «Fc-функция» дополнительно относится к способности связываться с неонатальным Fc-рецептором (FcRn), опосредующим более длительный период полувыведения. Специалист хорошо осведомлен о том, как измерить Fc-функцию антитела или фрагмента антитела. Fc-функция иммуноглобулинов, главным образом, находится в домене CH2 и/или CH3, в частности, в иммуноглобулинах IgG.

В контексте настоящего изобретения «первичная структура» белка или полипептида представляет собой последовательность аминокислот в полипептидной цепи. «Вторичная структура» белка представляет собой общую трехмерную форму локальных фрагментов белка. Тем не менее, она не описывает конкретные положения атомов в трехмерном пространстве, которые считают третичной структурой. В белках вторичная структура

определяется паттернами водородных связей между амидными и карбоксильными группами остова. «Третичная структура» белка представляет собой трехмерную структуру белка, обусловленную координатами атомов. «Четвертичная структура» представляет собой расположение множества складчатых или спиральных молекул белков или полипептидов в состоящий из множества субъединиц комплекс.

Термин «укладка» или «укладка белка» в данной заявке относится к процессу, посредством которого белок принимает трехмерную форму или конформацию, т.е., посредством которого белок вынужден образовать определенную трехмерную форму посредством нековалентных и/или ковалентных взаимодействий, таких как, но не ограничиваясь перечисленными: водородные связи, металлокоординационные взаимодействия, гидрофобные силы, силы Ван-дер-Ваальса, пи-пи-взаимодействия, электростатические эффекты и/или внутримолекулярные Cys-связи. Термин «свернутый белок», следовательно, относится к белку в его трехмерной форме, такой как его вторичная, третичная или четвертичная структура.

Термин «бета-цепь», используемый в контексте настоящего изобретения, относится к участку длиной от 5 до 10 аминокислот внутри полипептидной цепи, в котором торсионный угол N-C α -C-N в остова составляет приблизительно 120 градусов. Расположение бета-цепей внутри данной белковой последовательности можно предсказать после (множественного) выравнивания последовательностей (например, применяя Clustal Omega), извлекая аннотации из файлов pdb. Если не все 7 бета-цепей определены (например, отмечено звездочкой на фиг. 4), предсказание бета-цепей можно дополнительно осуществить, применяя общедоступные программные средства, такие как JPred (для выравнивания на фиг. 4 использовали наиболее длинное совокупное предсказание, применяя установки по умолчанию). Начальное и конечное положения семи бета-цепей можно подтвердить с помощью дополнительного структурного выравнивания последовательностей из файла PDB, применяя ruMol. Множественное выравнивание последовательностей, следовательно, можно улучшить, исходя из структурно консервативных остатков, в результате (i) включения ранее не отнесенных остатков в цепи или (ii) исключения ранее отнесенных остатков из цепей, а также (iii) удаления гэпов внутри бета-цепей, введенных в последовательности при множественном выравнивании последовательностей или (iv) путем добавления новых гэпов за пределами бета-цепей (что осуществили для 4 исключений на фиг. 4: d_CH3 - положение 111; m_CH1 - положение 72; HLAA/HLAB - положение 60). Добавленные/удлиненные или удаленные/укороченные

положения гэпов необходимо компенсировать удалением или добавлением положений гэпов в следующем уже существующем гэпе, введенном в последовательности во время множественного выравнивания последовательностей, соответственно, чтобы сохранить выравнивание последовательностей в областях, расположенных ближе к С-концу. Следовательно, указанные семь бета-цепей можно определить с помощью средств, описанных далее:

А) шесть остатков, следующих за консервативным остатком пролина, находящимся с N-конца от предсказанной первой бета-цепи (положения 13 - 18 на фиг. 4).

В) четыре соседних остатка с N-конца и пять соседних остатков с С-конца от консервативного остатка цистеина, включенного во вторую предсказанную бета-цепь (положения 31 – 40 на фиг. 4).

С) четыре соседних остатка с N-конца и два соседних остатка с С-конца от консервативного остатка триптофана, включенного в третью предсказанную бета-цепь (положения 46 - 52 на фиг. 4).

Д) положения 63 - 70 на фиг. 4, хотя связь с консервативным остатком по всему выравниванию была не возможна.

Е) восемь остатков, начиная с консервативного остатка тирозина/фенилаланина, расположенного в начале или с N-конца четвертой предсказанной бета-цепи (положения 81 - 89 на фиг. 4).

Ф) определили как два соседних остатка с N-конца и четыре соседних остатка с С-конца от консервативного остатка цистеина, входящего в шестую предсказанную бета-цепь (положения 102 - 108 на фиг. 4).

Г) положения 128 - 133 на фиг. 4, хотя связь с консервативным остатком по всему выравниванию была не возможна.

Таким образом, специалист может легко определить семь бета-цепей в данной константной области иммуноглобулина или подобного иммуноглобулину белка (CRI). В качестве альтернативы, данную CRI, не включенный в фиг. 4, можно добавить в выравнивание на фиг. 4. Бета-цепь А перекрывает положения в IgLCRC от 13 до 18, бета-цепь В перекрывает положения в IgLCRC с 31 по 40, бета-цепь С перекрывает положения в IgLCRC с 46 по 52, бета-цепь D перекрывает положения в IgLCRC с 63 по 70, бета-цепь Е перекрывает положения в IgLCRC с 81 по 89, бета-цепь F перекрывает положения в IgLCRC от 102 до 108, бета-цепь G перекрывает положения в IgLCRC от 128 до 133,

Термин «бета-слой», используемый в контексте настоящего изобретения, относится к антипараллельно ориентированным β -цепям, которые образуют бета-слой. Бета-слой представляет собой обычный мотив нормальной вторичной структуры белков. Так как у пептидных цепей есть направленность, придаваемая их N-концом и C-концом, β -цепи также можно назвать направленными. Их обычно обозначают на топологических диаграммах белков стрелкой, указывающей направление к C-концу. Соседние β -цепи могут образовывать водородные связи в антипараллельных, параллельных или смешанных расположениях. В антипараллельном расположении следующие друг за другом β -цепи чередуют направление, так что N-конец одной цепи расположен рядом с C-концом следующей. Данное расположение приводит к наиболее сильной межцепочечной стабильности, так как оно позволяет межцепочечным водородным связям между карбонилами и аминами быть плоскими, что является их предпочтительной ориентацией. Для β -структуры характерны протяженные полипептидные цепи. В аминокислотном составе β -цепей наблюдается тенденция к предпочтению гидрофобных (боящихся воды) аминокислотных остатков. Боковые цепи данных остатков имеют тенденцию к меньшей растворимости в воде, чем более гидрофильные (любящие воду) остатки. β -структуры имеют тенденцию к нахождению внутри коровой структуры белков, где водородные связи между цепями защищены от конкуренции с молекулами воды. Как видно на фиг. 3, указанные семь антипараллельных бета-цепей, содержащихся в каждой CRI и, таким образом, также в HRI и HRII, каждая из которых получена из двух CRI, образуют бета-складчатую структуру.

Термин «промежуточные области», используемый в контексте иммуноглобулина человека или подобного иммуноглобулину человека белка, относится к цепям аминокислот между двумя бета-цепями. Промежуточные области менее структурированы, например, образуют петли, и могут содержать короткие α -спирали. Для данной CRI специалист может определить промежуточные области путем выравнивания структур и/или последовательностей. CRI, еще не содержащуюся на фиг. 4, можно добавить в выравнивание. После выравнивания промежуточные области «b», «c», «d», «e», «f» и «g» перекрывают положения в IgLCRC с 19 по 30, положения в IgLCRC с 41 по 45, положения в IgLCRC с 53 по 62, положения в IgLCRC с 71 по 80, положения в IgLCRC с 90 по 101 и положения в IgLCRC с 109 по 127, соответственно. Каждая промежуточная область может включать делецию одной или более аминокислот при условии, что указанные семь антипараллельных бета-цепей все еще могут образовывать бета-слой. Следовательно,

промежуточные области могут содержать меньше или больше аминокислот, чем предполагается по положениям в IgLCRC данной промежуточной области. N- и С-концевая аминокислота промежуточной области и, следовательно, ее длина определяется N- и С-концевой аминокислотой складчатых бета-слоев иммуноглобулина человека или подобных иммуноглобулину человека белков согласно настоящему изобретению. Соответственно, промежуточная область «b» может иметь длину от 5 до 12, в частности, от 6 до 11, в частности, от 7 до 10 и, в частности, от 8 до 9 аминокислот, промежуточная область «c» может иметь длину от 1 до 5, в частности, от 2 до 4 и, в частности, 3 аминокислоты, промежуточная область «d» может иметь длину от 1 до 10, в частности, от 3 до 8 и, в частности, от 4 до 6 аминокислот, промежуточная область «e» может иметь длину от 1 до 10, в частности, от 2 до 8 и, в частности, от 4 до 6 аминокислот, промежуточная область «f» может иметь длину от 1 до 12, в частности, от 3 до 10 и, в частности, от 5 до 8 аминокислот, и промежуточная область «g» может иметь длину от 4 до 19, в частности, от 5 до 15 и, в частности, от 7 до 11 аминокислот. Выше отмечено, что промежуточные области некоторого иммуноглобулина человека или подобного иммуноглобулину человека белка могут быть длиннее, чем обычные длины, указанные выше. Если промежуточная область содержит больше аминокислот, чем положений в IgLCRC для данных промежуточных областей, например, промежуточная область «b» конкретного иммуноглобулина человека или подобного иммуноглобулину человека белка может иметь длину 15 аминокислот, тогда как промежуточная область «b» перекрывает только положения с 19 по 30 в IgLCRC. В таком случае аминокислоты промежуточных областей выравнивают, и лишним аминокислотам, которые хорошо не выравниваются, присваивают положение IgLCRC с дополнительным обозначением «a», «b» и т.д. Таким образом, промежуточная область «b» из 15 аминокислот может перекрывать следующие положения IgLCRC, обозначенные: 19, 19a, 19b, 19c и с 20 по 30.

Термин «N-концевая область a» и «С-концевая область h», соответственно, относятся к менее структурированной части на соответствующих концах CRI и HRI и HRII, полученных из нее. N-концевая область a может перекрывать положения в IgLCRC с 1 до 12 (см. фиг. 4). В частности, длина может составлять от 4 до 12 аминокислот, в частности, от 5 до 10, в частности, от 6 до 8 аминокислот. С-концевая область h может перекрывать положения в IgLCRC от 134 до 144 (см. фиг. 4). В частности, длина может составлять от 4 до 11 аминокислот, в частности, от 5 до 10, в частности, от 6 до 8 аминокислот.

Термин «фрагмент», используемый в данной заявке, относится к встречающимся в природе фрагментам (например, вариантам сплайсинга), а также искусственно сконструированным фрагментам, в частности, к фрагментам, полученным с помощью генетических технологических средств. Обычно, фрагмент содержит делецию до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290 или 300 аминокислот на N-конце, и/или на C-конце, и/или внутри, по сравнению с исходным полипептидом, предпочтительно на N-конце, на N- и C-конце или на C-конце.

«Эпитоп», также известный как антигенная детерминанта, представляет собой фрагмент макромолекулы, который распознается иммунной системой, в частности, антителами, В-клетками или Т-клетками. Такой эпитоп представляет собой ту часть или фрагмент макромолекулы, способный связываться с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В данном контексте термин «связывание» предпочтительно относится к специфическому связыванию. В контексте настоящего изобретения предпочтительно, чтобы термин «эпитоп» относился к фрагменту белка или полибелка, который распознается иммунной системой. Эпитопы обычно состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи сахаров и обычно обладают определенными свойствами трехмерной структуры, а также определенным зарядом. Конформационные и неконформационные эпитопы отличаются тем, что связывание с первым из упомянутых, но не с последним утрачивается в присутствии денатурирующих растворителей.

В данной заявке «конформационный эпитоп» относится к эпитопу линейной макромолекулы (например, полипептида), который образован трехмерной структурой указанной макромолекулы. В контексте настоящей заявки «конформационный эпитоп» представляет собой «прерывающийся эпитоп», т.е., конформационный эпитоп на макромолекуле (например, полипептиде), который образован из по меньшей мере двух отдельных участков в первичной последовательности макромолекулы (например, последовательности аминокислот полипептида). Другими словами, эпитоп считают «конформационным эпитопом» в контексте настоящего изобретения, если указанный эпитоп состоит из по меньшей мере двух отдельных участков в первичной последовательности, с которыми связывающая молекула согласно настоящему изобретению (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) связывается одновременно, причем данные по меньшей мере два отдельных участка прерываются еще

одним участком в первичной последовательности, с которым связывающая молекула согласно настоящему изобретению не связывается. В частности, такой «конформационный эпитоп» присутствует на полипептиде, и два отдельных участка в первичной последовательности представляют собой две отдельные последовательности аминокислот, с которыми связывающая молекула согласно настоящему изобретению (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) связывается, причем данные по меньшей мере две отдельные последовательности аминокислот прерываются еще одной последовательностью аминокислот в первичной последовательности, с которой связывающая молекула согласно настоящему изобретению не связывается. В частности, прерывающая последовательность аминокислот представляет собой непрерывную последовательность аминокислот, содержащую две или более аминокислот, с которыми связывающая молекула не связывается. Указанные по меньшей мере две отдельные последовательности аминокислот, с которыми связывающая молекула согласно настоящему изобретению связывается, особо не ограничены в отношении их длины. Такая отдельная последовательность аминокислот может состоять из лишь одной аминокислоты при условии, что общее количество аминокислот в указанных по меньшей мере двух отдельных последовательностях аминокислот достаточно большое, чтобы осуществилось специфическое связывание между связывающей молекулой и конформационным эпитопом.

«Паратоп» представляет собой часть антитела, которая распознает эпитоп. В контексте настоящего изобретения «паратоп» представляет собой часть связывающей молекулы (например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента), описанной в данной заявке, которая распознает эпитоп.

«Пептидный линкер» в контексте настоящего изобретения относится к последовательности аминокислот, которая стерически разделяет две части или молекулы комплекса, например, два пептида или белка. Обычно такой линкер состоит из от 1 до 100 аминокислот, и его минимальная длина составляет по меньшей мере 1, 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 и максимальная длина составляет по меньшей мере 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16 или 15 аминокислот или менее. Указанные предпочтительные минимальные и максимальные длины пептидного линкера согласно настоящему изобретению можно комбинировать, если такая комбинация имеет математический смысл, например, такой линкер может состоять

из 1 - 15, или 12 - 40, или 25 - 75, или 1 - 100 аминокислот. Пептидные линкеры также могут придать гибкость между двумя молекулами, которые связаны друг с другом. Такая гибкость, как правило, повышается, если аминокислоты малого размера. Соответственно, в гибких пептидных линкерах повышено содержание аминокислот малого размера, в частности, глицина и/или аланина, и/или гидрофильных аминокислот, таких как серин, треонин, аспарагин и глутамин. Предпочтительно, более чем 20%, 30%, 40%, 50%, 60% или более аминокислот пептидного линкера представляют собой аминокислоты малого размера.

В данной заявке термин «вариант» следует понимать как полипептид или полинуклеотид, который отличается от полипептида или полинуклеотида, из которого он получен, одним или более изменениями в длине или последовательности. Полипептид или полинуклеотид, из которого получен вариант полипептида или полинуклеотида, также известен как исходный полипептид или полинуклеотид. Термин «вариант» включает «фрагменты» или «производные» исходной молекулы. Обычно «фрагменты» меньше длиной или размером, чем исходная молекула, тогда как у «производных» есть одно или более различий в последовательности по сравнению с исходной молекулой. Также в объем данного термина входят модифицированные молекулы, такие как, но не ограниченные пост-трансляционно модифицированными белками (например, гликозилированными, биотинилированными, фосфорилированными, убиквитинированными, пальмитоилированными или протеолитически расщепленными белками) и модифицированными нуклеиновыми кислотами, такими как метилированная ДНК. Также в объем термина «вариант» входят смеси различных молекул, такие как, но не ограниченные РНК-ДНК гибридами. Обычно вариант конструируют искусственно, предпочтительно с помощью генетических технологических средств, тогда как исходный белок или полинуклеотид представляет собой белок или полинуклеотид дикого типа или его консенсусную последовательность. Тем не менее, следует понимать, что в объем термина «вариант» в данной заявке также входят встречающиеся в природе варианты. Кроме того, варианты, пригодные в настоящем изобретении, также можно получить из гомологов, ортологов или паралогов исходной молекулы или из искусственно сконструированного варианта при условии, что данный вариант проявляет по меньшей мере одну биологическую активность исходной молекулы, т.е., функционально активен. В частности, термин «вариант пептида», «вариант полипептида», «вариант белка» следует понимать как пептид, полипептид или белок, который отличается от пептида, полипептида

или белка, из которого он получен, одним или более изменениями в последовательности аминокислот. Пептид, полипептид или белок, из которого получен вариант пептида, полипептида или белка, также известен как исходный пептид, полипептид или белок. Кроме того, варианты, пригодные в настоящем изобретении, также можно получить из гомологов, ортологов или паралогов исходного пептида, полипептида или белка или из искусственно сконструированного варианта при условии, что данный вариант проявляет по меньшей мере одну биологическую активность исходного пептида, полипептида или белка. Изменения в последовательности аминокислот могут представлять собой аминокислотные обмены, вставки, делеции, N-концевые укорачивания или C-концевые укорачивания, или любую комбинацию данных изменений, которые могут происходить в одном или нескольких сайтах.

«Процент идентичности последовательностей» определяют путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей на протяжении окна сравнения, причем часть последовательности в окне сравнения может содержать вставки или делеции (т.е., гэпы) по сравнению с эталонной последовательностью (которая не содержит вставки или делеции) для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процент рассчитывают путем определения количества положений, в которых идентичное основание нуклеиновой кислоты или аминокислотный остаток встречается в обеих последовательностях, с получением количества совпадающих положений, деления количества совпадающих положений на общее количество положений в окне сравнения и умножения результата на 100 с получением процента идентичности последовательностей.

Термин «идентичный» в контексте двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидов, относится к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые одинаковы, т.е., содержат одинаковые последовательности нуклеотидов или аминокислот. Последовательности являются «по существу идентичными» друг другу, если они содержат определенный процент нуклеотидов или аминокислотных остатков, которые одинаковы (например, идентичность на определенном участке составляет по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере

99%), при сравнении и выравнивании для максимального соответствия в окне сравнения или на определенном участке, что измеряют, применяя один из следующих алгоритмов сравнения последовательностей или путем выравнивания вручную и визуального анализа. Данные определения также относятся к комплементу тестируемой последовательности. Соответственно, термин «по меньшей мере 80% идентичности последовательностей» используют по всему тексту настоящего описания в отношении сравнения полипептидных и полинуклеотидных последовательностей. Данное выражение предпочтительно относится к идентичности последовательности по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, или по меньшей мере на 99% с соответствующим эталонным полипептидом или соответствующим эталонным полинуклеотидом.

Термин «сравнение последовательностей» относится к процессу, в котором одна последовательность выступает в роли эталонной последовательности, с которой сравнивают тестируемые последовательности. При применении алгоритма сравнения последовательностей, тестируемую и эталонную последовательности вводят в компьютер, при необходимости указывают координаты подпоследовательностей и устанавливают параметры программы алгоритма сравнения последовательностей. Обычно используют параметры программы по умолчанию, или можно установить альтернативные параметры. Алгоритм сравнения последовательностей затем рассчитывает процент идентичности или подобия последовательностей для тестируемых последовательностей относительно эталонной последовательности, на основе параметров программы. В случае, когда сравнивают две последовательности и эталонная последовательность, относительно которой нужно рассчитать процент идентичности последовательностей, не установлена, идентичность последовательностей будет рассчитана относительно более длинной из двух последовательностей, которые необходимо сравнить, если явно не указано иное. Если эталонная последовательность указана, то идентичность последовательностей определяют на основании всей длины эталонной последовательности, указанной в SEQ ID, если явно не указано иное.

При выравнивании последовательностей термин «окно сравнения» относится к таким участкам из соседних положений последовательности, которые сравнивают с эталонным участком из соседних положений последовательности, содержащим такое же количество положений. Количество выбранных соседних положений может находиться в диапазоне от 4 до 1000, т.е., может включать 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 или 1000 соседних положений. Обычно, количество соседних положений находится в диапазоне от приблизительно 20 до 800 соседних положений, от приблизительно 20 до 600 соседних положений, от приблизительно 50 до 400 соседних положений, от приблизительно 50 до приблизительно 200 соседних положений, от приблизительно 100 до приблизительно 150 соседних положений.

Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны в данной области. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно осуществить, например, с помощью алгоритма поиска локальной гомологии Смита-Уотермана (*Adv. Appl. Math.* 2:482, 1970), с помощью алгоритма выравнивания областей гомологии Нидлмана-Вунша (*J. Mol. Biol.* 48:443, 1970), с помощью способа поиска подобия по Пирсону-Липману (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988), с помощью компьютеризированных реализаций данных алгоритмов (например, GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Мэдисон, Висконсин), или путем выравнивания вручную и визуального анализа (см., например, Ausubel и др., *Current Protocols in Molecular Biology* (1995, приложение)). Алгоритмы, подходящие для определения процента идентичности последовательностей и подобия последовательностей, представляют собой алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описаны в Altschul и др. (*Nuc. Acids Res.* 25:3389-402, 1977) и Altschul и др. (*J. Mol. Biol.* 215:403-10, 1990), соответственно. Программное обеспечение для проведения анализа BLAST находится в общем доступе на National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Данный алгоритм включает сначала идентификацию пар последовательностей с высокой степенью сходства (HSP) путем идентификации коротких слов длины W в запрашиваемой последовательности, которые либо совпадают, либо удовлетворяют некоторому пороговому баллу с положительным значением T при выравнивании со словом такой же длины в базе данных последовательностей. T называют порогом балла сходства соседних слов (Altschul и др., выше). Данные первоначальные совпадения соседних слов используют в качестве затравки

для начала поиска с целью обнаружения более длинных HSP, содержащих их. Данные совпадения слов расширяют в обоих направлениях вдоль каждой последовательности до тех пор, пока совокупный балл выравнивания можно увеличить. Совокупные баллы рассчитывают, применяя, для последовательностей нуклеотидов, параметры M (премиальный балл за пары совпадающих остатков; всегда > 0) и N (штрафной балл за несовпадающие остатки; всегда < 0). Для последовательностей аминокислот для расчета совокупного балла используют матрицу весов выравнивания. Удлинение совпадения слов в каждом направлении останавливают, когда: совокупный балл выравнивания резко уменьшается на величину X от максимального достигнутого значения; совокупный балл падает до нуля или ниже, вследствие накопления одного или более выравниваний остатков с отрицательным баллом; или достигается конец любой из последовательностей. Параметры алгоритма BLAST W , T и X определяют точность и скорость выравнивания. В программе BLASTN (для последовательностей нуклеотидов) в качестве параметров по умолчанию используются длина слова (W), равная 11, ожидание (E), равное 10, $M = 5$, $N = -4$ и сравнение ведется по обоим цепям. Для последовательностей аминокислот в программе BLASTP в качестве параметров по умолчанию используются длина слова, равная 3, ожидание (E), равное 10, и матрица весов выравнивания BLOSUM62 (см. Henikoff и Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915, 1989), выравнивания (B), равные 50, ожидание (E), равное 10, $M = 5$, $N = -4$, и сравнение ведется по обоим цепям. Алгоритм BLAST также выполняет статистический анализ подобия между двумя последовательностями (см., например, Karlin и Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-87, 1993). Одной мерой подобия, предложенной в алгоритме BLAST, является наименьшая суммарная вероятность ($P(N)$), которая представляет собой показатель вероятности, с которой совпадение между двумя последовательностями нуклеотидов или аминокислот произойдет случайно. Например, нуклеиновую кислоту считают подобной эталонной последовательности, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении тестируемой нуклеиновой кислоты с эталонной нуклеиновой кислотой меньше, чем приблизительно 0,2, обычно меньше, чем приблизительно 0,01, и чаще меньше, чем приблизительно 0,001.

Предпочтительны полуконсервативные и, особенно, консервативные замены аминокислот, при которых аминокислоту заменяют на химически сходную аминокислоту. Обычные замены выбирают среди алифатических аминокислот, среди аминокислот, содержащих алифатическую гидроксильную боковую цепь, среди аминокислот, содержащих кислые остатки, среди амидных производных, среди аминокислот с

основными остатками, или аминокислот, содержащих ароматические остатки. Обычные полуконсервативные и консервативные замены приведены далее:

Аминокислота	Консервативная замена	Полуконсервативная замена
A	G; S; T	N; V; C
C	A; V; L	M; I; F; G
D	E; N; Q	A; S; T; K; R; H
E	D; Q; N	A; S; T; K; R; H
F	W; Y; L; M; H	I; V; A
G	A	S; N; T; D; E; N; Q
H	Y; F; K; R	L; M; A
I	V; L; M; A	F; Y; W; G
K	R; H	D; E; N; Q; S; T; A
L	M; I; V; A	F; Y; W; H; C
M	L; I; V; A	F; Y; W; C;
N	Q	D; E; S; T; A; G; K; R
P	V; I	L; A; M; W; Y; S; T; C; F
Q	N	D; E; A; S; T; L; M; K; R
R	K; H	N; Q; S; T; D; E; A
S	A; T; G; N	D; E; R; K
T	A; S; G; N; V	D; E; R; K; I
V	A; L; I	M; T; C; N
W	F; Y; H	L; M; I; V; C
Y	F; W; H	L; M; I; V; C

Замена A, F, H, I, L, M, P, V, W или Y на C является полуконсервативной, если новый цистеин остается в виде свободного тиола. Более того, для специалиста должно быть понятно, что глицины в стерически требовательных положениях не следует заменять, и что P не следует вводить в части белка, которые имеют альфа-спиральную или бета-складчатую структуру.

Метка (или маркер, или ярлык) представляет собой вещество любого типа, которое способно показывать присутствие другого вещества или комплекса веществ. Маркер может представлять собой вещество, которое связано или введено в вещество, которое

необходимо обнаружить. Детектируемые маркеры применяют в молекулярной биологии и биотехнологии для детектирования, например, белка, продукта ферментативной реакции, вторичного мессенджера, ДНК, взаимодействия молекул и т.д. Примеры подходящих меток или ярлыков включают флуорофоры, хромофоры, радиоактивные метки, коллоидные частицы металлов, ферменты или хемилюминесцентные или биолюминесцентные молекулы. В контексте настоящего изобретения подходящие метки предпочтительно представляют собой белковые метки, пептидные последовательности которых генетически привиты в или на рекомбинантный белок. Белковые метки могут, например, включать аффинные метки, метки, повышающие растворимость, хроматографические метки, эпитопные метки или флуоресцентные метки.

«Аффинные метки» присоединяют к белкам, так чтобы белок можно было очистить из его необработанного биологического источника, применяя аффинную методику. Такие метки включают связывающий хитин белок (CBP), связывающий мальтозу белок (MBP) и глутатион-S-трансферазу (GST). Метка поли(His) представляет собой широко применяемую белковую метку, которая связывается с металлическими матрицами.

«Метки, повышающие растворимость», используют, в особенности, с рекомбинантными белками, экспрессируемыми в лишенных шаперонов видах, чтобы они способствовали правильной укладке в белках и предохраняли их от преципитации. Такие метки включают тиоредоксин (TRX) и поли(NANP). Некоторые аффинные метки, такие как MBP и GST, играют двойную роль в качестве повышающего растворимость агента.

«Хроматографические метки» используют для изменения хроматографических свойств белка, чтобы получить различное разрешение в конкретной методике разделения. Часто данные метки состоят из полианионных аминокислот, таких как метка FLAG.

Термин «эпитопные метки», используемый в контексте настоящего изобретения, описывает короткие пептидные последовательности, которые выбирают, потому что с их помощью можно гарантированно получить высокоаффинные антитела во множестве различных видов. Такие метки обычно получают из генов вируса, что объясняет их высокую иммунореактивность. Эпитопные метки включают метку V5, метку Мус и метку НА. Данные метки особенно полезны в экспериментах по вестерн-блоттингу, иммунофлуоресценции и иммунопреципитации, хотя они также находят применение при очистке антител.

«Флуоресцентные метки» применяют для визуального определения белка. GFP и его варианты представляют собой наиболее часто применяемые флуоресцентные метки. Более

распространенные применения GFP включают его применение в качестве репортера укладки (флуоресцентный, если белок свернут, бесцветный – если нет). Дополнительные примеры флуорофоров включают флуоресцеин, родамин и сульфоиндоцианиновый краситель Cy5.

Термин «связывающий» согласно настоящему изобретению предпочтительно относится к специфическому связыванию. Термин «аффинность связывания» в общем смысле относится к силе совокупных нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антитела) и ее партнером по связыванию (например, мишенью или антигеном). Если не указано иное, в данной заявке «аффинность связывания» относится к свойственной аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между представителями связывающейся пары (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X по отношению к ее партнеру Y, как правило, можно описать константой диссоциации (K_D). «Специфическое связывание» означает, что связывающая молекула (например, антитело) связывается с мишенью, такой как эпитоп, к которому она специфична, сильнее, чем связывается с другой мишенью. Связывающая молекула связывается сильнее с первой мишенью, чем со второй мишенью, если она связывается с первой мишенью с константой диссоциации (K_D), которая ниже, чем константа диссоциации от второй мишени. Константа диссоциации (K_D) от мишени, с которой связывающая молекула связывается специфично, более чем в 10 раз, предпочтительно более чем в 20 раз, более предпочтительно более чем в 50 раз, еще более предпочтительно более чем в 100 раз, в 200 раз, в 500 раз или в 1000 раз ниже, чем константа диссоциации (K_D) от мишени, с которой связывающая молекула связывается не специфично.

Соответственно, подразумевают, что термин « K_D » (измеряется в «моль/л», иногда сокращается как «М») относится к равновесной константе диссоциации конкретного взаимодействия между связывающей молекулой (например, антителом или его фрагментом) и молекулой мишени (например, антигена или его эпитопа). Аффинность можно измерить с помощью обычных способов, известных в данной области, включая, но не ограничиваясь перечисленными: анализ на основе поверхностного плазмонного резонанса (такой как анализ BIAcore); анализ на основе пьезокварцевого микровзвешивания (такой как анализ Attana); твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA); и конкурентные анализы (например, радиоиммунологический анализ (RIA)). Низкоаффинные антитела, как правило, медленно связывают антиген и склонны легко диссоциироваться, тогда как высокоаффинные антитела, как правило, связывают антиген

быстрее и склонны дольше оставаться связанными. Различные способы измерения аффинности связывания известны в данной области, любой из которых можно применять для целей настоящего изобретения.

Обычно, антитела или миметики антител, содержащиеся в цепи аминокислот I и/или II, связываются с достаточной аффинностью связывания со своей мишенью, например, со значением K_D между 500 нМ - 1 пМ, т.е., 500 нМ, 450 нМ, 400 нМ, 350 нМ, 300 нМ, 250 нМ, 200 нМ, 150 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 10 нМ, 1 нМ, 900 пМ, 800 пМ, 700 пМ, 600 пМ, 500 пМ, 400 пМ, 300 пМ, 200 пМ, 100 пМ, 50 пМ, 1 пМ.

Термин «иммуноглобулин (Ig)» в данной заявке относится к придающим иммунитет гликопротеинам из суперсемейства иммуноглобулинов. «Поверхностные иммуноглобулины» присоединены к мембране, например, эффекторных клеток или эндотелиальных клеток, своим трансмембранным участком и включают молекулы, такие как, но не ограниченные перечисленными: новорожденный Fc-рецептор, В-клеточные рецепторы, Т-клеточные рецепторы, белки главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) I и II класса, бета-2 микроглобулин ($\beta 2M$), CD3, CD4 и CD8.

Как правило, термин «антитело» в данной заявке относится к секретируемым иммуноглобулинам, у которых отсутствует трансмембранный участок, и, следовательно, они могут высвобождаться в кровоток и полости организма. Антитела человека сгруппированы в различные изотипы на основании тяжелой цепи, которую они содержат. Существует пять типов тяжелых цепей Ig человека, обозначаемых греческими буквами: α , γ , δ , ϵ и μ . Тип присутствующей тяжелой цепи определяет класс антитела, т.е., данные цепи находятся в антителах IgA, IgD, IgE, IgG, и IgM, соответственно, каждое из которых выполняет различные роли и нацеливает подходящий иммунный ответ на различные типы антигенов. Различные тяжелые цепи отличаются по размеру и составу; и могут содержать приблизительно 450 аминокислот (Janeway и др. (2001) *Immunobiology*, Garland Science). IgA находится в областях слизистой, таких как кишечник, дыхательные пути и мочеполовые пути, а также в слюне, слезах и грудном молоке и предотвращает колонизацию патогенами (Underdown & Schiff (1986) *Annu. Rev. Immunol.* 4:389-417). IgD преимущественно действует как рецептор антигенов на В-клетках, которые не были подвергнуты воздействию антигенов, и участвует в активации базофилов и тучных клеток для продукции противомикробных факторов (Geisberger и др. (2006) *Immunology* 118:429-437; Chen и др. (2009) *Nat. Immunol.* 10:889-898). IgE участвует в аллергических реакциях посредством связывания с аллергенами, запуская высвобождение гистамина из тучных

клеток и базофилов. IgE также участвует в защите от паразитирующих червей (Pier и др. (2004) Immunology, Infection, and Immunity, ASM Press). IgG обеспечивает большую часть основанного на антителах иммунитета против инвазивных патогенов и является единственным изотипом антител, способным проходить через плаценту, чтобы передать пассивный иммунитет зародышу (Pier и др. (2004) Immunology, Infection, and Immunity, ASM Press). У людей существует четыре различных подкласса IgG (IgG1, 2, 3 и 4), названных в порядке их относительного содержания в сыворотке, при этом наиболее распространен IgG1 (~66%), затем IgG2 (~23%), IgG3 (~7%) и IgG (~4%). Биологический профиль различных классов IgG определяют по структуре соответствующей шарнирной области. IgM экспрессируется на поверхности В-клеток в мономерной форме и в секретируемой пентамерной форме с очень высокой авидностью. IgM участвует в устранении патогенов на ранних стадиях опосредованного В-клетками (гуморального) иммунитета, перед тем как продуцируется достаточное количество IgG (Geisberger и др. (2006) Immunology 118:429-437). Антитела находятся не только в виде мономеров, но также известно, что они образуют димеры из двух единиц Ig (например, IgA), тетрамеры из четырех единиц Ig (например, IgM костистой рыбы), или пентамеры из пяти единиц Ig (например, IgM млекопитающих). Антитела обычно состоят из четырех полипептидных цепей, включающих две идентичные тяжелые цепи и две идентичные легкие цепи, которые соединены дисульфидными связями и похожи на макромолекулу в форме «Y». Каждая из цепей содержит множество доменов иммуноглобулинов, из которых некоторые представляют собой константные домены, а другие представляют собой переменные домены. Домены иммуноглобулина состоят из 2-слойной структуры из от 7 до 9 антипараллельных β -цепей, расположенных в виде двух β -слоев. Обычно, тяжелая цепь антитела содержит четыре домена Ig, при этом три из них представляют собой константные домены (домены CH: CH1, CH2, CH3) и один из них представляет собой переменный домен (VH). Легкая цепь обычно содержит один константный домен Ig (CL) и один переменный домен Ig (VL). Области VH и VL можно дополнительно подразделить на области гиперпеременности, названные определяющими комплементарность областями (гиперпеременными участками, CDR), перемежающиеся областями, которые более консервативны, названными каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Переменные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные

области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяев, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

Термин «консенсус Ig-подобной константной области (IgLCRC)» описывает нумерацию, полученную в результате выравнивания иммуноглобулина человека или подобных иммуноглобулину человека белков, как указано на фиг. 4. Специалист знает, как добавлять дополнительные иммуноглобулины человека или подобные иммуноглобулину человека белки к данному выравниванию, используя идентичность последовательностей и/или информацию о структуре. Таким образом, специалист может определить для каждой аминокислоты данного иммуноглобулина человека или подобного иммуноглобулину человека белка соответствующий номер в IgLCRC. Например, шесть промежуточных областей «b», «c», «d», «e», «f» и «g» CH3 из IgG1 перекрывают IgLCRC с 19 по 30 (не включая аминокислоту в положениях 26 и 28 в IgLCRC), IgLCRC с 41 по 45 (не включая аминокислоту в положении 43 в IgLCRC), IgLCRC с 53 по 62 (не включая аминокислоты в положениях с 59 по 61 в IgLCRC), перекрывают положения в IgLCRC с 71 по 80 (не включая аминокислоту в положениях с 72 по 76 в IgLCRC), IgLCRC с 90 по 101 (не включая аминокислоты в положениях 98 и 99 IgLCRC), и IgLCRC с 109 по 127 (не включая аминокислоты в положениях с 112 по 124 в IgLCRC). В CH3 из IgG1 отсутствуют аминокислоты в некоторых положениях в IgLCRC. Это является следствием более высокой вариабельности в данных менее структурированных областях иммуноглобулина человека или подобных иммуноглобулину человека белков, которые допускают делеции и вставки аминокислота без изменения общей структуры иммуноглобулина человека или подобного иммуноглобулину человека белка. Аналогично, указанные семь бета-цепей «A», «B», «C», «D», «E», «F» и «G» CH3 из IgG1 перекрывают положения в IgLCRC с 13 по 18, с 31 по 40, с 46 по 52, с 63 по 70, с 81 по 89, с 102 по 108 и с 128 по 133. Более того, N-концевая область «a» CH3 из IgG1 перекрывает IgLCRC с 7 по 12 и C-концевая область «h» перекрывает IgLCRC с 134 по 139. Аналогичным образом специалист также может определить для каждого данного иммуноглобулина человека или подобного иммуноглобулину человека белка N-конец и C-конец, соответственно, каждого элемента внутри данного иммуноглобулина человека или подобного иммуноглобулину человека белка. Количество гэпов в последовательности аминокислот данного выровненного иммуноглобулина человека или подобного иммуноглобулину человека белка может изменяться. Тем не менее, бета-цепь A перекрывает положения в IgLCRC с 13 по 18, бета-цепь B перекрывает

положения в IgLCRC с 31 по 40, бета-цепь С перекрывает положения в IgLCRC с 46 по 52, бета-цепь D перекрывает положения в IgLCRC с 63 по 70, бета-цепь E перекрывает положения в IgLCRC с 81 по 89, бета-цепь F перекрывает положения в IgLCRC с 102 по 108, бета-цепь G перекрывает положения в IgLCRC с 128 по 133, и промежуточная область b перекрывает положения в IgLCRC с 19 по 30, промежуточная область c перекрывает положения в IgLCRC с 41 по 45, промежуточная область d перекрывает положения в IgLCRC с 53 по 62, промежуточная область e перекрывает положения в IgLCRC с 71 по 80, промежуточная область f перекрывает положения в IgLCRC с 90 по 101 и промежуточная область g перекрывает положения в IgLCRC с 109 по 127 СНЗ. N-концевая область перекрывает положения в IgLCRC с 1 по 12 и C-концевая область h перекрывает положения в IgLCRC с 134 по C-конец соответствующего иммуноглобулина человека или подобного иммуноглобулина человека белка.

В случае последовательностей аминокислот, не включенных в фиг. 4, которые могут содержать одну или более промежуточных областей длины, которая превышает длину описанных в данной заявке промежуточных областей b (22 остатка), c (5 остатков), d (10 остатков), e (12 остатков), f (19 остатков), или которые содержат N-концевую область длины, которая превышает длину описанной в данной заявке N-концевой области a (12 остатков), то можно ввести дополнительные остатки в схему нумерации IgLCRC после положения 6 путем обозначения дополнительных остатков 6a, 6b, 6c и т.д., или после положения 25 путем обозначения дополнительных остатков 25a, 25b, 25c и т.д., или после положения 42 путем обозначения дополнительных остатков 42a, 42b, 42c и т.д., или после положения 58 путем обозначения дополнительных остатков 58a, 58b, 58c и т.д., или после положения 71 путем обозначения дополнительных остатков 71a, 71b, 71c и т.д., или после положения 91 путем обозначения дополнительных остатков 91a, 91b, 91c и т.д., или после положения 111 путем обозначения дополнительных остатков 111a, 111b, 111c и т.д. Более того, поскольку соответствующая последовательность аминокислот данного иммуноглобулина человека или подобного иммуноглобулина человека белка не обязательно начинается в положении 1 IgLCRC и может также содержать гэпы при выравнивании, указанном на фиг. 4, положение в IgLCRC не отражает напрямую положение аминокислоты внутри последовательностей, содержащихся в перечне последовательностей. Например, последовательность аминокислот предпочтительного СНЗ в IgG1 указана в SEQ ID NO: 45. N-концевая область перекрывает положения в IgLCRC с 7 по 12, которые соответствуют аминокислотам с 1 по 6 в последовательности SEQ ID

NO: 45, бета-цепи «А», «В», «С», «D», «Е», «F» и «G» CH3 из IgG1 перекрывают положения в IgLCRC с 13 по 18, с 31 по 40, с 46 по 52, с 63 по 70, с 81 по 89, с 102 по 108 и с 128 по 133, которые соответствуют в указанном порядке аминокислотам с 7 по 12, с 23 по 32, с 37 по 43, с 51 по 58, с 64 по 72, с 83 по 88, с 95 по 100 в последовательности SEQ ID NO: 45. С-концевая область перекрывает аминокислоты с 101 по 107. Пять промежуточных областей «b», «c», «d», «e», «f» и «g» CH3 из IgG1 перекрывают 1 IgLCRC в положениях с 19 по 30, с 41 по 45, с 53 по 62, с 71 по 80, с 90 по 101 и с 109 по 127, которые соответствуют в указанном порядке аминокислотам с 13 по 22, с 33 по 36, с 44 по 50, с 53 по 63, с 59 по 63, с 73 по 82 и с 89 по 94 в последовательности SEQ ID NO: 45. Учитывая данные аспекты, специалист сможет определить каждый элемент первой, второй, третьей и четвертой CRI без лишнего труда. После определения указанных элементов и выравнивания последовательностей первой и второй CRI с одной стороны и третьей и четвертой CRI с другой стороны, у специалиста также не вызовет затруднений следовать инструкциям, приведенным ниже, и заменить аминокислоты в первой и третьей CRI на аминокислоты из третьей и четвертой CRI, соответственно.

Термин «антигенсвязывающий белок» в данной заявке относится к молекулам иммуноглобулинов и иммунологически активным частям молекул иммуноглобулинов, т.е., к молекулам, которые содержат антигенсвязывающую область, которая иммуноспецифически связывает антиген. Также в объем данного термина входят подобные иммуноглобулинам белки, которые проходят селекцию с помощью методик, включающих, например, фаговый дисплей, на специфическое связывание с целевой молекулой или целевым эпитопом. При оценке связывания и/или специфичности антигенсвязывающего белка, например, антитела или иммунологически функционального его фрагмента, антитело или фрагмент может существенно ингибировать связывание лиганда с его партнером по связыванию, когда избыток антитела уменьшает количество партнера по связыванию, связанного с лигандом, по меньшей мере приблизительно на 1 - 20%, 20 - 30%, 30 - 40%, 40 - 50%, 50 - 60%, 60 - 70%, 70 - 80%, 80 - 85%, 85 - 90%, 90 - 95%, 95 - 97%, 97 - 98%, 98 - 99% или более (например, что измеряют в конкурентном анализе связывания *in vitro*). Нейтрализующую способность можно описать с помощью значения IC₅₀ или EC₅₀.

Значение «IC₅₀» относится к полумаксимальной ингибиторной концентрации вещества, и, следовательно, является мерой эффективности вещества в отношении ингибирования определенной биологической или биохимической функции. Указанные значения обычно выражают в молярной концентрации. IC₅₀ лекарственного средства можно

определить в функциональном антагонистическом анализе путем построения кривой зависимости доза-эффект и изучения ингибиторного действия исследуемого вещества при различных концентрациях. В качестве альтернативы, можно провести конкурентный анализ связывания, чтобы определить значение IC_{50} . Обычно, ингибиторные антитела согласно настоящему изобретению проявляют значение IC_{50} от 50 нМ до 1 пМ, т.е., 50 нМ, 10 нМ, 1 нМ, 900 пМ, 800 пМ, 700 пМ, 600 пМ, 500 пМ, 400 пМ, 300 пМ, 200 пМ, 100 пМ, 50 пМ, 1 пМ.

Значение « EC_{50} » относится к полумаксимальной эффективной концентрации вещества и, следовательно, является мерой концентрации указанного вещества, которая вызывает половину ответа между фоновым и максимальным после определенного времени воздействия. Его часто используют в качестве меры эффективности лекарственного средства. EC_{50} кривой количественной зависимости от дозы, следовательно, представляет собой концентрацию вещества, при которой наблюдается 50% максимального эффекта. EC_{50} кривой зависимости результата от дозы представляет собой концентрацию соединения, при которой 50% популяции проявляет ответ после определенной продолжительности воздействия. Обычно, ингибиторные антитела согласно настоящему изобретению проявляют значение EC_{50} от 50 нМ до 1 пМ, т.е., 50 нМ, 10 нМ, 1 нМ, 900 пМ, 800 пМ, 700 пМ, 600 пМ, 500 пМ, 400 пМ, 300 пМ, 200 пМ, 100 пМ, 50 пМ, или 1 пМ.

Термин «антигенсвязывающий фрагмент» антитела (или просто «связывающая часть») в данной заявке относится к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфично связываться с антигеном. Было показано, что антигенсвязывающую функцию антитела могут осуществить фрагменты полноразмерного антитела.

В данной заявке «антитела человека» включают антитела, содержащие переменные и константные области, полученные из зародышевых последовательностей иммуноглобулинов человека. Антитела человека согласно настоящему изобретению могут содержать аминокислотные остатки, не кодируемые зародышевыми последовательностями иммуноглобулинов человека (например, мутации, введенные путем неспецифического или сайт-направленного мутагенеза *in vitro* или путем соматической мутации *in vivo*). Антитела человека согласно настоящему изобретению включают антитела, выделенные из библиотек иммуноглобулинов человека или из животных, которые трансгенны по одному или более иммуноглобулинам человека и которые не экспрессируют эндогенные иммуноглобулины, как описано, например, в патенте США № 5,939,598 у Kucherlapati и Jakobovits.

Термин «моноклональное антитело» в данной заявке относится к получению молекул антител одинакового молекулярного состава. Моноклональное антитело проявляет одну специфичность и аффинность связывания с конкретным эпитопом. В одном варианте реализации моноклональные антитела продуцируются гибридомой, которая включает В-клетку, полученную из не относящегося к человеку животного, например, мыши, слитую с immortalized клеткой.

Термин «рекомбинантное антитело» в данной заявке включает все антитела, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены с помощью рекомбинантных средств, такие как (a) антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое трансгенно или трансхромосомно по отношению к генам иммуноглобулинов или гибридоме, полученной из него, (b) антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии антитела, например, из трансфектомы, (c) антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки антител, и (d) антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные с помощью любых других средств, которые включают сплайсинг последовательностей генов иммуноглобулинов с получением других последовательностей ДНК.

Термин «химерное антитело» относится к таким антителам, в которых одна часть каждой из последовательностей аминокислот тяжелой и легкой цепей гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных из определенных видов или относящихся к определенному классу, тогда как оставшийся фрагмент цепи гомологичен соответствующим последовательностям другого вида или класса. Обычно переменная область как легкой, так и тяжелой цепей имитирует переменные области антител, полученных из одного вида млекопитающих, тогда как константные части гомологичны последовательностям антител, полученным из другого вида. Одно явное преимущество таких химерных форм состоит в том, что переменную область можно удобным образом получить из известных на сегодняшний день источников, применяя легко доступные В-клетки или гибридомы из не относящихся к человеку организмов-хозяев в комбинации с константными областями, полученными, например, из препаратов клеток человека. Тогда как переменная область обладает преимуществом простоты получения, и источник не влияет на ее специфичность, человеческая константная область менее вероятно вызовет иммунный ответ у субъекта-человека при введении путем инъекции указанных антител, чем вызовет константная область из не относящегося к человеку источника. Тем не менее, данное определение не ограничено данным конкретным примером.

Термин «гуманизированное антитело» относится к молекуле, содержащей сайт связывания антигена, который по существу получен из иммуноглобулина из не относящегося к человеку вида, при этом оставшаяся структура молекулы иммуноглобулина основана на структуре и/или последовательности иммуноглобулина человека. Сайт связывания антигена может содержать либо полноразмерные переменные домены, слитые с константными доменами, либо только определяющие комплементарность области (CDR), привитые на подходящие каркасные области в переменных доменах. Антигенсвязывающие области могут быть дикого типа или могут быть модифицированы одной или более заменами аминокислот, например, модифицированы, чтобы больше походить на иммуноглобулины человека. В некоторых формах гуманизированных антител сохранены все последовательности CDR (например, гуманизированное антитело мыши, которое содержит все шесть CDR из антитела мыши). Другие формы содержат одну или более CDR, которые изменены по сравнению с таковыми в исходном антителе.

Различные способы гуманизирования антител известны квалифицированному специалисту, и их обзор приведен в Almagro и Fransson, 2008, содержание которого полностью включено в данную заявку посредством ссылки. В обзорной статье Almagro и Fransson вкратце описано следующее. Almagro и Fransson описывают различие между рациональными подходами и эмпирическими подходами. Для рациональных подходов характерно получение нескольких вариантов сконструированного антитела и оценка их связывания или любого другого интересующего свойства. Если разработанные варианты не воспроизводят ожидаемые результаты, то начинают новый цикл разработки и оценки связывания. Рациональные подходы включают прививку CDR, изменение поверхности, супергуманизирование и оптимизацию содержания участков последовательности человека. Напротив, эмпирические подходы основаны на получении больших библиотек гуманизированных вариантов и селекции лучших клонов с применением технологий обогащения или высокопроизводительного скрининга. Соответственно, эмпирические подходы зависят от надежной системы селекции и/или скрининга, которая способна вести поиск в огромном пространстве вариантов антител. Технологии дисплея *in vitro*, такие как фаговый дисплей и рибосомный дисплей, удовлетворяют данным требованиям и хорошо известны квалифицированному специалисту. Эмпирические подходы включают библиотеки FR, управляемую селекцию, перетасовку остовов и гуманиринг.

«Бивалентное антитело» содержит два сайта связывания антигена. Бивалентные антитела могут быть моноспецифическими или биспецифическими. В случае, когда

бивалентное антитело моноспецифическое, два сайта связывания антитела имеют одинаковые специфичности к антигену. «Биспецифический» или «бифункциональный» антигенсвязывающий белок или антитело представляет собой гибридный антигенсвязывающий белок или антитело, соответственно, содержащий два различных сайта связывания антигена. Указанные два сайта связывания биспецифического антигенсвязывающего белка или антитела связываются с двумя различными эпитопами, находящимися либо на одном, либо на различных антигенах. Биспецифические антигенсвязывающие белки и антитела представляют собой вид мультиспецифического антигенсвязывающего белка антитела, и их можно получить с помощью различных способов, включая, но не ограничиваясь перечисленными: слияние гибридом, химическое связывание IgG или фрагментов IgG, таких как Fab', или генетические способы. См., например, Songsivilai и Lachmann, 1990, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321; Kostelny и др., 1992, J. Immunol. 148:1547-1553; Kontermann, 2014, MAbs 4:182-197.

«Трифункциональное антитело» представляет собой тип биспецифического антитела, которое содержит два сайта связывания, нацеленных на различные антигены, а также интактную Fc-часть, которая может связываться с Fc-рецептором на антиген-представляющих клетках (например, моноцитах/макрофагах, естественных клетках-киллерах, дендритных клетках или других клетках). Например, трифункциональное антитело может содержать сайт связывания, нацеленный на эпитоп на поверхности раковой клетки, второй сайт связывания может быть нацелен на эпитоп на поверхности Т-клетки (например, CD3) и Fc-часть может связываться с Fc-рецептором на поверхности макрофага. Такое трифункциональное антитело, таким образом, способно связывать Т-клетки и макрофаги с опухолевыми клетками, приводя к их разрушению.

Расщепление папаином антител приводит к получению двух идентичных антигенсвязывающих фрагментов, называемых «Fab-фрагментами» (которые также называют «Fab-частью» или «Fab-областью»), каждый с одним сайтом связывания антигена, и «Fc-фрагмента» (который также называют «Fc-частью» или «Fc-областью»), название которой отражает ее способность легко кристаллизоваться. Кристаллическая структура Fc-области IgG человека была определена (Deisenhofer (1981) Biochemistry 20:2361-2370). В изотипах IgG, IgA и IgD Fc-область состоит из двух идентичных фрагментов белка, полученных из доменов CH2 и CH3 двух тяжелых цепей антитела; в изотипах IgM и IgE Fc-области содержат три константных домена тяжелой цепи (CH2-4) в каждой полипептидной цепи. Кроме того, меньшие молекулы иммуноглобулинов

существуют в природе или были сконструированы искусственно. Термин «Fab'-фрагмент» относится к фрагменту Fab, дополнительно содержащему шарнирную область молекулы Ig, тогда как под «F(ab')₂-фрагментами» понимают фрагменты, содержащие два Fab'-фрагмента, которые либо связаны химической связью, либо соединены посредством дисульфидной связи. Тогда как «однодоменные антитела (sdAb)» (Desmyter и др. (1996) *Nat. Structure Biol.* 3:803-811) и «нанотела» содержат только один домен VH, «одноцепочечные Fv (scFv)»-фрагменты содержат переменный домен тяжелой цепи, соединенный посредством короткого линкерного пептида с переменным доменом легкой цепи (Huston и др. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5879-5883). Двухвалентные одноцепочечные переменные фрагменты (di-scFv) можно сконструировать путем соединения двух scFv (scFvA-scFvB). Это можно осуществить путем получения одной пептидной цепи с двумя областями VH и двумя областями VL, получая «тандемные scFv» (VHA-VLA-VHB-VLB). Другой возможностью является создание scFv с линкерами, которые слишком коротки, чтобы две переменные области могли соединиться друг с другом, вынуждая scFv димеризоваться. Обычно для получения данных димеров применяют линкеры длиной 5 остатков. Данный тип антител известен как «диатела». Еще более короткие линкеры (из одной или двух аминокислот) между доменами VH и VL приводят к образованию моноспецифических тримеров, так называемых «триател» или «трител». Биспецифические диатела образуются в результате экспрессии двух цепей с расположением VHA-VLB и VHB-VLA или VLA-VHB и VLB-VHA, соответственно. Одноцепочечные диатела (scDb) содержат фрагменты VHA-VLB и VHB-VLA, которые связаны линкерным пептидом (P) из 12 - 20 аминокислот, предпочтительно из 14 аминокислот, (VHA-VLB-P-VHB-VLA). «Привлекающие Т-клетки биспецифические активаторы (BiTE)» представляют собой слитые белки, состоящие из двух scFv из различных антител, причем один из scFv связывается с Т-клетками через рецептор CD3, а другой - с опухолевой клеткой посредством специфичной для опухоли молекулы (Kufner и др. (2004) *Trends Biotechnol.* 22:238-244). Переориентирующиеся антитела с двойной аффинностью (молекулы «DART») представляют собой диатела, дополнительно стабилизированные посредством С-концевого дисульфидного мостика.

В данной заявке термин «подобный антителу белок» или подобный иммуноглобулину белок относится к белку, который был сконструирован (например, путем мутагенеза петель) для специфичного связывания с целевой молекулой. Обычно, такой подобный антителу белок содержит по меньшей мере одну переменную пептидную

петлю, присоединенную обоими концами к белковому остову. Данное двойное структурное ограничение сильно повышает аффинность связывания подобного антителу белка до уровней, сравнимых с таковыми для антитела. Длина вариабельной пептидной петли обычно состоит из от 10 до 20 аминокислот. Каркасный белок может представлять собой любой белок, обладающий хорошими свойствами растворимости. Предпочтительно, каркасный белок представляет собой малый глобулярный белок. Подобные антителам белки включают, без ограничения, аффитела, антикарины, и разработанные белки с анкириновыми повторами (обзор см. в: Binz H.K. и др. (2005) Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains. *Nat. Biotechnol.* 23(10):1257-1268). Подобные антителам белки можно получить из больших библиотек мутантов, например, провести пэннинг из больших библиотек фагового дисплея и можно выделить по аналогии с обычными антителами. Также, подобные антителам связывающие белки можно получить путем комбинаторного мутагенеза выставленных на поверхность остатков в глобулярных белках. Подобные антителам белки иногда называют «пептидными аптамерами».

В данной заявке «пептидомиметик» представляет собой малую подобную белку цепь, разработанную таким образом, чтобы она имитировала пептид. Пептидомиметики обычно образуются в результате модификации существующего пептида, чтобы изменить свойства молекулы. Например, они могут образоваться в результате модификаций для изменения стабильности или биологической активности молекулы. Они могут играть роль в разработке подобных лекарственным средствам соединений из существующих пептидов. Данные модификации включают изменения в пептиде, которые не произойдут естественным путем (такие как изменение остовов и включение неприродных аминокислот).

Термин «мишень» относится к молекуле или части молекулы, которая способна связываться антигенсвязывающим белком. В некоторых вариантах реализации мишень содержит один или более эпитопов. В некоторых вариантах реализации мишень представляет собой антиген. Использование термина «антиген» в формулировке «антигенсвязывающий белок» просто означает, что белковая последовательность, которая содержит антиген, может быть связана антителом. В данном контексте не требуется, чтобы белок был чужеродным или чтобы он был способен вызывать иммунный ответ.

Термин «рекомбинантный» относится к последовательности аминокислот или последовательности нуклеотидов, которую намеренно модифицировали с помощью рекомбинантных способов. Термин «рекомбинантная нуклеиновая кислота» в данной

заявке относится к нуклеиновой кислоте, которая получена *in vitro*, и необязательно дополнительно подвергнута воздействию эндонуклеаз с получением молекулы нуклеиновой кислоты, обычно не встречающейся в природе. В качестве примера, рекомбинантные нуклеиновые кислоты включают кДНК, линейную форму, а также векторы, полученные *in vitro* путем лигирования молекул ДНК, которые обычно не соединены. Должно быть понятно, что после того, как рекомбинантная нуклеиновая кислота получена и введена в клетку-хозяина, она будет реплицироваться нерекомбинантно, т.е., с использованием клеточного аппарата *in vivo* клетки-хозяина, а не манипуляций *in vitro*. Соответственно, нуклеиновые кислоты, которые были получены рекомбинантно, могут впоследствии реплицироваться нерекомбинантно. «Рекомбинантный белок» представляет собой белок, полученный с применением рекомбинантных методик, например, посредством экспрессии рекомбинантной нуклеиновой кислоты, как описано выше. Термин «рекомбинантный вектор» в данной заявке включает любые векторы, известные специалисту, включая плазмидные векторы, космидные векторы, фаговые векторы, такие как фаг лямбда, вирусные векторы, такие как аденовирусные или бакуловирусные векторы, или векторы на основе искусственных хромосом, такие как бактериальные искусственные хромосомы (BAC), дрожжевые искусственные хромосомы (YAC) или искусственные хромосомы из P1 (PAC). Указанные векторы включают векторы экспрессии, а также клонирующие векторы. Векторы экспрессии включают плазмиды, а также вирусные векторы и, как правило, содержат желательную кодирующую последовательность и подходящие последовательности ДНК, необходимы для экспрессии функционально связанной с ними кодирующей последовательности в конкретном организме хозяина (например, бактериях, дрожжах, растении, насекомом или млекопитающем) или в системах экспрессии *in vitro*. Клонирование векторы, как правило, применяют для конструирования и амплификации некоторого желательного фрагмента ДНК, и в них могут отсутствовать функциональные последовательности, необходимые для экспрессии желательных фрагментов ДНК.

Термин «клетка-хозяин» относится к клетке, которая содержит вектор (например, плазмиду или вирус). Такая клетка-хозяин может быть либо прокариотической (например, бактериальной клеткой), либо эукариотической клеткой (например, грибковой, растительной или животной клеткой). Клетки-хозяева включают как одноклеточные прокариотические и эукариотические организмы (например, бактерии, дрожжи и актиномицеты), так и отдельные клетки из растений или животных более высокого порядка

при выращивании в культуре клеток. «Рекомбинантная клетка-хозяин» в данной заявке относится к клетке-хозяину, которая содержит полинуклеотид, который кодирует интересующий полипептидный фрагмент, т.е., фрагмент вирусной субъединицы РА или ее вариантов согласно настоящему изобретению. Данный полинуклеотид может находиться внутри клетки-хозяина (i) свободно рассредоточенным в чистом виде, (ii) включенным в рекомбинантный вектор, или (iii) встроенным в геном клетки-хозяина или митохондриальную ДНК. Рекомбинантную клетку можно применять для экспрессии интересующего полинуклеотида или для амплификации полинуклеотида или рекомбинантного вектора согласно настоящему изобретению. Термин «рекомбинантная клетка-хозяин» включает потомство исходной клетки, которая была трансформирована, трансфицирована или инфицирована полинуклеотидом или рекомбинантным вектором согласно настоящему изобретению. Рекомбинантная клетка-хозяин может представлять собой бактериальную клетку, такую как клетка *E. coli*, дрожжевую клетку, такую как *Saccharomyces cerevisiae* или *Pichia pastoris*, клетку растения, клетку насекомого, такую как клетки SF9 или High Five, или клетку млекопитающего. Предпочтительные примеры клеток млекопитающих представляют собой клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки почки африканской зеленой мартышки (COS), клетки эмбриональной почки человека (HEK293), клетки HeLa и тому подобные клетки.

Термины «индивид», «субъект» или «пациент» используют взаимозаменяемо в данной заявке, и они относятся к любому млекопитающему, рептилии или птице, которые могут получить пользу от настоящего изобретения. В частности, индивида выбирают из группы, состоящей из лабораторных животных (например, мыши, крысы или кролика), домашних животных (включая, например, морскую свинку, кролика, лошадь, осла, корову, овцу, козу, свинью, цыпленка, утку, верблюда, кошку, собаку, морскую черепаху, сухопутную черепаху, змею или ящерицу) или приматов, включая шимпанзе, бонобо, горилл и людей. В частности, «индивид» представляет собой человека.

Термины «заболевание» и «расстройство» используют взаимозаменяемо в данной заявке по отношению к аномальному состоянию, особенно, аномальному медицинскому состоянию, такому как заболевание или телесное повреждение, при котором ткань, орган или индивид более не способны эффективно осуществлять свою функцию. Обычно, но не обязательно, заболевание связано с конкретными симптомами или признаками, указывающими на присутствие такого заболевания. Наличие таких симптомов или признаков, следовательно, может указывать на то, что ткань, орган или индивид страдает

от заболевания. Изменение данных симптомов или признаков может свидетельствовать о прогрессировании такого заболевания. Прогрессирование заболевания обычно характеризуется усилением или ослаблением таких симптомов или признаков, что может свидетельствовать об «ухудшении» или «улучшении» заболевания. «Ухудшение» заболевания характеризуется снижением способности ткани, органа или организма эффективно выполнять свою функцию, тогда как «улучшение» заболевания обычно характеризуется повышением способности ткани, органа или индивида эффективно выполнять свою функцию. Ткань, орган или индивид, у которых есть «риск развития» заболевания, находятся в здоровом состоянии, но проявляют возможность возникновения заболевания. Обычно, риск развития заболевания связан с ранними или слабыми признаками или симптомами такого заболевания. В таком случае начало заболевания все еще можно предотвратить лечением. Примеры заболеваний включают, но не ограничены перечисленными: инфекционные заболевания, травматические заболевания, воспалительные заболевания, состояния кожи, эндокринные заболевания, заболевания кишечника, неврологические расстройства, заболевания суставов, генетические нарушения, аутоиммунные заболевания и различные типы рака.

Под «опухолью» подразумевают аномальную группу клеток или ткань, которая растет с быстрой неконтролируемой пролиферацией клеток и продолжает расти после того, как прекращаются стимулы, которые инициировали новый рост. Опухоли проявляют частичное или полное отсутствие структурной организации и координации функций с нормальной тканью, и обычно образуют отдельную массу ткани, которая может быть либо доброкачественной, либо злокачественной.

Под «метастазированием» подразумевают распространение раковых клеток из исходного очага в другую часть организма. Образование метастаза представляет собой очень сложный процесс и зависит от отсоединения злокачественных клеток от первичной опухоли, инвазии во внеклеточный матрикс, прохождения через эндотелиальные базальные мембраны для проникновения в полость организма и сосуды, а затем, после перемещения с кровью, инфильтрации органов-мишеней. Наконец, рост новой опухоли в целевом очаге зависит от ангиогенеза. Метастазирование опухоли часто происходит даже после удаления первичной опухоли, так как опухолевые клетки или компоненты могут остаться и развить метастатический потенциал. В одном варианте реализации термин «метастаз» согласно настоящему изобретению относится к «отдаленному метастазу», который относится к

метастазу, отдаленному от первичной опухоли и системы регионарных лимфатических узлов.

«Симптомы» заболевания или расстройства представляют собой вовлечение в заболевание или расстройство, которое ощущает ткань, орган или организм, имеющий такое заболевание или расстройство, и включают, но не ограничены перечисленными: боль, слабость, болезненная чувствительность, переутомление, скованность и спазм ткани, органа или индивида, а также присутствие, отсутствие, повышение, снижение определенных показателей, таких как биомаркеры или молекулярные маркеры. Термин «заболевание» и «расстройство» в данной заявке относятся к аномальному состоянию, особенно аномальному медицинскому состоянию, такому как заболевание или повреждение, при котором ткань, орган или индивид более не способны эффективно осуществлять свою функцию. Обычно, но не обязательно, заболевание или расстройство связано с конкретными симптомами или признаками, указывающими на присутствие такого заболевания или расстройства. Заболевания или расстройства включают, но не ограничены перечисленными: аутоиммунные заболевания, аллергические заболевания, заболевания ракового типа, состояния кожи, эндокринные заболевания, заболевания и нарушения крови, заболевания и нарушения глаз, генетические нарушения, воспалительные заболевания, инфекционные заболевания, заболевания кишечника, неврологические расстройства и психическое заболевание. В качестве примера, заболевания ракового типа включают, но не ограничены перечисленными: базально-клеточную карциному, рак мочевого пузыря, рак кости, опухоль головного мозга, рак молочной железы, лимфому Беркита, рак шейки матки, рак толстого кишечника, кожную Т-клеточную лимфому, рак пищевода, ретинобластому, рак желудка, стромальную опухоль желудочно-кишечного тракта, глиому, лимфому Ходжкина, саркому Капоши, лейкозы, лимфомы, меланому, рак ротоглотки, рак яичников, рак поджелудочной железы, плеврально-клеточную бластому, рак предстательной железы, рак глотки, рак щитовидной железы и рак уретры.

В данной заявке «лечить», «лечащий», «лечение» или «терапия» заболевания или расстройства означает достижение одно или более из следующих эффектов: (a) уменьшения тяжести расстройства; (b) ограничения или предотвращения развития симптомов, характерных для расстройств(а), от которых(-ого) лечат; (c) ингибирования усугубления симптомов, характерных для расстройств(а), от которых(-ого) лечат; (d) ограничения или предотвращения рецидива расстройств(а) у индивида, у которого ранее были(-о)

указанные(-ое) расстройства(-о); и (е) ограничения или предотвращения рецидива симптомов у индивидов, у которых ранее проявлялись симптомы указанных(-ого) расстройств(а). Соответственно, молекула, обладающая терапевтическим действием, лечит симптомы заболевания или расстройства путем достижения одного или более из приведенных выше эффектов (а) - (е).

В данной заявке «предотвратить», «предотвращающий», «предотвращение» или «профилактика» заболевания или расстройства означает предотвращение возникновения такого заболевания или расстройства у пациента.

Термины «IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgM Igκ, Igλ, TCR» в данной заявке описывают антитела или молекулы, содержащие домены из суперсемейства Ig, и могут происходить из человека, мыши, крысы, другого грызуна, крупного рогатого скота или иметь другое происхождение, в особенности, происходить из человека.

Термин «HLA» в данной заявке описывает лейкоцитарный антиген человека, который также называют ГКГС (главный комплекс гистосовместимости), включающий молекулы ГКГС класса I и II, содержащие домены из суперсемейства Ig, и он может происходить из человека, мыши, крысы, другого грызуна, крупного рогатого скота или иметь другое происхождение.

Термин «ASL» в данной заявке описывает антигенспецифический лиганд. Соответственно, ASLAn1 относится к антигенспецифическому лиганду, который специфичен к антигену 1, ASLAn2 специфичен к антигену 2, ASLAn3 специфичен к антигену 3 и так далее.

Термины «фармацевтическое средство», «лекарственное средство» и «лекарство» в данной заявке используют взаимозаменяемо по отношению к веществу и/или комбинации веществ, которые применяют для выявления, предотвращения или лечения заболевания или расстройства.

«Атросаб (Atrosab)» представляет собой гуманизированное моноклональное антитело, которое специфично блокирует провоспалительный рецептор 1 TNF (TNFR1), не взаимодействуя с рецептором 2 TNF (TNFR2). Атросаб на сегодняшний день находится в разработке для дальнейших клинических исследований.

Варианты реализации изобретения

В первом аспекте настоящего изобретения предложен белковый комплекс, содержащий по меньшей мере две цепи аминокислот I и II, которые нековалентно связаны

друг с другом посредством области гетеродимеризации I (HRI), содержащейся в цепи аминокислот I, и области гетеродимеризации II (HRII), содержащейся в цепи аминокислот II, причем

- (a) HRI содержит семь антипараллельных бета-цепей AI, BI, CI, DI, EI, FI и GI, шесть промежуточных областей bI, cI, dI, eI, fI и gI, N-концевую область aI и C-концевую область hI, расположенные от N-конца к C-концу в следующем порядке

aI-AI-bI-BI-cI-CI-dI-DI-eI-EI-fI-FI-gI-GI-hI,

причем HRI представляет собой слитый белок первой человеческой константной области иммуноглобулина или подобного иммуноглобулину белка (первой CRI, акцептора), аминокислоты которой перемежаются с аминокислотами второй человеческой константной области иммуноглобулина или подобного иммуноглобулину белка (второй CRI, донора),

где первая CRI содержит семь антипараллельных бета-цепей A1, B1, C1, D1, E1, F1 и G1, шесть промежуточных областей b1, c1, d1, e1, f1 и g1, N-концевую область a1 и C-концевую область h1, расположенные от N-конца к C-концу в следующем порядке

a1-A1-b1-B1-c1-C1-d1-D1-e1-E1-f1-F1-g1-G1-h1,

где вторая CRI содержит семь антипараллельных бета-цепей A2, B2, C2, D2, E2, F2 и G2, шесть промежуточных областей b2, c2, d2, e2, f2 и g2, N-концевую область a2 и C-концевую область h2, расположенные от N-конца к C-концу в следующем порядке

a2-A2-b2-B2-c2-C2-d2-D2-e2-E2-f2-F2-g2-G2-h2,

причем HRI имеет последовательность аминокислот первой CRI, и по меньшей мере следующие аминокислоты первой CRI заменены на следующие аминокислоты из второй CRI:

- (i) по меньшей мере 1 аминокислота из a1 заменена на по меньшей мере 1 аминокислоту из a2 (Замена 1), в предпочтительном варианте реализации по меньшей мере от 4 до 12 аминокислот, т.е., 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12, более предпочтительно от 6 до 8 аминокислот, из a1 заменены на по меньшей мере от 4 до 12 аминокислот, т.е., 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12, более предпочтительно от 6 до 8 аминокислот, из a2; и
- (ii) по меньшей мере 1 аминокислота из c1 заменена на по меньшей мере 1 аминокислоту из c2 (Замена 2), в предпочтительном варианте реализации непрерывный участок аминокислот, состоящий из от 1 до 5 аминокислот из c1, т.е., 1, 2, 3, 4 или 5, и от 1 до 6 аминокислот из C1, т.е., 1, 2, 3, 4, 5 или 6, более

предпочтительно непрерывный участок аминокислот, включающий или состоящий из от 2 до 5 аминокислот из c1 и от 4 до 6 аминокислот из C1, заменен на непрерывный участок аминокислот, состоящий из от 1 до 5 аминокислот из c2, т.е., 1, 2, 3, 4 или 5, и от 1 до 6 аминокислот из C2, т.е., 1, 2, 3, 4, 5 или 6, более предпочтительно на непрерывный участок аминокислот, включающий или состоящий из от 2 до 5 аминокислот из c2 и от 4 до 6 аминокислот из C2,

более предпочтительно от 1 до 5 аминокислот из c1 заменены на от 1 до 5 аминокислот из c2,

предпочтительно остаток, замененный в Замене 2, включает положения 47 и 49 в IgLCRC,

предпочтительно общая длина замененного непрерывного участка аминокислот составляет от 5 до 11, более предпочтительно от 5 до 9 и еще более предпочтительно от 5 до 7 аминокислот; и

- (iii) по меньшей мере 1 аминокислота из g1 заменена на по меньшей мере 1 аминокислоту из g2 (Замена 3), в предпочтительном варианте реализации непрерывный участок аминокислот, включающий или состоящий из от 1 до 10 аминокислот из g1, т.е., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, предпочтительно от 1 до 6 аминокислот из F1, т.е., 1, 2, 3, 4, 5 или 6, от 1 до 10 аминокислот из g1, т.е., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, и от 0 до 3 аминокислот из G1, т.е., 0, 1, 2 или 3, заменен на непрерывный участок аминокислот, включающий или состоящий из от 1 до 10 аминокислот из g2, т.е., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, предпочтительно от 1 до 6 аминокислот из F2 т.е., 1, 2, 3, 4, 5 или 6, от 1 до 10 аминокислот из g1, т.е., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, и от 0 до 3 аминокислот из G2 т.е., 0, 1, 2 или 3, предпочтительно, чтобы общая длина замененного непрерывного участка аминокислот составляла от 3 до 20, более предпочтительно от 3 до 18, еще более предпочтительно от 3 до 15; и где

- (b) HRH содержит семь антипараллельных бета-цепей AH, BH, CH, DH, EH, FH и GH, шесть промежуточных областей bH, cH, dH, eH, fH и gH, N-концевую область aH и C-концевую область hH, расположенные от N-конца к C-концу в следующем порядке

aH-AH-bH-BH-cH-CH-dH-DH-eH-EH-fH-FH-gH-GH-hH,

причем HRH представляет собой слитый белок третьей человеческой константной области иммуноглобулина или подобного иммуноглобулину белка (третьей CRI, акцептора), аминокислоты которой перемежаются с аминокислотами четвертой

человеческой константной области иммуноглобулина или подобного иммуноглобулина белка (четвертой CRI, донора), и

где третья CRI содержит семь антипараллельных бета-цепей A3, B3, C3, D3, E3, F3 и G3, шесть промежуточных областей b3, c3, d3, e3, f3 и g3, N-концевую область a3 и C-концевую область h3, расположенные от N-конца к C-концу в следующем порядке

a3-A3-b3-B3-c3-C3-d3-D3-e3-E3-f3-F3-g3-G3-h3,

где четвертая CRI содержит семь антипараллельных бета-цепей A4, B4, C4, D4, E4, F4 и G4, шесть промежуточных областей b4, c4, d4, e4, f4 и g4, N-концевую область a4 и C-концевую область h4, расположенные от N-конца к C-концу в следующем порядке

a4-A4-b4-B4-c4-C4-d4-D4-e4-E4-f4-F4-g4-G4-h4,

причем HRII имеет последовательность аминокислот третьей CRI и по меньшей мере следующие аминокислоты из третьей CRI заменены на следующие аминокислоты из четвертой CRI:

- (i) по меньшей мере 1 аминокислота из a3 заменена на по меньшей мере 1 аминокислоту из a4 (Замена 4), в предпочтительном варианте реализации по меньшей мере от 4 до 12 аминокислот, т.е., 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12, более предпочтительно от 6 до 10 аминокислот из a3 заменены на по меньшей мере от 4 до 12 аминокислот, т.е., 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12, более предпочтительно от 6 до 10 аминокислот из a4; и
- (ii) по меньшей мере 1 аминокислота из c3 заменена на по меньшей мере 1 аминокислоту из c4 (Замена 5), в предпочтительном варианте реализации непрерывный участок аминокислот, состоящий из от 1 до 5 аминокислот из c3, т.е., 1, 2, 3, 4 или 5, и от 1 до 6 аминокислот из C3, т.е., 1, 2, 3, 4, 5 или 6, более предпочтительно непрерывный участок аминокислот, состоящий из от 2 до 5 аминокислот из c3 и от 4 до 6 аминокислот из C3, заменен на непрерывный участок аминокислот, состоящий из от 1 до 5 аминокислот из c4, т.е., 1, 2, 3, 4 или 5, и от 1 до 6 аминокислот из C4, т.е., 1, 2, 3, 4, 5 или 6, более предпочтительно на непрерывный участок аминокислот, состоящий из от 2 до 5 аминокислот из c4 и от 4 до 6 аминокислот из C4;
более предпочтительно от 1 до 5 аминокислот из c3 заменены на от 1 до 5 аминокислот из c4,
предпочтительно остаток, замененный в замене 5, включает положения 47 и 49 в IgLCRC,

предпочтительно общая длина замененного непрерывного участка аминокислот составляет от 5 до 11, более предпочтительно от 5 до 9 и еще более предпочтительно от 5 до 7; и

- (iii) по меньшей мере 1 аминокислота из g3 заменена на по меньшей мере 1 аминокислоту из g4 (Замена 6), в предпочтительном варианте реализации непрерывный участок аминокислот, включающий или состоящий из от 1 до 10 аминокислот из g1, т.е., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, предпочтительно от 1 до 6 аминокислот из F3, т.е., 1, 2, 3, 4, 5 или 6, от 1 до 10 аминокислот из g1, т.е., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, и от 0 до 3 аминокислот из G3, т.е., 0, 1, 2 или 3, заменен на непрерывный участок аминокислот, включающий или состоящий из от 1 до 10 аминокислот из F4, т.е., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, предпочтительно от 1 до 6 аминокислот из F4, т.е., 1, 2, 3, 4, 5 или 6, и от 0 до 3 аминокислот из G4, т.е., 0, 1, 2 или 3,

предпочтительно общая длина замененного непрерывного участка аминокислот составляет от 3 до 20 аминокислот, более предпочтительно от 3 до 18 аминокислот, и еще более предпочтительно от 3 до 15 аминокислот;

где первая CRI и третья CRI отличаются друг от друга и специфично связываются друг с другом при физиологических условиях.

Таким образом, HRI предпочтительно имеет следующую аминокислотную структуру:

- (i) по меньшей мере 1 аминокислота из a1, перекрывающего положения в IgLCRC с 1 по 12 иммуноглобулина или подобного иммуноглобулину белка, заменена на по меньшей мере 1 аминокислоту из a2, перекрывающего положения в IgLCRC с 1 по 12 иммуноглобулина или подобного иммуноглобулину белка, в предпочтительном варианте реализации по меньшей мере от 4 до 12 аминокислот, т.е., 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12, более предпочтительно от 6 до 8 аминокислот, из a1, перекрывающего положения в IgLCRC с 1 по 12, заменены на по меньшей мере от 4 до 12 аминокислот, т.е., 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12, более предпочтительно от 6 до 8 аминокислот, из a2, перекрывающего положения в IgLCRC с 1 по 12; и
- (ii) по меньшей мере 1 аминокислота из c1, перекрывающего положения в IgLCRC с 41 по 45 иммуноглобулина или подобного иммуноглобулину белка, заменена на по меньшей мере 1 аминокислоту из c2, перекрывающего положения в IgLCRC с 41 по 45 иммуноглобулина или подобного иммуноглобулину белка, в предпочтительном варианте реализации непрерывный участок аминокислот,

состоящий из от 1 до 5 аминокислот из c1, перекрывающего положения в IgLCRC с 41 по 45 иммуноглобулина или подобного иммуноглобулину белка, т.е., 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот, и от 1 до 6 аминокислот из C1, перекрывающего положения в IgLCRC с 46 по 52, т.е., 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислот, более предпочтительно непрерывный участок аминокислот, включающий или состоящий из от 2 до 5 аминокислот из c1, перекрывающего положения в IgLCRC с 41 по 45, и от 4 до 6 аминокислот из C1, перекрывающего положения в IgLCRC с 46 по 52, заменен на непрерывный участок аминокислот, состоящий из от 1 до 5 аминокислот из c2, перекрывающего положения в IgLCRC с 41 по 45 иммуноглобулина или подобного иммуноглобулину белка, т.е., 1, 2, 3, 4 или 5, и от 1 до 6 аминокислот из C2, перекрывающего положения в IgLCRC с 46 по 52, т.е., 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислот, более предпочтительно на непрерывный участок аминокислот, включающий или состоящий из от 2 до 5 аминокислот из c2, перекрывающего положения в IgLCRC с 41 по 45, и от 4 до 6 аминокислот из C2, перекрывающего положения в IgLCRC с 46 по 52,

более предпочтительно от 1 до 5 аминокислот из c1 заменены на от 1 до 5 аминокислот из c2,

предпочтительно остаток, замененный в Замене 2, включает положения 47 и 49 в IgLCRC,

предпочтительно общая длина замененного непрерывного участка аминокислот составляет от 5 до 11, более предпочтительно от 5 до 9 и еще более предпочтительно от 5 до 7 аминокислот; и

- (iii) по меньшей мере 1 аминокислота из g1, перекрывающего положения в IgLCRC с 109 по 127 иммуноглобулина или подобного иммуноглобулину белка, заменена на по меньшей мере 1 аминокислоту из g2, перекрывающего положения в IgLCRC с 109 по 127 иммуноглобулина или подобного иммуноглобулину белка, в предпочтительном варианте реализации непрерывный участок аминокислот, включающий или состоящий из от 1 до 10 аминокислот из g1, перекрывающего положения в IgLCRC с 109 по 127 иммуноглобулина или подобного иммуноглобулину белка, т.е., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот, предпочтительно от 1 до 6 аминокислот из F1, перекрывающего положения в IgLCRC с 102 по 108, т.е., 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислот, от 1 до 10 аминокислот из g1, т.е., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот, и от 0 до 3 аминокислот из

G1, перекрывающего положения в IgLCRC с 128 по 133, т.е., 0, 1, 2 или 3 аминокислоты, заменен на непрерывный участок аминокислот, включающий или состоящий из от 1 до 10 аминокислот из g2, перекрывающего положения в IgLCRC с 109 по 127 иммуноглобулина или подобного иммуноглобулину белка, т.е., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот, предпочтительно от 1 до 6 аминокислот из F2, перекрывающего положения в IgLCRC с 102 по 108, т.е., 1, 2, 3, 4, 5 или 6, от 1 до 10 аминокислот из g1, перекрывающего положения в IgLCRC с 109 по 127 иммуноглобулина или подобного иммуноглобулину белка, т.е., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот, и от 0 до 3 аминокислот из G2, перекрывающего положения в IgLCRC с 128 по 133, т.е., 0, 1, 2 или 3 аминокислоты, при этом предпочтительно, чтобы общая длина замененного непрерывного участка аминокислот составляла от 3 до 20 аминокислот, более предпочтительно от 3 до 18 аминокислот, еще более предпочтительно от 3 до 15 аминокислот.

Соответственно, HR2 предпочтительно имеет следующую аминокислотную структуру:

- (i) по меньшей мере 1 аминокислота из a3, перекрывающего положения в IgLCRC с 1 по 12 иммуноглобулина или подобного иммуноглобулину белка, заменена на по меньшей мере 1 аминокислоту из a4, перекрывающего положения в IgLCRC с 1 по 12 иммуноглобулина или подобного иммуноглобулину белка, в предпочтительном варианте реализации по меньшей мере от 4 до 12 аминокислот, т.е., 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12, более предпочтительно от 6 до 8 аминокислот, из a3, перекрывающего положения в IgLCRC с 1 по 12, заменены на по меньшей мере от 4 до 12 аминокислот, т.е., 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12, более предпочтительно от 6 до 8 аминокислот, из a4, перекрывающего положения в IgLCRC с 1 по 12; и
- (ii) по меньшей мере 1 аминокислота из c3, перекрывающего положения в IgLCRC с 41 по 45 иммуноглобулина или подобного иммуноглобулину белка, заменена на по меньшей мере 1 аминокислоту из c4, перекрывающего положения в IgLCRC с 41 по 45 иммуноглобулина или подобного иммуноглобулину белка, в предпочтительном варианте реализации непрерывный участок аминокислот, состоящий из от 1 до 5 аминокислот из c3, перекрывающего положения в IgLCRC с 41 по 45 иммуноглобулина или подобного иммуноглобулину белка, т.е., 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот, и от 1 до 6 аминокислот из C3, перекрывающего положения

в IgLCRC с 46 по 52, т.е., 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислот, более предпочтительно непрерывный участок аминокислот, включающий или состоящий из от 2 до 5 аминокислот из с3, перекрывающего положения в IgLCRC с 41 по 45, и от 4 до 6 аминокислот из С3, перекрывающего положения в IgLCRC с 46 по 52, заменен на непрерывный участок аминокислот, состоящий из от 1 до 5 аминокислот из с4, перекрывающего положения в IgLCRC с 41 по 45 иммуноглобулина или подобного иммуноглобулину белка, т.е., 1, 2, 3, 4 или 5, и от 1 до 6 аминокислот из С4, перекрывающего положения в IgLCRC с 46 по 52, т.е., 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислот, более предпочтительно на непрерывный участок аминокислот, включающий или состоящий из от 2 до 5 аминокислот из с4, перекрывающего положения в IgLCRC с 41 по 45, и от 4 до 6 аминокислот из С4, перекрывающего положения в IgLCRC с 46 по 52,

более предпочтительно от 1 до 5 аминокислот из с3 заменены на от 1 до 5 аминокислот из с4,

предпочтительно остаток, замененный в Замене 2, включает положения 47 и 49 в IgLCRC,

предпочтительно общая длина замененного непрерывного участка аминокислот составляет от 5 до 11, более предпочтительно от 5 до 9 и еще более предпочтительно от 5 до 7 аминокислот; и

- (iii) по меньшей мере 1 аминокислота из g3, перекрывающего положения в IgLCRC с 109 по 127 иммуноглобулина или подобного иммуноглобулину белка, заменена на по меньшей мере 1 аминокислоту из g4, перекрывающего положения в IgLCRC с 109 по 127 иммуноглобулина или подобного иммуноглобулину белка, в предпочтительном варианте реализации непрерывный участок аминокислот, включающий или состоящий из от 1 до 10 аминокислот из g3, перекрывающего положения в IgLCRC с 109 по 127 иммуноглобулина или подобного иммуноглобулину белка, т.е., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот, предпочтительно от 1 до 6 аминокислот из F3, перекрывающего положения в IgLCRC с 102 по 108, т.е., 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислот, от 1 до 10 аминокислот из g1, т.е., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот, и от 0 до 3 аминокислот из G3, перекрывающего положения в IgLCRC с 128 по 133, т.е., 0, 1, 2 или 3 аминокислоты, заменен на непрерывный участок аминокислот, включающий или состоящий из от 1 до 10 аминокислот из g4, перекрывающего положения в

IgLCRC с 109 по 127 иммуноглобулина или подобного иммуноглобулину белка, т.е., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот, предпочтительно от 1 до 6 аминокислот из F4, перекрывающего положения в IgLCRC с 102 по 108, т.е., 1, 2, 3, 4, 5 или 6, от 1 до 10 аминокислот из g3, перекрывающего положения в IgLCRC с 109 по 127 иммуноглобулина или подобного иммуноглобулину белка, т.е., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот, и от 0 до 3 аминокислот из G4, перекрывающего положения в IgLCRC с 128 по 133, т.е., 0, 1, 2 или 3 аминокислоты, при этом предпочтительно, чтобы общая длина замененного непрерывного участка аминокислот составляла от 3 до 20 аминокислот, более предпочтительно от 3 до 18 аминокислот, еще более предпочтительно от 3 до 15 аминокислот.

Более предпочтительный вариант реализации HR1 имеет следующую аминокислотную структуру:

- (i) по меньшей мере от 4 до 12 аминокислот, т.е., 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12, более предпочтительно от 6 до 8 аминокислот, из a3, перекрывающего положения в IgLCRC с 1 по 12, заменены на по меньшей мере от 4 до 12 аминокислот, т.е., 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12, более предпочтительно от 6 до 8 аминокислот, из a4, перекрывающего положения в IgLCRC с 1 по 12; и
- (ii) непрерывный участок аминокислот, включающий или состоящий из от 2 до 5 аминокислот из c3, перекрывающего положения в IgLCRC с 41 по 45, и от 4 до 6 аминокислот из C3, перекрывающего положения в IgLCRC с 46 по 52, заменен на непрерывный участок аминокислот, включающий или состоящий из от 2 до 5 аминокислот из c4, перекрывающего положения в IgLCRC с 41 по 45, и от 4 до 6 аминокислот из C4, перекрывающего положения в IgLCRC с 46 по 52,
или
от 1 до 5 аминокислот из c3 заменены на от 1 до 5 аминокислот из c4, более предпочтительно остаток, замененный в Замене 2, включает положения 47 и 49 в IgLCRC,
предпочтительно общая длина замененного непрерывного участка аминокислот составляет от 5 до 11, более предпочтительно от 5 до 9 и еще более предпочтительно от 5 до 7 аминокислот; и

(iii) непрерывный участок аминокислот, содержащий от 1 до 6 аминокислот из F1, перекрывающего положения в IgLCRC с 102 по 108, т.е., 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислот, от 1 до 10 аминокислот из g1, т.е., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот, и от 0 до 3 аминокислот из G1, перекрывающего положения в IgLCRC с 128 по 133, т.е., 0, 1, 2 или 3 аминокислоты, заменен на непрерывный участок, содержащий от 1 до 6 аминокислот из F2, перекрывающего положения в IgLCRC с 102 по 108, т.е., 1, 2, 3, 4, 5 или 6, от 1 до 10 аминокислот из g2, перекрывающего положения в IgLCRC с 109 по 127 иммуноглобулина или подобного иммуноглобулину белка, т.е., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот, и от 0 до 3 аминокислот из G2, перекрывающего положения в IgLCRC с 128 по 133, т.е., 0, 1, 2 или 3 аминокислоты, при этом предпочтительно, чтобы общая длина замененного непрерывного участка аминокислот составляла от 3 до 20 аминокислот, более предпочтительно от 3 до 18 аминокислот, еще более предпочтительно от 3 до 15 аминокислот.

Соответственно, более предпочтительный HR2 имеет следующую аминокислотную структуру:

- (i) по меньшей мере от 4 до 12 аминокислот, т.е., 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12, более предпочтительно от 6 до 8 аминокислот, из a3, перекрывающего положения в IgLCRC с 1 по 12, заменены на по меньшей мере от 4 до 12 аминокислот, т.е., 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12, более предпочтительно от 6 до 8 аминокислот, из a4, перекрывающего положения в IgLCRC с 1 по 12; и
- (ii) непрерывный участок аминокислот, включающий или состоящий из от 2 до 5 аминокислот из c3, перекрывающего положения в IgLCRC с 41 по 45, и от 4 до 6 аминокислот из C3, перекрывающего положения в IgLCRC с 46 по 52, заменен на непрерывный участок аминокислот, включающий или состоящий из от 2 до 5 аминокислот из c4, перекрывающего положения в IgLCRC с 41 по 45, и от 4 до 6 аминокислот из C4, перекрывающего положения в IgLCRC с 46 по 52,
или
от 1 до 5 аминокислот из c3 заменены на от 1 до 5 аминокислот из c4, более предпочтительно остаток, замененный в Замене 2, включает положения 47 и 49 в IgLCRC,

предпочтительно общая длина замененного непрерывного участка аминокислот составляет от 5 до 11, более предпочтительно от 5 до 9 и еще более предпочтительно от 5 до 7 аминокислот; и

- (iii) непрерывный участок аминокислот, содержащий от 1 до 6 аминокислот из F3, перекрывающего положения в IgLCRC с 102 по 108, т.е., 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислот, от 1 до 10 аминокислот из g3, т.е., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот, и от 0 до 3 аминокислот из G3, перекрывающего положения в IgLCRC с 128 по 133, т.е., 0, 1, 2 или 3 аминокислоты, заменен на непрерывный участок, содержащий от 1 до 6 аминокислот из F4, перекрывающего положения в IgLCRC с 102 по 108, т.е., 1, 2, 3, 4, 5 или 6, от 1 до 10 аминокислот из g4, перекрывающего положения в IgLCRC с 109 по 127 иммуноглобулина или подобного иммуноглобулину белка, т.е., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот, и от 0 до 3 аминокислот из G4, перекрывающего положения в IgLCRC с 128 по 133, т.е., 0, 1, 2 или 3 аминокислоты, при этом предпочтительно, чтобы общая длина замененного непрерывного участка аминокислот составляла от 3 до 20 аминокислот, более предпочтительно от 3 до 18 аминокислот, еще более предпочтительно от 3 до 15 аминокислот.

Предпочтительно, чтобы HRI содержала от 6 до 8 аминокислот из a2; от 5 до 11, более предпочтительно от 5 до 9 и еще более предпочтительно от 5 до 7 аминокислот из c2 и C2; и чтобы непрерывный участок аминокислот из от 3 до 20, более предпочтительно от 3 до 18, и еще более предпочтительно от 3 до 15 аминокислот из первой CRI был заменен на непрерывный участок аминокислот из от 3 до 20, более предпочтительно от 3 до 18, и еще более предпочтительно от 3 до 15 аминокислот из второй CRI в замене 3. Предпочтительно, чтобы HRII содержала от 6 до 8 аминокислот из a4; от 5 до 11, более предпочтительно от 5 до 9 и еще более предпочтительно от 5 до 7 аминокислот из c4 и C4; и чтобы непрерывный участок аминокислот из от 3 до 20, более предпочтительно от 3 до 18, и еще более предпочтительно от 3 до 15 аминокислот из третьей CRI был заменен на непрерывный участок аминокислот из от 3 до 20, более предпочтительно от 3 до 18, и еще более предпочтительно от 3 до 15 аминокислот из четвертой CRI в замене 6.

Также предпочтительно, чтобы замена не являлась безрезультатной заменой, т.е., если аминокислоты из первой CRI и второй CRI идентичны в указанных положениях IgLCRC, которые необходимо заменить, то это не считают заменой в рамках значения согласно настоящему изобретению. Каждая замена аминокислот из первой CRI на

аминокислоты из второй CRI и, соответственно, замена аминокислот из третьей CRI на аминокислоты из четвертой CRI изменяет последовательность на указанном участке первой и третьей CRI, соответственно.

В предпочтительном варианте реализации аффинность связывания HRI с HRII составляет по меньшей мере 50% от аффинности первой CRI к третьей CRI, предпочтительно аффинность связывания составляет по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 90% или более. Особенно предпочтительно, чтобы аффинность связывания HRI с HRII не изменялась по сравнению с аффинностью связывания первой и третьей CRI. Специалисту хорошо известно, как определить аффинность связывания между двумя белками. Предпочтительным способом определения аффинности связывания в контексте настоящего изобретения является использование измерений ViaCore или пьезокварцевого микровзвешивания (QCM).

Для сохранения общей структуры акцепторных белков, т.е., первой CRI и третьей CRI, предпочтительно, чтобы аминокислоты акцептора из первой CRI и третьей CRI, которые являются частью антипараллельных бета-цепей, были заменены на такое же количество донорных аминокислот. Это относится к Замене 2, которая может включать замену части из C1 на часть из C2, Замене 3, которая может включать замену частей из F1 и/или G1 на части из F2 и/или G2, Замене 5, которая может включать замену части из C3 на часть из C4, и Замене 6, которая может включать замену частей из F3 и/или G3 на части из F4 и/или G4. Поскольку длина промежуточных областей более вариабельна между двумя различными человеческими константными областями иммуноглобулина или подобного иммуноглобулину белка, то длина замененного промежуточной области в Заменах с 1 по 6 не обязательно идентична. Обычно, количество замененных аминокислот идентично количеству вставленных аминокислот, т.е., общая длина не изменяется, или количество замененных аминокислот на 1, 2 или 3 аминокислоты больше или меньше, чем количество вставленных аминокислот из соответствующей промежуточной области, например, 10 аминокислот из a1 заменены на от 7 до 13 аминокислот из a2. Данные принципы для Замен с 1 по 6 приведены в качестве примера на фиг. 8.

Предпочтительно, чтобы аминокислоты из первой CRI в данных положениях в IgLCRC были заменены на аминокислоты из второй CRI, которые расположены в идентичных положениях в IgLCRC. Аналогично, предпочтительно, чтобы аминокислоты из третьей CRI в данных положениях в IgLCRC были заменены на аминокислоты из четвертой CRI, которые расположены в идентичных положениях в IgLCRC. В наиболее

предпочтительном варианте реализации аминокислоты из первой и третьей CRI, соответственно, которые заменены на аминокислоты из второй и четвертой CRI, соответственно, находятся в идентичных положениях в IgLCRC как для HRI, так и для HRII.

Например, HRI может содержать аминокислоты из a2 в IgLCRC в положениях с 7 по 13, которые заменяют аминокислоты из a1 в IgLCRC в положениях с 7 по 13, и/или HRII может содержать аминокислоты из a4 в IgLCRC в положениях с 7 по 13, которые заменяют аминокислоты из a3 в IgLCRC в положениях с 7 по 13.

В некотором варианте реализации первая CRI и/или третья CRI не содержатся в цепи аминокислот I. В другом конкретном варианте реализации первая CRI и/или третья CRI не содержатся в цепи аминокислот II. В другом конкретном варианте реализации первая CRI и/или третья CRI не содержатся в цепях аминокислот I и II. Пропуск соответствующих акцепторных последовательностей предотвращает нежелательную гетеродимеризацию. Тем не менее, при условии, что только одна из первой или третьей CRI находится внутри HRI и HRII, гетеродимеризация не произойдет. Таким образом, включение первой или третьей CRI позволит гетеродимеризацию белкового комплекса согласно настоящему изобретению с дополнительной белковой цепью или комплексом. Стоит отметить, что вследствие замен аминокислот внутри HRI и HRII, HRI более не рассматривается в контексте настоящего изобретения как первая CRI и HRII более не рассматривается как третья CRI. Соответственно, предпочтительно, чтобы первая CRI и/или третья CRI не содержались в цепи аминокислот I за пределами HRI и в цепи аминокислот II за пределами HRII.

В предпочтительном варианте реализации вторая и четвертая CRI идентичны, более предпочтительно специфично связываются друг с другом при физиологических условиях, т.е., образуют гомодимеры.

В некотором варианте реализации, в которых вторая и четвертая CRI проявляют Fc-функцию, предпочтительно, чтобы Fc-функция сохранялась, когда последовательности аминокислот из второй и четвертой CRI вставлены в 1ую CRI из HRI и 3ю CRI из HRII, соответственно. В контексте настоящего изобретения Fc-функция сохраняется, если HRI проявляет по меньшей мере 30% Fc-функции второй CRI и HRII проявляет по меньшей мере 30% Fc-функции четвертой CRI. В случаях, в которых вторая и четвертая CRI специфично связываются друг с другом и проявляют Fc-функцию, особенно предпочтительно, чтобы гетеродимеризованные HRI и HRII проявляли по меньшей мере

30% Fc-функции димеризованных, предпочтительно гомодимеризованных второй CRI и четвертой CRI.

В предпочтительном варианте реализации Замена 1, Замена 2, Замена 3, Замена 4, Замена 5 и/или Замена 6, предпочтительно Замены с 1 по 6, не вводят новый В-клеточный эпитоп в HRI и/или HRII. Предпочтительно, не вводят новый В-клеточный эпитоп человека. В предпочтительном варианте реализации Замена 1, Замена 2, Замена 3, Замена 4, Замена 5 и/или Замена 6, предпочтительно Замены с 1 по 6, не вводят новый Т-клеточный эпитоп в HRI и/или HRII. Предпочтительно, не вводят новый Т-клеточный эпитоп человека.

В конкретных вариантах реализации иммуноглобулин или подобные иммуноглобулинам белки выбраны из IgG1, Ig-каппа, Т-клеточного рецептора (TCR) α , TCR- β , неонатального Fc-рецептора (FcRn), β -2-микроглобулина, Ig-лямбда, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgM, лейкоцитарного антигена (LA) А или В и LA-D. В частности, из человеческого IgG1, Ig-каппа, Т-клеточного рецептора (TCR) α , TCR- β , неонатального Fc-рецептора (FcRn), β -2-микроглобулина, Ig-лямбда, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgM, лейкоцитарного антигена А человека (HLA) или В и HLA-D.

В конкретных вариантах реализации первая CRI и третья CRI независимо выбраны из группы, состоящей из константной области тяжелой цепи 1 (CH1) IgG1, предпочтительно имеющей последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 1; константной области Ig κ , предпочтительно имеющей последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 18; константной области TCR α , предпочтительно имеющей последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 10; константной области TCR- β , предпочтительно имеющей последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 11; альфа-3 FcRn, предпочтительно имеющего последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 12; β -2-микроглобулина, предпочтительно имеющего последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 13; константной области Ig λ , предпочтительно имеющей последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 19, 54, 55, 56, 57 или 58; IgG2, предпочтительно имеющего последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 2, IgG3, предпочтительно имеющего последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 3, IgG4, предпочтительно имеющего последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 4, IgA1, предпочтительно имеющего последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 5; IgA2, предпочтительно имеющего последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 6; IgD,

предпочтительно имеющего последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 7; IgE, предпочтительно имеющего последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 8; IgM, предпочтительно имеющего последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 9; лейкоцитарного антигена А человека (HLA), предпочтительно имеющего последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 14, или $\alpha 3$ HLA-B, предпочтительно имеющего последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 15; $\alpha 2$ HLA-D, предпочтительно имеющего последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 16, и $\beta 2$ HLA-D, предпочтительно имеющего последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 17.

В конкретных вариантах реализации комбинации первой CRI и третьей CRI выбраны из следующих:

- (i) первая CRI: CH1 из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE или IgM и третья CRI: константная область Ig κ и константная область Ig λ , т.е., из первой CRI CH1 из IgG1 и из третьей CRI Ig κ , из первой CRI CH1 из IgG2 и из третьей CRI Ig κ , из первой CRI CH1 из IgG3 и из третьей CRI Ig κ , из первой CRI CH1 из IgG4 и из третьей CRI Ig κ , из первой CRI CH1 из IgA1 и из третьей CRI Ig κ , из первой CRI CH1 из IgA2 и из третьей CRI Ig κ , из первой CRI CH1 из IgD и из третьей CRI Ig κ , из первой CRI CH1 из IgE и из третьей CRI Ig κ , из первой CRI CH1 из IgM и из третьей CRI Ig κ , из первой CRI CH1 из IgG1 и из третьей CRI Ig λ , из первой CRI CH1 из IgG2 и из третьей CRI Ig λ , из первой CRI CH1 из IgG3 и из третьей CRI Ig λ , из первой CRI CH1 из IgG4 и из третьей CRI Ig λ , из первой CRI CH1 из IgA1 и из третьей CRI Ig λ , из первой CRI CH1 из IgA2 и из третьей CRI Ig λ , из первой CRI CH1 из IgD и из третьей CRI Ig λ , из первой CRI CH1 из IgE и из третьей CRI Ig λ , или из первой CRI CH1 из IgM и из третьей CRI Ig λ ;
- (ii) первая CRI: константная область из TCR- α , и третья CRI: константная область из TCR- β ;
- (iii) первая CRI: альфа-3 FcRn; $\alpha 3$ HLA-A; или $\alpha 3$ HLA-B, и третья CRI: β -2-микроглобулин; и
- (iv) первая CRI: $\alpha 2$ HLA-D и третья CRI: $\beta 2$ HLA-D.

В конкретных вариантах реализации (i) вторая CRI и четвертая CRI идентичны и выбраны из группы, состоящей из CH3 из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2; CH1 из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE или IgM; или IgD; CH4 из IgE или IgM; и константной области Ig κ или Ig λ , или (ii) вторая CRI и четвертая CRI выбраны независимо из группы,

состоящей из CH1 из IgG1, константной области Igκ или Igλ, CH1 из IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE или IgM; CH3 из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, или IgD, и CH4 из IgE или IgM.

В конкретных вариантах реализации вторая CRI и четвертая CRI независимо выбраны из группы, состоящей из константной области тяжелой цепи 3 (CH3) из IgG1, предпочтительно имеющей последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 45, CH3 из IgG2, предпочтительно имеющей последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 46, CH3 из IgG3, предпочтительно имеющей последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 47, CH3 из IgG4, предпочтительно имеющей последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 48, константной области тяжелой цепи 4 (CH4) из IgM, предпочтительно имеющей последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 49, CH3 из IgA1, предпочтительно имеющей последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 50, CH3 из IgA2, предпочтительно имеющей последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 51, CH3 из IgD, предпочтительно имеющей последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 52, и CH4 из IgE, предпочтительно имеющей последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 53.

Таким образом, в конкретных вариантах реализации, в соответствии с настоящим изобретением предложен белковый комплекс,

- (i) в котором в Замене 1 и/или 4, предпочтительно в Замене 1 и 4, все аминокислоты, расположенные с N-конца от бета-слоя A (положения с 1 по 12 в консенсусе Ig-подобной константной области (IgLCRC)) из первой CRI и/или третьей CRI, предпочтительно из первой CRI и третьей CRI, заменены на все аминокислоты, расположенные с N-конца от бета-слоя A (положения с 1 по 12 в IgLCRC) из второй CRI и/или четвертой CRI, соответственно, предпочтительно из второй CRI и четвертой CRI;
- (ii) в котором в Замене 2 и/или 5, предпочтительно в Замене 2 и 5, аминокислоты в IgLCRC в положениях 41 - 45, 41 - 46, 41 - 47, 41 - 48, 41 - 49, 41 - 50, 41 - 51, 42 - 45, 42 - 46, 42 - 47, 42 - 48, 42 - 49, 42 - 50, 42 - 51, 43 - 45, 43 - 46, 43 - 47, 43 - 48, 43 - 49, 43 - 50, 43 - 51, 44 - 45, 44 - 46, 44 - 47, 44 - 48, 44 - 49, 44 - 50, 44 - 51, 45 - 45, 45 - 46, 45 - 47, 45 - 48, 45 - 49, 45 - 50 или 45 - 51 из первой CRI и/или третьей CRI, предпочтительно из первой CRI и третьей CRI, заменены на аминокислоты в

положениях IgCRC 41 - 45, 41 - 46, 41 - 47, 41 - 48, 41 - 49, 41 - 50, 41 - 51, 42 - 45, 42 - 46, 42 - 47, 42 - 48, 42 - 49, 42 - 50, 42 - 51, 43 - 45, 43 - 46, 43 - 47, 43 - 48, 43 - 49, 43 - 50, 43 - 51, 44 - 45, 44 - 46, 44 - 47, 44 - 48, 44 - 49, 44 - 50, 44 - 51, 45 - 45, 45 - 46, 45 - 47, 45 - 48, 45 - 49, 45 - 50 или 45 - 51 из второй CRI и/или четвертой CRI, соответственно, предпочтительно из второй CRI и четвертой CRI; и

- (iii) в котором в Замене 3 и/или 6, предпочтительно в Замене 3 и 6, аминокислоты в IgLCRC в положениях 103 - 127, 103 - 128, 103 - 129, 103 - 130, 103 - 131, 103 - 132, 104 - 127, 104 - 128, 104 - 129, 104 - 130, 104 - 131, 104 - 132, 105 - 127, 105 - 128, 105 - 129, 105 - 130, 105 - 131, 105 - 132, 106 - 127, 106 - 128, 106 - 129, 106 - 130, 106 - 131, 106 - 132, 107 - 127, 107 - 128, 107 - 129, 107 - 130, 107 - 131, 107 - 132, 108 - 127, 108 - 128, 108 - 129, 108 - 130, 108 - 131, 108 - 132, 109 - 127, 109 - 128, 109 - 129, 109 - 130, 109 - 131 или 109 - 132 первой CRI и/или третьей CRI, предпочтительно из первой CRI и третьей CRI, заменены на аминокислоты в IgLCRC в положениях 103 - 127, 103 - 128, 103 - 129, 103 - 130, 103 - 131, 103 - 132, 104 - 127, 104 - 128, 104 - 129, 104 - 130, 104 - 131, 104 - 132, 105 - 127, 105 - 128, 105 - 129, 105 - 130, 105 - 131, 105 - 132, 106 - 127, 106 - 128, 106 - 129, 106 - 130, 106 - 131, 106 - 132, 107 - 127, 107 - 128, 107 - 129, 107 - 130, 107 - 131, 107 - 132, 108 - 127, 108 - 128, 108 - 129, 108 - 130, 108 - 131, 108 - 132, 109 - 127, 109 - 128, 109 - 129, 109 - 130, 109 - 131 или 109 - 132 второй CRI и/или четвертой CRI, соответственно, предпочтительно из второй CRI и четвертой CRI.

HRI преимущественно включает или состоит из последовательности аминокислот первой CRI, тогда как HRII преимущественно включает или состоит из последовательности аминокислот третьей CRI, т.е., акцепторной CRI. Предпочтительно, чтобы общее количество замененных аминокислот в первой и третьей CRI, соответственно, т.е., количество аминокислот, которые вставлены в 1ую CRI из второй CRI и в 3ю CRI из четвертой CRI составляло от 14 до 30 аминокислот, т.е., 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, в частности, от 15 до 29, в частности, от 16 до 19 аминокислот.

В конкретных вариантах реализации в соответствии с настоящим изобретением предложен белок, в котором дополнительно к Замена с 1 по 6: (i) аминокислоты из первой CRI или третьей CRI в IgLCRC в положениях 37, и/или 47, и/или 49, и/или 81, и/или 107 заменены на аминокислоты из второй CRI или четвертой CRI в IgLCRC в положениях 37, и/или 47, и/или 49, и/или 81, и/или 107. Данные замены дополнительно улучшают свойства HRI и HRII, например, стабильность или силу димеризации. В конкретных вариантах реализации аминокислоты из первой CRI или третьей CRI в IgLCRC в положениях 37 и 47

CRI или четвертой CRI в IgLCRC в положениях 49 и 81, и необязательно на аминокислоты в IgLCRC в положениях 37, и/или 47, и/или 107. В конкретных вариантах реализации аминокислоты из первой CRI или третьей CRI в IgLCRC в положениях 49 и 107 заменены, и необязательно аминокислоты в IgLCRC в положениях 37, и/или 47, и/или 81 дополнительно заменены, на аминокислоты из второй CRI или четвертой CRI в IgLCRC в положениях 49 и 107, и необязательно на аминокислоты в IgLCRC в положениях 37, и/или 47, и/или 81.

В конкретных вариантах реализации каждая из HRI и HRII содержит по меньшей мере один остаток Cys, расположенный таким образом, чтобы образовывалась ковалентная связь между HRI и HRII в IgLCRC в положении 20 (CH1 из IgG2, IgG3, IgG4 или IgM), 21 (CH1 из IgD), 135 (CH1 из IgA1 или IgA2), 138 (CH1 из IgG1 или IgE, CL из Igκ, CL из Igλ), 139 (константный домен из TCR-β) или 141 (константный домен из TCR-α), как изображено на фигуре 4, в результате образования следующих комбинаций первой CRI и третьей CRI:

(i) первая CRI: CH1 из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE или IgM, и третья CRI: константная область Igκ и/или константная область Igλ;

(ii) первая CRI: константная область из TCR-α, и третья CRI: константная область из TCR-β.

В некотором варианте реализации, в соответствии с настоящим изобретением предложен белковый комплекс, в котором HRI и HRII входят в состав указанного белкового комплекса и, соответственно, имеют последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 20 и 21, SEQ ID NO: 22 и 23, SEQ ID NO: 24 и 25, SEQ ID NO: 26 и 27, SEQ ID NO: 28 и 32, SEQ ID NO: 28 и 33, SEQ ID NO: 31 и 29 и SEQ ID NO: 31 и 30.

В некотором варианте реализации цепь аминокислот I и/или цепь аминокислот II дополнительно содержат один или более аминокислотных элементов, выбранных из группы, состоящей из домена CH2 или CH3 антитела; одного или более антигенспецифических лигандов (ASL), предпочтительно, выбранных из группы, состоящей из Fv, одноцепочечного Fv (scFv), стабилизированного дисульфидом Fv, стабилизированного дисульфидом scFv, Fab, одноцепочечного Fab, однодоменного антитела, переменного домена тяжелой цепи (VH), переменного домена легкой цепи (VL), двух или более соединенных переменных доменов цепи, образующих, например, подобные диабоди сайты связывания, нанотела, VHH, одного или более подобных антителам связывающих белков (например, дарпинов, антикалинов, аффител, фибронектин-подобных доменов и т.д.); шарнирной области антитела (HR), одной или

более линкерных последовательностей (L), одного или более цитокинов (C, например, представителей суперсемейства TNF, интерлейкинов (IL, например, IL-2), интерферонов (например, IFN γ), факторов роста), гормонов, лигандов, пептидов, фрагментов рецепторов с лиганд-связывающей активностью, хелаторов, ферментов, факторов свертывания крови и антикоагулянтов, и производных перечисленных элементов.

В некотором варианте реализации цепь аминокислот I содержит в расположении от N-конца к C-концу:

- (i) ASL, специфичный к антигену 1 (ASLAn1)-L-CH2-HRI;
- (ii) CH2-HRI;
- (iii) ASLAn1-L-CH2-HRI;
- (iv) CH2-HRI-L-ASLAn1;
- (v) CH2-HRI;
- (vi) CH2-HRI-L-ASLAn1;
- (vii) ASLAn1-L-CH2-HRI-L-ASL, специфичный к антигену 2 (ASLAn2);
- (viii) ASLAn1-L-CH2-HRI;
- (ix) CH2-HRI;
- (x) CH2-HRI-L-ASLAn1;
- (xi) ASLAn1-L-CH2-HRI-L-ASLAn2;
- (xii) ASLAn1-L-CH2-HRI-L-ASLAn2;
- (xiii) CH2-HRI-L-ASLAn1;
- (xiv) ASLAn1-L-CH2-HRI;
- (xv) ASLAn1-L-CH2-HRI-L-ASLAn2;
- (xvi) Любую цепь аминокислот, описанную в (i) - (xv), содержащую шарнирную область, расположенную с N-конца от CH2
- (xvii) Любую цепь аминокислот, описанную в (i) - (xvi), содержащую цитокин (C) или интерлейкин (IL) вместо одного или более ASL
- (xviii) ASLAn1a (например, VL)-HRIa + ASLAn1b (например, VH)-HRIIa-L/HR-CH2-HRIb

и цепь аминокислот II содержит в расположении от N-конца к C-концу:

- (i) CH2-HRII;
- (ii) ASLAn1-L-CH2-HRII;
- (iii) ASL, специфичный к антигену 2 (ASLAn2)-L-CH2-HRII;
- (iv) CH2-HRII;

- (v) CH2-HRI-L-ASLAn1;
- (vi) CH2-HRI-L-ASLAn2;
- (vii) CH2-HRII;
- (viii) CH2-HRII-L-ASLAn2;
- (ix) ASLAn1-L-CH2-HRII-L-ASLAn2;
- (x) ASLAn2-L-CH2-HRII;
- (xi) CH2-HRII-L-ASL, специфичный к антигену 3 (ASLAn3);
- (xii) ASLAn3-L-CH2-HRII;
- (xiii) ASLAn2-L-CH2-HRII-L-ASLAn3;
- (xiv) ASLAn2-L-CH2-HRII-L-ASLAn3;
- (xv) ASLAn3-L-CH2-HRII-L-ASL, специфичный к антигену 4 (ASLAn4);
- (xvi) Любую цепь аминокислот, описанную в (i) - (xv), содержащую шарнирную область, расположенную с N-конца от CH2
- (xvii) Любую цепь аминокислот, описанную в (i) - (xvi), содержащую цитокин (C) или интерлейкин вместо одного или более ASL
- (xviii) ASLAn2a (например, VL)-HRIc + ASLAn2b (например, VH)-HRIIc-L/HR-CH2-HRIIb

В некотором варианте реализации цепь аминокислот I содержит один или более антигенспецифических лигандов (ASL) и/или одну или более эффекторных молекул и цепь аминокислот II содержит один или более антигенспецифических лигандов (ASL) и/или одну или более эффекторных молекул, и при этом модули ASL выбраны из группы молекул, специфично связывающихся, например, с белками на поверхности клетки (рецептором, молекулой адгезии, каналом, переносчиком и т.д.), гормонами, факторами роста, цитокинами, лигандами, белками сыворотки, факторами свертывания крови, фибринолитическими факторами, хемокинами, ферментами, и при этом эффекторные молекулы выбраны из группы молекул, например, белков на поверхности клетки (рецептора, молекулы адгезии, канала, переносчика и т.д.), гормонов, факторов роста, цитокинов, лигандов, белков сыворотки, факторов свертывания крови, фибринолитических факторов, хемокинов, ферментов.

В некотором варианте реализации в соответствии с настоящим изобретением предложена цепь аминокислот I или II, предпочтительно комбинация цепей аминокислот, в которой цепь I и цепь II включают, по существу состоят или состоят из последовательности аминокислот согласно SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 42 SEQ ID NO: 34

и SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 36 и SEQ ID NO: 37 (scFv13.7-Fc1k), SEQ ID NO: 36 и SEQ ID NO: 38 (scFv13.7-CD3-шарнир-Fc1k), SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 38 (scFv3-43-CD3-шарнир-Fc1k) или SEQ ID NO: 40 и SEQ ID NO: 38 (scFvhuMCSP-CD3-шарнир-Fc1k), соответственно, и вариантов перечисленных последовательностей, которые идентичны по последовательности по меньшей мере на 70%, более предпочтительно по меньшей мере на 75%, более предпочтительно по меньшей мере на 80%, более предпочтительно по меньшей мере на 85%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 95% и еще более предпочтительно по меньшей мере на 98% соответствующим указанным последовательностям и которые способны гетеродимеризоваться и специфично связываться с той же мишенью.

Во втором аспекте настоящего изобретения предложена нуклеиновая кислота, кодирующая цепь аминокислот I и/или II.

В третьем аспекте настоящего изобретения предложен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту согласно второму аспекту.

В четвертом аспекте настоящего изобретения предложен способ определения (установления) последовательности аминокислот HRI с цепью аминокислот I и/или HRII с последовательностью аминокислот II, включающий следующие этапы:

- (i) выбора первой CRI, второй CRI, третьей CRI и четвертой CRI;
- (ii) определения (установления) семи бета-цепей A, B, C, D, E, F и G первой CRI, второй CRI, третьей CRI и четвертой CRI, промежуточных последовательностей b, c, d, e, f и g первой CRI, второй CRI, третьей CRI и четвертой CRI, N- и C-концевых последовательностей a и h, соответственно, первой CRI, второй CRI, третьей CRI и четвертой CRI;
- (iii) замены по меньшей мере 1 аминокислоты из a из первой CRI на по меньшей мере 1 аминокислоту из a из второй (Замена 1); замены по меньшей мере 1 аминокислоты из c из первой CRI на по меньшей мере 1 аминокислоту из c из второй CRI (Замена 2); замены по меньшей мере 1 аминокислоты из g из первой CRI на по меньшей мере 1 аминокислоту из g из второй CRI (Замена 3); замены по меньшей мере 1 аминокислоты из a из третьей CRI на по меньшей мере 1 аминокислоту из a из четвертой CRI (Замена 4); замены по меньшей мере 1 аминокислоты из c из третьей на по меньшей мере 1 аминокислоту из c из четвертой CRI (Замена 5); и замены по

меньшей мере 1 аминокислоты из g из третьей на по меньшей мере 1 аминокислоту g из четвертой CRI (Замена 6), где первая CRI и третья CRI отличаются друг от друга и специфично связываются друг с другом при физиологических условиях.

Предпочтительно, чтобы обе HRI и HRII были определены, поскольку обе необходимы для обеспечения возможности гетеродимеризации двух цепей аминокислот.

Этап (ii) включает для каждой данной CRI выравнивание последовательностей и указание соответствующих N- и C-концевых аминокислот бета-цепи и промежуточной последовательности.

В пятом аспекте настоящего изобретения предложен способ получения цепи аминокислот I с определенной (установленной) последовательностью HRI и/или цепи аминокислот II с определенной (установленной) последовательностью HRII, включающий этап внедрения нуклеиновой кислоты, кодирующей цепь аминокислот I и/или цепь аминокислот II, в клетку-хозяина и экспрессии цепи аминокислот I и/или II.

В шестом аспекте настоящего изобретения предложен белковый комплекс для применения в качестве лекарственного средства.

В некотором варианте реализации белковый комплекс предназначен для применения для профилактики, лечения или диагностики расстройства или заболевания, такого как, но не ограничиваясь перечисленными: воспалительные заболевания, аутоиммунные заболевания, аллергические заболевания, пролиферативные заболевания, заболевания ракового типа, состояния кожи, эндокринные заболевания, заболевания и нарушения глаз, генетические нарушения, метаболические заболевания, инфекционные заболевания, заболевания кишечника, неврологические расстройства и психическое заболевание.

Следующие примеры всего лишь поясняют настоящее изобретение и не должны истолковываться как каким-либо образом ограничивающие объем настоящего изобретения, который определяется прилагаемой формулой изобретения.

Примеры

Пример 1. Гетеродимеризующаяся часть Fc

Гетеродимеризующуюся часть Fc антитела получали, применяя комбинацию константных доменов CH1 из IgG1 и Ig-каппа в качестве второй CRI и четвертой CRI, соответственно, вместе с остатками CH3 из IgG1 в качестве последовательностей первой CRI и третьей CRI с составами последовательностей 1, 2 (№ 43 - 51) и 3 (№ 103 - 132) в

случае комбинации CH1-CH3 (CH31), а также 1, 2 (№ 45 - 51) и 3 (№ 103 - 129) в случае комбинации CLk-CH3 (CH3k). Дополнительно к указанным последовательностям, остаток 37 CH3 перенесли на последовательность третьей CRI CLk, принимая во внимание его потенциальное участие в стабилизации структуры элементов CH3, внедренных в рамках последовательностей с 1 по 3. Последовательности CH31 и CH3k представлены на фигуре 8. Для того чтобы получить полностью функциональную часть Fc, обозначенную Fc1k, оба домена соединяли с С-концом доменов IgG1 шарнир-CH2 (фиг. 9). Для того чтобы подтвердить способность Fc1k гетеродимеризоваться, клонировали и получали две молекулы, обе из которых содержали scFv13.7 (рецептор фактора некроза опухоли 1, TNFR1), соединенный с первой Fc-цепью посредством шарнирной последовательности IgG1, и вторую цепь, содержащую только шарнирную последовательность и домены Fc (фиг. 10). Тогда как одна конструкция несла гетеродимеризующуюся часть Fc CH2-CH31/CH2-CH3k, вторая молекула содержала немодифицированную часть Fc CH2-CH3 дикого типа. Оба белка очищали с помощью аффинной хроматографии на белке А. В восстанавливающих условиях для scFv13.7-шарнир-Fc1k обнаружили две основные полосы, соответствующие рассчитанным молекулярным массам (фиг. 11a - с, тяжелая цепь 50 кДа, легкая цепь 24 кДа). Кроме того, под полосой легкой цепи появилась вторая полоса с более низкой молекулярной массой, показывающая не гликозилированную или менее гликозилированную легкую цепь. В невосстанавливающих условиях была видна одна преобладающая полоса, показывающая правильно сформированный гетеродимер (74 кДа). Тем не менее, дополнительные полосы с более низкими молекулярными массами указывали на присутствие мономерной тяжелой цепи или димеризованной легкой цепи (прибл. 50 кДа) и меньшего размера продукты деградации или нелигированной легкой цепи (прибл. 25 кДа). Данное наблюдение подтвердили с помощью анализа ЭХ. Преобладающий пик на прибл. 14,5 мин представлял правильно собранный scFv13.7-Fc1k белок, тогда как минорный пик на прибл. 16,5 мин снова можно было объяснить мономерной тяжелой цепью или димеризованной легкой цепью. Напротив, scFv13.7-Fc дополнительно образовывал димеры тяжелой цепи, что видно на ЭФ в ПААГ/ДСН (прибл. 160 кДа, фиг. 11d - e) и в анализе ЭХ (прибл. 13,8 мин). Снижение минорной полосы на ЭФ в ПААГ/ДСН (прибл. 50 кДа) или уменьшение минорных пиков в анализе ЭХ (прибл. 16,5 мин) по сравнению с scFv13.7-Fc1k свидетельствует о небольшой склонности легких цепей образовывать гомодимеры, подтверждая допущение, что минорные полосы в случае scFv13.7-Fc1k скорее представляют собой мономерную тяжелую цепь, чем димеризованную легкую цепь.

Дополнительные минорные пики с более коротким временем удерживания, наблюдаемые в анализе ЭХ, показывающие агрегированные или мультимеризованные виды белков, наблюдали для обоих белков.

Пример 2. Fv13.7-Fc1k.

Формат Fab-подобных антител, которые содержат функциональную бивалентную Fc-часть, создавали путем слияния каждого из переменных доменов Fab13.7 с одной Fc-цепью, состоящей из CH2 и CH31 или CH2 и CH3k, посредством линкера GTG3SG (фиг. 12). Кроме того, в CH2 вносили мутации (A327G, A330S и P331S, нумерация EU), чтобы избежать связывания с Fcγ-рецепторами и белком комплемента C1q (Richter и др., 2013). Кодон-оптимизированные последовательности ДНК CH2-CH31 и CH2-CH3k (GeneArt™), содержащие N-концевой линкер (GTG₃SG), встраивали в pSecTagA-L1, содержащий либо VH13.7, либо VL13.7, после расщепления посредством KpnI и EcoRI.

Fv13.7-Fc1k экспрессировали во временно трансфицированных клетках HEK293-6E после совместного введения двух плазмид, кодирующих либо VH13.7-CH2-CH31, либо VL13.7-CH2-CH3k, применяя полиэтиленимин в качестве трансфицирующего реагента. Белок, секретированный в культуральный супернатант, очищали с помощью аффинной хроматографии на белке A (14,6 мг/л, см. таблицу 1), с последующим этапом препаративной эксклюзионной хроматографии (ЭХ, конечный выход 4,1 мг/л). Исследовали способность отдельных фракций вызывать активацию TNFR1. Отрицательные фракции (результаты не представлены), что указывало на правильно собранный белок (рисунок на фиг. 13а), объединяли. Для Fv13.7-Fc1k выявили две полосы немного отличающегося размера в восстанавливающих условиях и одну полосу в невосстанавливающих условиях при ЭФ в ПААГ/ДСН, все полосы соответствовали рассчитанным молекулярным массам (фиг. 13b). Аналогично, в нативных условиях в анализе ЭХ был виден один главный пик, который сопровождался минорным пиком, представляющим незначительную долю агрегированных или мультимеризованных видов белков (фиг. 13с).

Таблица 1. Продукция и очистка Fv13.7-Fc1k.

Белок	Конц.	Объем	Общий	Объем	Выход
	[мг/мл]	образца	белок [мг]	культуры	[мг/л]
		[мл]		[л]	

Белок А	4,01	2,40	9,6	0,66	14,6
Концентрированный	12,02	0,50	6,0	0,66	9,1
ЖХБР	0,90	3,00	2,7	0,66	4,1

ЖХБР - жидкостная хроматография быстрого разрешения

Fv13.7-Fc1k связывался с иммобилизованным TNFR1 человека в ELISA с EC_{50} значением, равным 1,2 нМ, что представляет в 1,9 раз более низкую аффинность связывания по сравнению с Fab13.7 (таблица 2, фиг. 14). В соответствии с Fab13.7, Fv13.7-Fc1k не вызывал опосредованное TNFR1 высвобождение IL-8 из клеток HT1080, в противоположность активации рецептора, наблюдаемой в случае атросаба (фиг. 15a). Более того, Fv13.7-Fc1k ингибировал опосредованное TNFR1 высвобождение IL-8, вызванное 0,1 нМ TNF, из клеток HT1080 со значением IC_{50} , равным 39,7 нМ. По сравнению с Fab13.7, Fv13.7-Fc1k проявил в 1,5 раза более низкую биологическую активность, тем не менее, по сравнению с атросабом, ингибиторная способность была выше в 2,5 раза (фиг. 15b, таблица 2). Для того чтобы дополнительно прояснить возможность применения Fv13.7-Fc1k в качестве терапевтического агента, определяли фармакокинетические свойства *in vivo*, используя мышей с нокином TNFR1_{ecd} человека, которые генетически сконструированы для экспрессии внеклеточного домена TNFR1 человека вместо белка мыши. В случае атросаба определяли конечный период полувыведения, равный 29,1 ч, и площадь под кривой, равную 526,4 ч*мкг/мл, представляющие относительную меру биодоступности терапевтического агента (фиг. 16, таблица 2). Вследствие большой молекулярной массы и возможности опосредованной FcRn утилизации лекарственного средства, для атросаба будут ожидать более высокие значения. Тем не менее, в используемых здесь условиях эксперимента с низкой дозой инъекции (25 мкг/животное) и в присутствии целевого антигена (TNFR1 человека), атросаб выводился посредством вторичного эффекта опосредованного мишенью клиренса (Richter и др., готовится к публикации). Для Fv13.7-Fc1k выявили уменьшение значений конечного периода полувыведения и площади под кривой в 2,1 и 2,0 раза, соответственно, по сравнению с атросабом. Важнее, тем не менее, что по сравнению с Fab13.7, для Fv13.7-Fc1k выявили в 10 раз лучший конечный период полувыведения и в 65 раз большую площадь под кривой.

Таблица 2. Функциональные данные для Fv13.7-Fc1k.

Молекула	Связывание в ELISA, EC ₅₀ [нМ]	Ингибирован ие IL-8 IC ₅₀ [нМ]	Начальный период полувыведения [ч]	Конечный период полувыведения [ч]	Площадь под кривой [ч*мкг/мл]
Агросаб		97,78	0,59 ± 0,21	29,09 ± 7,60	526,44 ± 87,94
Fab13.7	0,61	26,32	0,08 ± 0,06	1,36 ± 0,91	4,03 ± 0,34
Fv13.7- Fc1k	1,18	39,71	2,83 ± 1,85	13,68 ± 2,43	261,84 ± 68,61

Примеры 3 - 6. Получение двух- или трехвалентных и биспецифических слитых белков scFv-Fc.

Кроме того, гетеродимеризующую часть Fc Fc1k применяли для получения двух- или трехвалентных и биспецифических слитых белков scFv-Fc, чтобы перенацелить экспрессирующие CD3 Т-клетки на экспрессирующие FAP опухолевые клетки или на опухолевые клетки, которые окружены экспрессирующими FAP фибробластами. Следовательно, молекулы scFvhu36 (нацеливание на FAP) и scFvhuU3 (нацеливание на CD3) были слиты либо с N-, либо с C-концом Fc1k. Все конструкции также создавали, применяя шарнирную область IgG1 без цистеинов, чтобы исследовать важность опосредованных шарниром ковалентных связей. Созданные конструкции содержали либо одну нацеленную на FAP молекулу и одну нацеленную на CD3 молекулу, обе на N-конце (FAP_N-CH3_N-hFc[с цистеинами в шарнирной области], пример 3a, и FAP_N-CH3_N-Fc[без цистеинов в шарнирной области], пример 3b, фиг. 17), либо одну нацеленную на FAP молекулу на N-конце и одну нацеленную на CD3 молекулу на C-конце (FAP_N-CH3_C-hFc, пример 4a, и FAP_N-CH3_C-Fc, пример 4b, фиг. 18). Более того, создали конструкции, содержащие две нацеленные на FAP молекулы на N-конце и одну нацеленную на CD3 молекулу на C-конце (FAP_{NN}-CH3_C-hFc, пример 5a, и FAP_{NN}-CH3_C-Fc, пример 5b, фиг. 19), а также конструкции, содержащие одну нацеленную на FAP молекулу на N-конце, а также одну нацеленную на FAP молекулу на C-конце и одну нацеленную на CD3 молекулу на C-конце (FAP_{NC}-CH3_C-hFc, пример 6a, и FAP_{NC}-CH3_C-Fc, пример 6b, фиг. 20). Получение и определение характеристик данных слитых белков все еще идет.

Пример 7. Получение бивалентных IgG-подобных антител.

Представленный в данной заявке набор инструментов для получения гетеродимеризующихся доменов Ig обеспечивает возможность получения бивалентных IgG-подобных антител. Для этого нужно получить гетеродимеризующуюся часть Fc, в которой последовательности первой CRI и третьей CRI невозможно получить из CH1 и CLкаппа/лямбда. Можно использовать последовательности первой CRI и третьей CRI, например, из FcRn-альфа-3 и бета-2-микроглобулина в комбинации с последовательностями второй CRI и четвертой CRI из CH3, в результате чего образуются новые домены FcRnH3 и b2mH3. Предполагаемая структура донорной последовательности (1, 2 [41 - 45], 3 [109 - 127] и дополнительные остатки [47, 49 и 107]) показаны на фигуре 21a. Аналогично Fc1k, далее можно получить полноразмерную часть Fc (Fcb2Rn).

Для того чтобы получить IgG-подобную молекулу, одно плечо Fab можно оставить нетронутым. Тем не менее, чтобы избежать неправильного спаривания тяжелой и легкой цепей, необходимо получить другую пару гетеродимеризующихся доменов как основу для Fab-подобного второго плеча IgG. Можно использовать последовательности первой CRI и третьей CRI, например, из TCR-альфа-2 и TCR-бета-2, вместе с последовательностями второй CRI и четвертой CRI из CH1 и CLk, соответственно, в результате получая домены TCRaH1 и TCRbLk, которые соединятся с FabTCR после слияния с C-концами VH и VL с желательной специфичностью. Предполагаемая структура последовательности второй CRI и четвертой CRI (1, 2 [41 - 45], 3 [109 - 127] и дополнительный остаток [81]) показана на фигуре 21a. Вся конструкция молекулы показана на фигуре 22.

Пример 8. Fv13.7x-Fc1k.

Формат Fab-подобных антител, которые содержат функциональную бивалентную Fc-часть, создавали путем слияния каждого из переменных доменов Fab13.7 с одной Fc-цепью, состоящей из CH2 и CH31 или CH2 и CH3k, посредством линкера GTG3SG (фиг. 23). Кроме того, в CH2 вносили мутации (A327G, A330S и P331S, нумерация EU), чтобы избежать связывания с Fcγ-рецепторами и белком комплемента C1q (Richter и др. 2013). Кодон-оптимизированные последовательности ДНК CH2-CH31 и CH2-CH3k (GeneArt™), содержащие N-концевой линкер (GTG3SG), встраивали в pSecTagA-L1, содержащий либо VH13.7, либо VL13.7 после расщепления посредством KpnI и EcoRI. В противоположность ранее описанному Fv13.7-Fc1k (пример 2), в случае Fv13.7x-Fc1k VH13.7 соединяли N-

концом с полипептидной цепью, содержащей CH2 и CH3k, тогда как VL13.7 соединяли N-концом с полипептидной цепью, содержащей CH2 и CH3l.

Fv13.7_х-Fc1k экспрессировали во временно трансфицированных клетках НЕК293-6Е после совместного введения двух плазмид, кодирующих либо VH13.7-CH2-CH3k, либо VL13.7-CH2-CH3l, применяя полиэтиленимин в качестве трансфицирующего реагента. Белок, секретированный в культуральный супернатант, очищали с помощью аффинной хроматографии на белке А, с последующим этапом препаративной эксклюзионной хроматографии. Объединяли собранные фракции пика, представляющего интактный и гетеродимерно соединенный белок (фиг. 24a). После очистки на белке L для Fv13.7_х-Fc1k выявили две полосы различного размера в восстанавливающих условиях и одну полосу в невосстанавливающих условиях при ЭФ в ПААГ/ДСН, все полосы соответствовали рассчитанным молекулярным массам (фиг. 24b). Аналогично, в нативных условиях в анализе ЭХ был виден один главный пик, который сопровождался минорным пиком, представляющим незначительную долю агрегированных/мультимеризованных видов белков или, также, незначительную долю свободной отдельной полипептидной цепи (фиг. 24c).

Fv13.7_х-Fc1k связывался с иммобилизованным TNFR1 человека в ELISA со значением EC₅₀, равным 1,9 нМ, демонстрируя в 2,1 раза более низкую аффинность связывания по сравнению с Fab13.7 (таблица 3, фиг. 24d). В соответствии с Fab13.7, Fv13.7_х-Fc1k не вызывал опосредованное TNFR1 высвобождение IL-8 из клеток HT1080 (фиг. 24e), в противоположность активации рецептора, ранее наблюдаемой в случае атросаба (фиг. 15a). Стоит отметить, что активацию TNFR1 на поверхности клеток HT1080 атросабом в анализе высвобождения IL-8 не всякий раз можно было наблюдать, наиболее вероятно, вследствие возможных изменений в используемых материалах (ELISA Kit) или изменений между партиями клеток. Тем не менее, Fv13.7_х-Fc1k ингибировал опосредованное TNFR1 высвобождение IL-8, вызванное 0,1 нМ TNF, со значением IC₅₀, равным 48 нМ. По сравнению с Fab13.7, у Fv13.7_х-Fc1k выявили в 3,7 раза более низкую биологическую активность, тем не менее, по сравнению с атросабом, ингибиторная способность была выше в 2,8 раз (фиг. 24f, таблица 3). Дальнейшее получение и определение характеристик данного слитого белка все еще продолжается.

Таблица 3. Функциональные данные для Fv13.7_х-Fc1k

Молекула	Связывание в ELISA, EC ₅₀ [нМ]	Ингибирование IL- 8 IC ₅₀ [нМ]
АТРОСАБ	0,4	136
Fab13.7	0,9	13
Fv13.7х-Fc1k	1,9	48

Пример 9. FvCD3-Fc1k-scFvHer3.

Биспецифическую молекулу на основе формата Fab-подобных антител, описанных в примерах 2 и 8, получали путем слияния двух одноцепочечных вариабельных фрагментов (scFv) нацеленного на Her3 антитела с С-концами содержащих CH31 и CH3k полипептидных цепей CD3-специфичного модуля Fv-Fc1k (фиг. 25). Соединение осуществляли с помощью полученного из шарнира полипептидного линкера (таблица 5), используя сайты рестрикции KasI и EcoRI. В целом, данный формат обладает потенциалом применения в качестве платформенной технологии для разработки разнообразных би- и мультиспецифических привлекающих иммунные клетки молекул путем замены связывающих мишень частей scFv на альтернативные scFv или любой тип связывающего домена, нацеленного на один или, возможно, два различных опухолевых антигена или опухолеассоциированных антигена. Получение и определение характеристик данного слитого белка все еще продолжается.

Пример 10. Биспецифический слитый белок scFv-Fc, специфичный к TNFR1 и CD3 человека.

На основе молекулы, описанной в качестве примера 3а, получали другой биспецифический слитый белок scFv-Fc (13.7_N-CD3_N-hFc1k), содержащий scFv-части, направленные против CD3 и TNFR1 человека, которые были слиты с N-концами содержащих шарнир цепей Fc1k (фиг. 26).

13.7_N-CD3_N-hFc1k получали в клетках HEK293-6E после временной трансфекции двумя векторами pSecTagAL1, каждый из которых кодировал одну из указанных двух полипептидных цепей, применяя полиэтиленимин в качестве трансфицирующего реагента. Анализ методом ЭФ в ПААГ/ДСН после очистки с применением аффинной хроматографии на белке А и последующей препаративной ЭХ выявил две полосы в восстанавливающих условиях и одну преобладающую полосу в невосстанавливающих условиях, обе полосы

соответствовали рассчитанным молекулярным массам (фиг. 27b). Минорные полосы, наблюдаемые при обоих условиях, вероятно, представляют частичные различия в статусе гликозилирования экспрессированного белка. Более того, для 13.7_N-CD3_N-hFc1k выявили один отдельный пик в аналитической ЭХ (фиг. 27c). Связывание 13.7_N-CD3_N-hFc1k со слитым белком TNFR1 человека-Fc анализировали с помощью ELISA, получив значение EC₅₀, равное 3,5 нМ (фиг. 27d, таблица 4). Кроме того, 13.7_N-CD3_N-hFc1k связывался с TNFR1 и CD3 на поверхности HT1080 (фиг. 27e) и трансфицированных CD3 клеток Jurkat (фиг. 27f) со значениями EC₅₀, равными 3,7 нМ и 1,6 нМ, соответственно. Наконец, определяли биологическую активность 13.7_N-CD3_N-hFc1k, которая отражалась в способности снижать жизнеспособность целевых клеток (экспрессирующих TNFR1 клеток HT1080) в присутствии мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), при этом значение IC₅₀ составляло 0,8 нМ и остаточная жизнеспособность составляла 40% при концентрациях выше 10 нМ (фиг. 27g). Дальнейшее получение и определение характеристик данного слитого белка все еще продолжается.

Пример 11. Биспецифический слитый белок scFv-Fc, специфичный к Her3 и CD3 человека.

На основе молекулы, описанной в качестве примера 3а, получали другой биспецифический слитый белок scFv-Fc (Her3_N-CD3_N-hFc1k), содержащий scFv-части, направленные против CD3 и Her3 (рецептор эпидермального фактора роста 3 человека, также называемый ErbB3), которые были слиты с N-концами содержащих шарнир цепей Fc1k (фиг. 28).

Her3_N-CD3_N-hFc1k получали в клетках HEK293-6E после временной трансфекции двумя векторами pSecTagAL1, каждый из которых кодировал одну из указанных двух полипептидных цепей, применяя полиэтиленмин в качестве трансфицирующего реагента. Анализ методом ЭФ в ПААГ/ДСН после очистки с применением аффинной хроматографии на белке А и последующей препаративной ЭХ выявил две полосы в восстанавливающих условиях и одну преобладающую полосу в невосстанавливающих условиях, обе полосы соответствовали рассчитанным молекулярным массам (фиг. 29b). Минорные полосы, наблюдаемые при обоих условиях, вероятно, представляют частичные различия в статусе гликозилирования экспрессированного белка. Более того, для Her3_N-CD3_N-hFc1k выявили один отдельный пик в аналитической ЭХ (фиг. 29c). Связывание Her3_N-CD3_N-hFc1k с иммобилизованным слитым белком Her3-Fc анализировали с помощью ELISA, получив

значение EC_{50} , равное 1,0 нМ (фиг. 29d, таблица 4). Дальнейшее получение и определение характеристик данного слитого белка все еще продолжается.

Пример 12. Биспецифический слитый белок scFv-Fc, специфичный к MCSP и CD3 человека.

На основе молекулы, описанной в качестве примера 3а, получали другой биспецифический слитый белок scFv-Fc ($MCSP_N$ - $CD3_N$ -hFc1k), содержащий scFv-части, направленные против CD3 и MCSP человека (ассоциированный с меланомой хондроитинсульфат-протеогликан), которые были слиты с N-концами содержащих шарнир цепей Fc1k (фиг. 30).

$MCSP_N$ - $CD3_N$ -hFc1k получали в клетках HEK293-6E после временной трансфекции двумя векторами pSecTagAL1, каждый из которых кодировал одну из указанных двух полипептидных цепей, применяя полиэтиленмин в качестве трансфицирующего реагента. Анализ методом ЭФ в ПААГ/ДСН после очистки с применением аффинной хроматографии на белке А и последующей препаративной ЭХ выявил две полосы в восстанавливающих условиях и одну преобладающую полосу в невосстанавливающих условиях, обе полосы соответствовали рассчитанным молекулярным массам (фиг. 31b). Минорные полосы, наблюдаемые при обоих условиях, вероятно, представляют частичные различия в статусе гликозилирования экспрессированного белка. Более того, для $MCSP_N$ - $CD3_N$ -hFc1k выявили один отдельный пик в аналитической ЭХ (фиг. 31c). Определяли биологическую активность $MCSP_N$ - $CD3_N$ -hFc1k, которая отражалась в способности снижать жизнеспособность целевых клеток в присутствии моноклеарных клеток периферической крови (МКПК), получив значение EC_{50} , равное 0,2 нМ, при применении экспрессирующих MCSP клеток WM35 (фиг. 31d, таблица 4). Дальнейшее получение и определение характеристик данного слитого белка все еще продолжается.

Пример 13. Биспецифический слитый белок scFv-Fc, специфичный к Her3 и CD3, с противоположной ориентацией.

На основе молекулы, описанной в качестве примера 4а, получали другой биспецифический слитый белок scFv-Fc ($Her3_N$ - $CD3_C$ -hFc1k), содержащий scFv-части, направленные против CD3 и Her3 (рецептор эпидермального фактора роста 3 человека,

также называемый ErbB3), которые были слиты с N-концом содержащей шарнир цепи CH2-CH31 и с C-концом цепи CH2-CH3k Fc1k, соответственно (фиг. 32).

Her3_N-CD3_C-hFc1k получали в клетках HEK293-6E после временной трансфекции двумя векторами pSecTagAL1, каждый из которых кодировал одну из указанных двух полипептидных цепей, применяя полиэтиленмин в качестве трансфицирующего реагента. Анализ методом ЭФ в ПААГ/ДСН после очистки с применением аффинной хроматографии на белке А и последующей препаративной ЭХ выявил две полосы в восстанавливающих условиях и одну преобладающую полосу в невосстанавливающих условиях, обе полосы соответствовали рассчитанным молекулярным массам (фиг. 33b). Минорные полосы, наблюдаемые при обоих условиях, вероятно, представляют частичные различия в статусе гликозилирования экспрессированного белка. Связывание Her3_N-CD3_C-hFc1k с иммобилизованным слитым белком Her3-Fc анализировали с помощью ELISA, получив значение EC₅₀, равное 0,1 нМ (фиг. 33с, таблица 4). Дальнейшее получение и определение характеристик данного слитого белка все еще продолжается.

Таблица 4. Функциональные данные для примеров 10 - 13.

Молекула	Связывание в ELISA, EC ₅₀ [нМ]	Связывание мишени в FACS, EC ₅₀ [нМ]	Связывание CD3 в FACS, EC ₅₀ [нМ]	Цитотоксичность IC ₅₀ [нМ]
13.7 _N -CD3 _N -hFc1k	3,5	3,7	1,6	0,8
Her3 _N -CD3 _N -hFc1k	1,0			
MCSP _N -CD3 _N -hFc1k				0,2
Her3 _N -CD3 _C -hFc1k	0,1			

Таблица 5. Варианты линкеров, используемых в примерах 1 - 13.

Пример	Молекула	N-концевой домен	Последовательность линкера	C-концевой домен
2 и 8	Fv-Fc1k	VH/VL	GTGGGSG	CH2
с 3а по 6 а	scFv _N -Fc1k	scFv	GGGGSGGGSGGGGS	Шарнир
с 3а по 6 а	scFv _C -Fc1k	CH3k	GGGGSGGGSGGGSGT	scFvCD3
с 3b по 6 b	scFv _N -Fc1k	scFv	SG	Шарнир без цистеинов
с 3b по 6 b	scFv _C -Fc1k	CH3k	GGGGSGGGSGGGSGT	scFvCD3
9	Fv-Fc1k-scFv	VH/VL	GTGGGSG	CH2

9	Fv-Fc1k-scFv	CH31/CH3k	DKTHTAPAPPVAG	scFv
с 10 по 12	scFv-Fc1k	scFv(мишень)	AAA	Шарнир-CH2-CH31
с 10 по 12	scFv-Fc1k	scFvCD3	GGGSGGGSGGGGS	Шарнир-CH2-CH3k
13	scFv _N -Fc1k	scFv(мишень)	AAA	Шарнир-CH2-CH31
13	scFv _C -Fc1k	CH3k	GGGSGGGSGGGSGGT	scFvCD3

Подстрочные буквы (N и C) указывают на положение scFv по отношению к Fc1k-части (N-концевое/C-концевое).

Пример 14. Дополнительное определение характеристик Fv13.7_х-Fc1k.

Fab-подобную моновалентную молекулу, описанную в примере 8, экспрессировали в клетках CHO из пула клеток после стабильной лентивирусной трансфекции в Catalent Pharma Solutions (Сомерсет, Юинг, Нью-Джерси, США). Белок сначала очищали, применяя белок А, а затем выделяли мономерную фракцию с помощью ЖХБР-ЭХ. Для конечного препарата Fv13.7_х-Fc1k выявили одиночный пик в аналитической ВЭЖХ-ЭХ (фиг. 35а), соответствующий рассчитанной молекулярной массе 72 кДа. В ЭФ в ПААГ/ДСН в восстанавливающих условиях наблюдали две полосы, которые мигрировали аналогично эталонным полосам 35 кДа и 40 кДа, что вполне соответствовало рассчитанным молекулярным массам отдельных цепей, равным 35 и 37 кДа. В невосстанавливающих условиях наблюдаемая одна полоса мигрировала аналогично эталонной полосе 70 кДа и, следовательно, свидетельствовала о правильном образовании межцепочечной дисульфидной связи. Для Fv13.7_х-Fc1k выявили температуру агрегации, равную 64 °С, что определили по динамическому рассеянию света и путем визуальной оценки зарегистрированных средних скоростей счета (фиг. 35с). Более того, Fv13.7_х-Fc1k был стабилен в плазме человека в течение по меньшей мере семи дней при 37 °С (фиг. 35d), о чем свидетельствовало сохранение активности связывания, которую определили с помощью анализа ELISA связывания huTNFR1-Fc.

Fv13.7_х-Fc1k, связывающийся с TNFR1 человека-Fc со значением EC₅₀, равным 0,37 нМ, в ELISA (фиг. 36а), проявил пониженное связывание по сравнению с контрольными белками атросабом и Fab 13.7, у которых выявили значения EC₅₀, равные 0,09 нМ и 0,17 нМ, соответственно. В анализе связывания в реальном времени с применением QCM (Attana, Стокгольм, Швеция), Fv13.7_х-Fc1k связывался с TNFR1 человека-Fc со значением K_D, равным 2,66 нМ (фиг. 36b), полученным по значению k_{off}, равному 9,83 x 10⁴ с⁻¹, а также по значению k_{on}, равному 3,69 x 10⁵ M⁻¹с⁻¹. Более того, Fv13.7_х-Fc1k содержит модификации внутри Fc-части, чтобы уменьшить склонность к опосредованию антителозависимого

клеточного фагоцитоза (АЗКФ), АЗКЦ и комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ) (Armour и др. (1999) Eur J Immunol. 29(8):2613-24, Shields и др. (2001) J Biol Chem. 276(9):6591-604). Соответственно, связывание рецепторов Fcγ I, II и III человека, а также связывание белка комплемента C1q человека с Fv13.7х-Fc1k явно снизилось по сравнению с контрольным антителом ретуксимабом, содержащим Fc-часть дикого типа (фиг. 36с). Аналогично, выявили пониженное связывание FcγRI, II и III, а также C1q с аналогичным образом мутированным антителом атросабом, которое проявило пониженное опосредование АЗКЦ и КЗЦ в ранее опубликованных экспериментах (Richter и др., (2013) PLoS One 8(8):e72156).

Аналогично моновалентному контрольному белку Fab 13.7, для Fv13.7х-Fc1k не выявили признаков активации TNFR1 самого по себе в экспериментах по высвобождению IL-6 и IL-8, а также в анализе индукции гибели клеток с применением HeLa. Клетки HT1080 и Кум-1, соответственно (фиг. 37а - с). Эти результаты были явно противоположны таковым для контрольного белка атросаб, который вызывал незначительные клеточные ответы в экспериментах по высвобождению IL-6 и IL-8 при концентрациях от 1 до 100 нМ (фиг. 37а и b). Более того, выявили эффективное ингибирование посредством Fv13.7х-Fc1k опосредованной TNF активации TNFR1 в анализе высвобождения IL-6 и IL-8 и индукции гибели клеток (фиг. 37d - f), со значениями IC₅₀, равными 54,5 нМ, 24,2 нМ и 16,2 нМ, соответственно. Тем не менее, данные значения свидетельствовали о немного более слабой биологической активности по сравнению с Fab 13.7 со значениями IC₅₀, составляющими 31,7 нМ, 12,7 нМ, 9,5 нМ, в экспериментах по высвобождению IL-6 и IL-8 и в анализе индукции гибели клеток с применением клеток HeLa и HT1080, а также Кум-1, соответственно. Стоит отметить, что ингибиторная активность Fv13.7х-Fc1k, тем не менее, явно улучшилась по сравнению с бивалентным контрольным белком атросабом, для которого значения IC₅₀ составляли 164,7 нМ, 84,1 нМ, а также 64,4 нМ в экспериментах по высвобождению IL-6 и IL-8 и в анализе индукции гибели клеток.

Таблица 6. Биологическая активность Fv13.7х-Fc1k

Эксперимент	Fv13.7х-Fc1k	Fab 13.7	Атросаб
IC ₅₀ , IL-6 [нМ]	54,5	37,1	164,7
IC ₅₀ , IL-8 [нМ]	24,2	12,7	84,1
IC ₅₀ , индукция гибели клеток [нМ]	16,2	9,5	64,4

Для того чтобы дополнительно оценить биологическую активность Fv13.7_x-Fc1k в условиях опосредованного антителом образования перекрестных связей, Fv13.7_x-Fc1k анализировали в экспериментах по высвобождению IL-8 в присутствии постоянной концентрации специфичных к лекарственному средству антител (фиг. 38а - с). В противоположность контрольному антителу атросабу, выявили полное отсутствие агонистической активности у Fv13.7_x-Fc1k, а также соответствующего Fab 13.7 в анализе высвобождения IL-8, применяя три различных препарата сыворотки козы против IgG человека (фиг. 38а: SouthernBiotech, номер в каталоге: 2010-01 [IgG_A], фиг. 38b: MyBioSource, номер в каталоге: MBS571163 [IgG_B], фиг. 38с: MyBioSource, номер в каталоге: MBS571678 [IgG_C]). В заключение, данный результат может свидетельствовать о сниженном риске активации TNFR1 посредством Fv13.7_x-Fc1k *in vivo* в условиях иммунного ответа против лекарственного средства.

Наконец, для Fv13.7_x-Fc1k выявили исходный и конечный периоды полувыведения, равные $2,2 \pm 1,2$ ч и $41,8 \pm 18,1$ ч, соответственно, и площадь под кривой, равную 5856 ± 1370 мкг/мл*ч, после инъекции одной дозы 400 мкг (20 мг/кг) мышам C56BL/6J с нокином, несущим ген внеклеточного домена TNFR1 человека в соответствующем локусе мыши.

Материалы

Конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP) антитела против IgG человека (Fab-специфичные) приобретали у Sigma (Тауфкирхен, Германия). Клетки HT1080 дикого типа (HT1080дт) растили в среде RPMI 1640, дополненной 5% эмбриональной телячьей сыворотки ЭТС, 2 mM L-глутамином. Атросаб и слитый белок TNFR1 человека-Fc был предоставлен Valiopharm AG (Базель, Швейцария). Химические реактивы приобретали у Roth (Карлсруэ, Германия), тогда как ферменты (для клонирования и ПЦР) и дополнительные реагенты приобретали у ThermoFisher (Мюнхен, Германия). Все различные источники расходных материалов явно указаны ниже.

Методы.

Выравнивание гетеродимеризующихся и функциональных Ig и Ig-подобных доменов.

- 1) Множественное выравнивание последовательностей осуществляли, применяя инструмент в сети интернет Clustal omega.
- 2) Определения складчатых бета-слоев в файлах pdb выделены в указанных последовательностях.

- 3) Если не все бета-слои вторичной структуры были определены или не были определены вообще (отмечено звездочкой на фиг. 4), то осуществляли предсказание вторичных структур согласно JPred (наиболее длинное кумулятивное предсказание с применением установок по умолчанию).
- 4) Начальные и конечные положения складчатых бета-слоев A - G выравнивали согласно дополнительному структурному выравниванию файлов PDB после включения ранее не присвоенных остатков в указанные слои или исключения ранее присвоенных остатков из слоев, а также делеции гэпов, введенных при множественном выравнивании последовательностей, или, в 4 исключениях, путем вставки новых гэпов за пределами складчатых бета-слоев (d_CH3: положение 111 в IgLCRC; m_CH1: положение 72 в IgLCRC; HLAA/HLAB: положение 60 в IgLCRC, фиг. 4). Вставленные/удлиненные или удаленные/укороченные положения гэпов компенсировали делецией или вставкой положений гэпов в следующий уже существующий гэп, введенный во время множественного выравнивания последовательностей, соответственно, чтобы сохранить выравнивание последовательностей в областях, расположенных ближе к С-концу.
- 5) Бета-слой A определяли с помощью данных средств как шесть остатков, следующих за консервативным остатком пролина, находящимся с N-конца от предсказанного первого бета-слоя (положения 13 - 18 в IgLCRC).
- 6) Бета-слой B определяли как четыре соседних остатка с N-конца и пять соседних остатков с С-конца от консервативного остатка цистеина, включенного во второй предсказанный бета-слой (положения 31 - 40 в IgLCRC).
- 7) Бета-слой C определяли как четыре соседних остатка с N-конца и два соседних остатка с С-конца от консервативного остатка триптофана, включенного в третий предсказанный бета-слой (положения 46 – 52 в IgLCRC). Исключениями были альфа-цепь TCR и бета-2-микроглобулин. В данных случаях выравнивание осуществляли благодаря предсказанию бета-слоя и подтверждали при структурном выравнивании с применением ruMol,
- 8) Бета-слой D определяли как положения 63 – 70 в IgLCRC, хотя связь с консервативным остатком по всему выравниванию была не возможна.
- 9) Бета-слой E определяли как восемь остатков в положениях 81 - 89 в IgLCRC, начиная с консервативного остатка тирозина/фенилаланина, расположенного в начале или с N-конца четвертого предсказанного бета-слоя.

10) Бета-слой F определили как два соседних остатка с N-конца и четыре соседних остатка с C-конца от консервативного остатка цистеина, входящего в шестой предсказанный бета-слой (положения 102 - 108 в IgLCRC).

11) Бета-слой G определяли как положения 128 - 133 в IgLCRC, хотя связь с консервативным остатком по всему выравниванию была не возможна.

Экспрессия Fab13.7, Fv13.7-Fc1k, scFv13.7-Fc1k, scFv13.7-Fc.

Клетки НЕК293-6Е культивировали в суспензии в условиях экспоненциального роста в среде FreeStyle F17, содержащей 4 мМ GlutaMAX-I и 0,1% коллифор P188 (F17⁺⁺). 1,5*10⁶ клеток/мл подготовили для трансфекции с применением 1 мкг/мл плазмидной ДНК (конечная концентрация) и 3 мкг/мл полиэтиленимина (ПЭИ, конечная концентрация). Как ДНК, так и ПЭИ разбавляли в 1 мл среды F17⁺⁺ на 20 мл суспензии клеток и впоследствии смешивали. После 15 - 30 мин инкубации при комнатной температуре смесь ДНК добавляли к клеткам и инкубировали при взбалтывании в течение ночи при 37 °С и 5% CO₂. Через 24 ч добавляли 0,5 мл триптона N1 на 20 мл суспензии клеток. Белок очищали из супернатанта после дополнительных 4 дней инкубации при 37 °С и 5% CO₂.

Очистка белка. Аффинная хроматография с антителами и на белке А.

Клетки НЕК293-6Е удаляли из культуральных супернатантов путем центрифугирования (этап 1: 500 g, 15 мин; этап 2: 5000 g, 5 мин). Супернатанты инкубировали либо со смолой AFrProtein A-650F TOYOPEARL® (смола с белком А, 22805, Tosoh, Штутгарт, Германия), либо со смолой HiTrap KappaSelect (селективные к каппа-цепи фрагменты антител, конъюгированные с агарозной матрицей, 17-5458-12, GE Healthcare, Чалфонт Сейнт Джайлс, Великобритания) при вращении в течение ночи. Смолы собирали путем центрифугирования и загружали на хроматографическую колонку Poly-Prep® подачей под действием силы тяжести. Промывку проводили, применяя ФБР, и белки элюировали из смолы с помощью 100 мМ глицина при pH 2 - 3. Элюированные фракции сразу объединяли и незамедлительно проводили диализ против ФБР.

Препаративная эксклюзионная хроматография.

В случае агрегированного или мультимерного соединенного белка в препаратах, проводили дополнительный этап эксклюзионной хроматографии, применяя систему

очистки Äkta. Белки разделяли на колонке Superdex 200 10/300 GL при скорости потока 0,5 мл/мин, применяя ФБР в качестве жидкой фазы. Собирали фракции по 200 мкл и содержащие пик образцы объединяли для дальнейших экспериментов.

Определение характеристики белков: электрофорез в полиакриламидном геле (ЭФ в ПААГ/ДСН).

ЭФ в ПААГ/ДСН проводили в строгом соответствии с методом Лэммли 1970, используя 3 мкг препаратов белка и указанные проценты концентрирующего и разделяющего геля.

Определение характеристики белков: эксклюзионная хроматография (ЭХ).

Для того чтобы определить гидродинамический радиус, 30 мкг очищенных образцов белка анализировали, применяя ВЭЖХ Waters 2695 в комбинации с колонкой SEC-2000 Yagga Phenomenex (300 x 7,8 мм, скорость потока 0,5 мл/мин). Подвижная фаза представляла собой 0,1 М $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 0,1 М Na_2SO_4 , pH 6,7. Использовали следующие стандартные белки: тиреоглобулин (669 кДа), апоферритин (443 кДа), алкогольдегидрогеназу (150 кДа), БСА (66 кДа), карбоангидразу (29 кДа), пептид FLAG (1 кДа).

Твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA).

Микротитрационные планшеты покрывали 100 мкл слитого белка TNFR1-Fc (1 мкг/мл в ФБР) и инкубировали при 4 °C в течение ночи. Остальные сайты связывания блокировали с помощью 2% МФБР (обезжиренного молока в ФБР, 200 мкл на лунку) при комнатной температуре в течение 2 часов, а затем дважды промывали ФБР. 100 мкл образцов, разбавленных в 2% МФБР, инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа перед последним этапом инкубации со 100 мкл конъюгированных с HRP детектирующих антител в 2% МФБР. Связанный белок детектировали с помощью 100 мкл раствора субстрата ТМВ, реакцию HRP останавливали путем добавления 50 мкл 1 М H_2SO_4 и поглощение на длине волны 450 нм измеряли, применяя спектрофотометр для прочтения микротитрационных планшетов Infinite (TECAN, Меннедорф, Швейцария). Между каждым этапом инкубации и перед детектированием планшеты промывали три раза ФБРТ и дважды ФБР.

Проточная цитометрия.

Клетки отделяли и переносили в 96-луночный микротитрационный планшет при концентрации 100000 - 250000 на лунку в 100 мкл ФБА (2% ЭТС, 0,2% NaN₃ в стерильном ФБР). Образцы разбавляли в ФБА в двукратном размере от конечной желательной концентрации и 100 мкл добавляли к клеткам для инкубации в течение 1 часа. Затем клетки инкубировали с антителами, конъюгированными с флуоресцентными красителями, перед детектированием с применением анализатора MACSQuant® (Miltenyi Biotec, Бергш-Гладбах, Германия). Клетки промывали дважды путем центрифугирования (500 *g, 5 минут) и ресуспендировали в 150 мкл ФБА после каждого этапа инкубации.

Анализ высвобождения интерлейкинов.

2 x 10⁴ клеток HeLa или HT1080 на лунку высевали в 96-луночный микротитрационный планшет и растили в 100 мкл RPMI 1640 + 5% ЭТС в течение ночи. На следующий день супернатанты сменяли, чтобы удалить конститутивно продуцированные цитокины. Клетки инкубировали с серией разведений образцов в RPMI 1640 + 5% ЭТС при 37 °C, 5% CO₂. В случае конкурентных экспериментов, оба анализируемых образца белка получали отдельно (либо титрованными, либо разбавленными до одинаковой концентрации) и последовательно добавляли в планшет. Нестимулированные клетки служили в качестве контроля. Через 16 - 20 часов планшеты центрифугировали при 500 g в течение 5 минут и супернатанты клеток анализировали напрямую с помощью ELISA, который проводили согласно протоколу производителя. Супернатанты разбавляли в RPMI 1640 (без ЭТС) и антитела разбавляли в Reagent Diluent (0,1 % БСА, 0,05% Tween 20, 20 mM Трис, 150 mM NaCl, pH7,5). Покрытые микротитрационные планшеты блокировали, применяя 1% БСА (бычий сывороточный альбумин) в ФБР, и промывку, а также детектирование и измерение, проводили, как описано выше для ELISA. Наборы для «сэндвич»-ELISA для детектирования IL-6 и IL-8 в культуральном супернатанте приобретали у ImmunoTools (Фризайте, Германия).

Анализ цитотоксичности/жизнеспособности клеток.

Клетки (2*10⁴ на лунку) высевали в 96-луночные микротитрационные планшеты и инкубировали в течение ночи при 37 °C и 5% CO₂. Белки разбавляли в RPMI 1640 + 10% ЭТС и добавляли к клеткам вместе с 2*10⁵ МКПК/лунку. Смеси для анализа цитотоксичности инкубировали при 37 °C, 5% CO₂ в течение от 3 до 5 дней перед тем как

отбросить супернатант и добавить к клеткам 50 мкл раствора кристаллического фиолетового. Затем планшеты промывали ddH₂O 20 раз и сушили. Фиолетовый краситель, оставшийся в результате фиксации живых и адгерентных клеток метанолом, содержащимся в растворе для окрашивания, растворяли путем добавления 100 мкл метанола при взбалтывании при комнатной температуре в течение 10 минут. Планшеты подвергали измерению, применяя спектрофотометр для прочтения микротитрационных планшетов Infinite (Tecan, Меннедорф, Швейцария).

Фармакокинетика.

Трансгенным мышам C57BL/6J, несущим ген внеклеточного домена из TNFR-1 человека в локусе определенного гена мыши (C57BL/6J-huTNFRSF1Aecdtm1UEG/izi), вводили путем внутривенной инъекции с 25 мкг анализируемых белков. Образцы крови собирали через 3 мин, 30 мин, 1 ч, 3 ч и 6 ч, а также через 3 дня и 7 дней и незамедлительно инкубировали на льду. Сыворотку разделяли путем центрифугирования (13000 g, 4°C, 10 минут) и хранили при -20 °C. Оставшийся белок в сыворотке детектировали с помощью анализа связывания ELISA, описанного выше. Сигнал ELISA интерполировали с кривой связывания свежеполученного стандарта анализируемого белка. Определенные концентрации наносили на график в зависимости от времени и фармакокинетические константы получали путем анализа с применением надстройки PKsolver для Microsoft Excel.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Белковый комплекс, содержащий по меньшей мере две цепи аминокислот I и II, которые нековалентно связаны друг с другом посредством области гетеродимеризации I (HRI), содержащейся в цепи аминокислот I, и области гетеродимеризации II (HRII), содержащейся в цепи аминокислот II, причем:

- (a) HRI содержит семь антипараллельных бета-цепей AI, BI, CI, DI, EI, FI и GI, шесть промежуточных областей bI, cI, dI, eI, fI и gI, N-концевую область aI и C-концевую область hI, расположенные от N-конца к C-концу в следующем порядке:

aI-AI-bI-BI-cI-CI-dI-DI-eI-EI-fI-FI-gI-GI-hI,

причем HRI представляет собой слитый белок первой человеческой константной области иммуноглобулина или подобного иммуноглобулину белка (первой CRI, акцептора), аминокислоты которой перемежаются с аминокислотами второй человеческой константной области иммуноглобулина или подобного иммуноглобулину белка (второй CRI, донора),

где первая CRI содержит семь антипараллельных бета-цепей A1, B1, C1, D1, E1, F1 и G1, шесть промежуточных областей b1, c1, d1, e1, f1 и g1, N-концевую область a1 и C-концевую область h1, расположенные от N-конца к C-концу в следующем порядке:

a1-A1-b1-B1-c1-C1-d1-D1-e1-E1-f1-F1-g1-G1-h1,

где вторая CRI содержит семь антипараллельных бета-цепей A2, B2, C2, D2, E2, F2 и G2, шесть промежуточных областей b2, c2, d2, e2, f2 и g2, N-концевую область a2 и C-концевую область h2, расположенные от N-конца к C-концу в следующем порядке:

a2-A2-b2-B2-c2-C2-d2-D2-e2-E2-f2-F2-g2-G2-h2,

причем HRI имеет последовательность аминокислот первой CRI, и при этом по меньшей мере следующие аминокислоты первой CRI заменены на следующие аминокислоты из второй CRI:

- (i) по меньшей мере 1 аминокислота из a1 заменена на по меньшей мере 1 аминокислоту из a2 (Замена 1);
- (ii) по меньшей мере 1 аминокислота из c1 заменена на по меньшей мере 1 аминокислоту из c2 (Замена 2); и
- (iii) по меньшей мере 1 аминокислота из g1 заменена на по меньшей мере 1 аминокислоту из g2 (Замена 3);

и

- (b) HRII содержит семь антипараллельных бета-цепей AII, BII, CII, DII, EII, FII и GII, шесть промежуточных областей bII, cII, dII, eII, fII и gII, N-концевую область aII и C-концевую область hII, расположенные от N-конца к C-концу в следующем порядке:

aII-AII-bII-BII-cII-CII-dII-DII-eII-EII-fII-FII-gII-GII-hII,

причем HRII представляет собой слитый белок третьей человеческой константной области иммуноглобулина или подобного иммуноглобулину белка (третьей CRI, акцептора), аминокислоты которой перемежаются с аминокислотами четвертой человеческой константной области иммуноглобулина или подобного иммуноглобулину белка (четвертой CRI, донора), и где третья CRI содержит семь антипараллельных бета-цепей A3, B3, C3, D3, E3, F3 и G3, шесть промежуточных областей b3, c3, d3, e3, f3 и g3, N-концевую область a3 и C-концевую область h3, расположенные от N-конца к C-концу в следующем порядке:

a3-A3-b3-B3-c3-C3-d3-D3-e3-E3-f3-F3-g3-G3-h3,

где четвертая CRI содержит семь антипараллельных бета-цепей A4, B4, C4, D4, E4, F4 и G4, шесть промежуточных областей b4, c4, d4, e4, f4 и g4, N-концевую

область a4 и С-концевую область h4, расположенные от N-конца к С-концу в следующем порядке:

a4-A4-b4-B4-c4-C4-d4-D4-e4-E4-f4-F4-g4-G4-h4

причем HRII имеет последовательность аминокислот третьей CRI, и при этом по меньшей мере следующие аминокислоты третьей CRI заменены на следующие аминокислоты из четвертой CRI:

- (i) по меньшей мере 1 аминокислота из a3 заменена на по меньшей мере 1 аминокислоту из a4 (Замена 4);
- (ii) по меньшей мере 1 аминокислота из c3 заменена на по меньшей мере 1 аминокислоту из c4 (Замена 5); и
- (iii) по меньшей мере 1 аминокислота из g3 заменена на по меньшей мере 1 аминокислоту из g4 (Замена 6);

где первая CRI и третья CRI отличаются друг от друга и специфично связываются друг с другом при физиологических условиях.

2. Белковый комплекс по п. 1, отличающийся тем, что иммуноглобулин или подобные иммуноглобулинам белки выбраны из IgG1, Ig-каппа, Т-клеточного рецептора (TCR) α , TCR- β , неонатального Fc-рецептора (FcRn), β -2-микроглобулина, Ig-лямбда, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgM, лейкоцитарного антигена А или В человека (HLA) и HLA-D.
3. Белковый комплекс по п. 1 или 2, отличающийся тем, что первая CRI и третья CRI независимо выбраны из группы, состоящей из константной области тяжелой цепи 1 (CH1) IgG1, предпочтительно имеющей последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 1; константной области Igk, предпочтительно имеющей последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 18; константной области Т-клеточного рецептора (TCR) α , предпочтительно имеющей последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 10; константной области TCR- β , предпочтительно имеющей последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 11; неонатального Fc-рецептора (FcRn) альфа 3,

предпочтительно имеющего последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 12; β -2-микроглобулина, предпочтительно имеющего последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 13; константной области $Ig\lambda$, предпочтительно имеющей последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 19; $IgG2$, предпочтительно имеющего последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 2, $IgG3$, предпочтительно имеющего последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 3, $IgG4$, предпочтительно имеющего последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 4, $IgA1$, предпочтительно имеющего последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 5; $IgA2$, предпочтительно имеющего последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 6; IgD , предпочтительно имеющего последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 7; IgE , предпочтительно имеющего последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 8; IgM , предпочтительно имеющего последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 9; лейкоцитарного антигена А человека (HLA), предпочтительно имеющего последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 14, или $\alpha 3$ HLA-B, предпочтительно имеющего последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 15; $\alpha 2$ HLA-D, предпочтительно имеющего последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 16, и $\beta 2$ HLA-D, предпочтительно имеющего последовательность аминокислот, соответствующую SEQ ID NO: 17,

при этом предпочтительно выбраны следующие комбинации первой CRI и третьей CRI:

- (i) первая CRI: CH1 из $IgG1$, $IgG2$, $IgG3$, $IgG4$, $IgA1$, $IgA2$, IgD , IgE или IgM , и третья CRI: константная область $Ig\kappa$ и константная область $Ig\lambda$;
- (ii) первая CRI: константная область из TCR- α , и третья CRI: константная область из TCR- β ;
- (iii) первая CRI: альфа-3 FcRn; $\alpha 3$ HLA-A; или $\alpha 3$ HLA-B, и третья CRI: β -2-микроглобулин; и
- (iv) первая CRI: $\alpha 2$ HLA-D, и третья CRI: $\beta 2$ HLA-D.

4. Белковый комплекс по любому из пп. 1 - 3, отличающийся тем, что

- (i) вторая CRI и четвертая CRI идентичны и выбраны из группы, состоящей из CH3 из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, CH1 из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE или IgM; или IgD; CH4 из IgE или IgM; и константной области Igκ или Igλ, или
- (ii) вторая CRI и четвертая CRI выбраны независимо из группы, состоящей из CH1 из IgG1, константной области Igκ или Igλ, CH1 из IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE или IgM; CH3 из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, или IgD и CH4 из IgE или IgM.

5. Белковый комплекс по любому из пп. 1 - 4,

- (i) в котором при Замене 1 и/или 4 все аминокислоты, расположенные с N-конца от бета-цепи A (положения 1 до 12 консенсуса Ig-подобной константной области (IgLCRC, изображенного на фигуре 4)), из первой CRI или третьей CRI заменены на все аминокислоты, расположенные с N-конца от бета-слоя A (положения с 1 по 12 в IgLCRC), из второй CRI или четвертой CRI, соответственно;
- (ii) в котором в Замене 2 и/или 5 аминокислоты в IgLCRC в положениях 41 - 45, 41 - 46, 41 - 47, 41 - 48, 41 - 49, 41 - 50, 41 - 51, 42 - 45, 42 - 46, 42 - 47, 42 - 48, 42 - 49, 42 - 50, 42 - 51, 43 - 45, 43 - 46, 43 - 47, 43 - 48, 43 - 49, 43 - 50, 43 - 51, 44 - 45, 44 - 46, 44 - 47, 44 - 48, 44 - 49, 44 - 50, 44 - 51, 45 - 45, 45 - 46, 45 - 47, 45 - 48, 45 - 49, 45 - 50 или 45 - 51 первой CRI или третьей CRI заменены на аминокислоты в IgLCRC в положениях 41 - 45, 41 - 46, 41 - 47, 41 - 48, 41 - 49, 41 - 50, 41 - 51, 42 - 45, 42 - 46, 42 - 47, 42 - 48, 42 - 49, 42 - 50, 42 - 51, 43 - 45, 43 - 46, 43 - 47, 43 - 48, 43 - 49, 43 - 50, 43 - 51, 44 - 45, 44 - 46, 44 - 47, 44 - 48, 44 - 49, 44 - 50, 44 - 51, 45 - 45, 45 - 46, 45 - 47, 45 - 48, 45 - 49, 45 - 50 или 45 - 51 второй CRI или четвертой CRI, соответственно; и
- (iii) в котором при Замене 3 и/или 6 аминокислоты в IgLCRC в положениях 103 - 127, 103 - 128, 103 - 129, 103 - 130, 103 - 131, 103 - 132, 104 - 127, 104 - 128, 104 - 129, 104 - 130, 104 - 131, 104 - 132, 105 - 127, 105 - 128, 105 - 129, 105 - 130, 105 - 131, 105 - 132, 106 - 127, 106 - 128, 106 - 129, 106 - 130, 106 - 131, 106 - 132, 107 - 127, 107 - 128, 107 - 129, 107 - 130, 107 - 131, 107 - 132, 108 - 127, 108 - 128, 108 - 129, 108 - 130, 108 - 131, 108 - 132, 109 - 127, 109 - 128, 109 - 129, 109 - 130, 109 - 131 или 109 - 132 первой CRI или третьей CRI заменены на аминокислоты в IgLCRC в положениях 103 - 127, 103 - 128, 103 - 129, 103 - 130, 103 - 131, 103 - 132, 104 -

127, 104 - 128, 104 - 129, 104 - 130, 104 - 131, 104 - 132, 105 - 127, 105 - 128, 105 - 129, 105 - 130, 105 - 131, 105 - 132, 106 - 127, 106 - 128, 106 - 129, 106 - 130, 106 - 131, 106 - 132, 107 - 127, 107 - 128, 107 - 129, 107 - 130, 107 - 131, 107 - 132, 108 - 127, 108 - 128, 108 - 129, 108 - 130, 108 - 131, 108 - 132, 109 - 127, 109 - 128, 109 - 129, 109 - 130, 109 - 131 или 109 - 132 второй CRI или четвертой CRI.

6. Белковый комплекс по любому из пп. 1 - 5, отличающийся тем, что дополнительно к Замена с 1 по 6 аминокислоты из первой CRI и/или третьей CRI, соответственно, в IgLCRC в положениях 37, и/или 47, и/или 49, и/или 81, и/или 107 заменены на аминокислоты из второй CRI и/или четвертой CRI в IgLCRC в положениях 37, и/или 47, и/или 49, и/или 81, и/или 107.
7. Белковый комплекс по любому из пп. 1 - 6, отличающийся тем, что каждая из HRI и HRII содержит по меньшей мере один остаток Cys, расположенный таким образом, чтобы образовывалась ковалентная связь между HRI и HRII в IgLCRC в положении 20 (CH1 из IgG2, IgG3, IgG4 или IgM), 21 (CH1 из IgD), 135 (CH1 из IgA1 или IgA2), 138 (CH1 из IgG1 или IgE, CL из Igκ, CL из Igλ), 139 (константного домена из TCR-β) или 141 (константного домена из TCR-α), как изображено на фигуре 4, в результате образования следующих комбинаций первой CRI и третьей CRI:
 - (i) первая CRI: CH1 из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE или IgM, и третья CRI: константная область Igκ и/или константная область Igλ;
 - (ii) первая CRI: константная область из TCR-α, и третья CRI: константная область из TCR-β;
8. Белковый комплекс по любому из пп. 1 - 7, отличающийся тем, что HRI и HRII имеют последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 20 и 21, SEQ ID NO: 22 и 23, SEQ ID NO: 24 и 25, SEQ ID NO: 26 и 27, SEQ ID NO: 28 и 32, SEQ ID NO: 28 и 33, SEQ ID NO: 31 и 29 и SEQ ID NO: 31 и 30, соответственно, или их гетеродимеризующиеся варианты идентичны по последовательности на по меньшей мере на 70% соответствующей указанной последовательности аминокислот.
9. Белковый комплекс по любому из пп. 1 - 8, отличающийся тем, что цепь аминокислот I и/или цепь аминокислот II дополнительно содержат один или более аминокислотных

элементов, выбранных из группы, состоящей из домена CH2 или CH3 антитела; одного или более антигенспецифических лигандов (ASL), предпочтительно, выбранных из группы, состоящей из Fv, одноцепочечного Fv (scFv), стабилизированного дисульфидом Fv, стабилизированного дисульфидом scFv, Fab, одноцепочечного Fab, однодоменного антитела, вариабельного домена тяжелой цепи (VH), вариабельного домена легкой цепи (VL), Т-клеточного рецептора или его антигенсвязывающих фрагментов, нанотела, VHH, одного или более подобных антителам связывающих белков (например, дарпинов, антикалинов, аффител, фибронектин-подобных доменов и т.д.); шарнирной области антитела (HR), одной или более линкерных последовательностей (L), одного или более цитокинов (С, например, представителей суперсемейства TNF и их одноцепочечных производных, интерлейкинов (IL, например, IL-2), интерферонов (например, IFN γ), факторов роста, гормонов, лигандов, пептидов, фрагментов рецепторов с лиганд-связывающей активностью, хелаторов, ферментов, факторов свертывания крови и антикоагулянтов, и производных перечисленных элементов,

при этом предпочтительно цепь аминокислот I содержит один или более антигенспецифических лигандов (ASL) и/или одну или более эффекторных молекул, и цепь аминокислот II содержит один или более антигенспецифических лигандов (ASL) и/или одну или более эффекторных молекул, и при этом модули ASL выбраны из группы молекул, специфично связывающихся, например, с белками на поверхности клетки (рецептором, молекулой адгезии, каналом, переносчиком и т.д.), гормонами, факторами роста, цитокинами, лигандами, белками сыворотки, факторами свертывания крови, фибринолитическими факторами, хемокинами, ферментами, и при этом эффекторные молекулы выбраны из группы молекул, например, белков на поверхности клетки (рецептора, молекулы адгезии, канала, переносчика и т.д.), гормонов, факторов роста, цитокинов, лигандов, белков сыворотки, факторов свертывания крови, фибринолитических факторов, хемокинов, ферментов.

10. Цепь аминокислот I или II по пп. с 1 по 9, предпочтительно комбинация указанных цепей аминокислот, причем цепь I и цепь II имеют последовательность аминокислот согласно SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 34 и SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 36 и SEQ ID NO: 37 (scFv13.7-Fc1k), SEQ ID

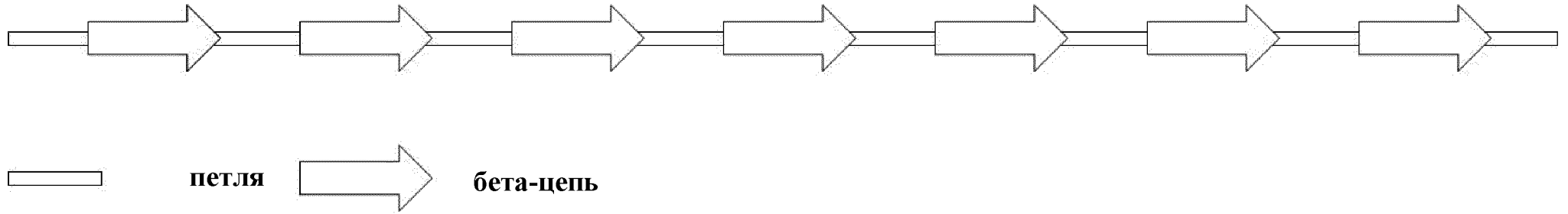
NO: 36 и SEQ ID NO: 38 (scFv13.7-CD3-шарнир-Fc1k), SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 38 (scFv3-43-CD3-шарнир-Fc1k) или SEQ ID NO: 40 и SEQ ID NO: 38 (scFvhuMCSP-CD3-шарнир-Fc1k).

11. Нуклеиновая кислота, кодирующая цепь аминокислот I и/или II по п. 10.
12. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 11.
13. Способ определения последовательности аминокислот HRI с цепью аминокислот I и/или HRII с последовательностью аминокислот II, включающий следующие этапы:
 - (i) выбора первой CRI, второй CRI, третьей CRI и четвертой CRI;
 - (ii) определения семи бета-цепей A, B, C, D, E, F и G первой CRI, второй CRI, третьей CRI и четвертой CRI, промежуточных последовательностей b, c, d, e, f и g первой CRI, второй CRI, третьей CRI и четвертой CRI, N- и C-концевых последовательностей a и h, соответственно, первой CRI, второй CRI, третьей CRI и четвертой CRI;
 - (iii) замены по меньшей мере 1 аминокислоты из a из первой CRI на по меньшей мере 1 аминокислоту из a из второй (Замена 1); замены по меньшей мере 1 аминокислоты из c из первой CRI на по меньшей мере 1 аминокислоту из c из второй CRI (Замена 2); замены по меньшей мере 1 аминокислоты из g из первой CRI на по меньшей мере 1 аминокислоту из g из второй CRI (Замена 3); замены по меньшей мере 1 аминокислоты из a из третьей CRI на по меньшей мере 1 аминокислоту из a из четвертой CRI (Замена 4); замены по меньшей мере 1 аминокислоты из c из третьей на по меньшей мере 1 аминокислоту из c из четвертой CRI (Замена 5); и замены по меньшей мере 1 аминокислоты из g из третьей на по меньшей мере 1 аминокислоту g из четвертой CRI (Замена 6), где первая CRI и третья CRI отличаются друг от друга и специфично связываются друг с другом при физиологических условиях.
14. Способ получения цепи аминокислот I, содержащей последовательность HRI, которая определена в п. 13, и/или цепи аминокислот II с последовательностью HRII, которая определена в п. 13, включающий этап введения нуклеиновой кислоты, кодирующей

цепь аминокислот I и/или цепь аминокислот II, в клетку-хозяина и экспрессии цепи аминокислот I и/или II.

15. Белковый комплекс по любому из пп. 1 - 9 или из цепи аминокислот I и/или II по п. 10 для применения в качестве лекарственного средства, предпочтительно для применения для профилактики, лечения или диагностики расстройства или заболевания, такого как, но не ограничиваясь перечисленными: воспалительные заболевания, аутоиммунные заболевания, аллергические заболевания, пролиферативные заболевания, заболевания ракового типа, состояния кожи, эндокринные заболевания, заболевания и нарушения глаз, генетические нарушения, метаболические заболевания, инфекционные заболевания, заболевания кишечника, неврологические расстройства и психическое заболевание.

Фигура 1



Фигура 2

a)



Акцепторный домен A ($\neq$ B) Акцепторный домен B ($\neq$ A)

например например

CH1 IgG1, 2, 3, 4 – константная, Ig-каппа, лямбда	
CH1 IgA1, 2 – константная, Ig-каппа, лямбда	
CH1 IgD – константная, Ig-каппа, лямбда	
CH1 IgE – константная, Ig-каппа, лямбда	
CH1 IgM – константная, Ig-каппа, лямбда	
константная, TCR-альфа – константная, TCR-бета	
FcRn-альфа-3 бета-2-микроглобулин	
HLA-A, B-альфа-3 бета-2-микроглобулин	
HLA-D-альфа-2 HLA-D-бета-2	

b)



Донорный домен C ($\neq$ D) Донорный домен D ($\neq$ C)

например например

CH3 или CH1 IgG1, 2, 3, 4	CH3 или CH1 IgG1, 2, 3, 4
CH3 или CH1 IgA1, 2	CH3 или CH1 IgA1, 2
CH3 или CH1 IgD	CH3 или CH1 IgD
CH4 или CH1 IgE	CH4 или CH1 IgE
CH4 или CH1 IgM	CH4 или CH1 IgM
константная, Ig-каппа	константная, Ig-каппа
константная, Ig-лямбда	константная, Ig-лямбда

c)



Донорный домен C ($\neq$ D) Донорный домен D ($\neq$ C)

например например

CH1 IgG1, 2, 3, 4	константная, Ig-каппа или лямбда
CH1 IgA1, 2	константная, Ig-каппа или лямбда
CH1 IgD	константная, Ig-каппа или лямбда
CH1 IgE	константная, Ig-каппа или лямбда
CH1 IgM	константная, Ig-каппа или лямбда



Потенциально гетеродимеризующиеся элементы



Элементы, взаимодействующие с FcRn и другими доменами Ig



Возможная дисульфидная связь

Фигура 3



Фигура 4

Бета-слой:

[illegible]

Бета-цепь, предсказанная с помощью PDB/JPred

Остатки исключены из бета-цепей A-G вручную в соответствии со структурным выравниванием

Остатки добавлены в бета-цепи A-G в соответствии с выравниванием последовательности и структуры

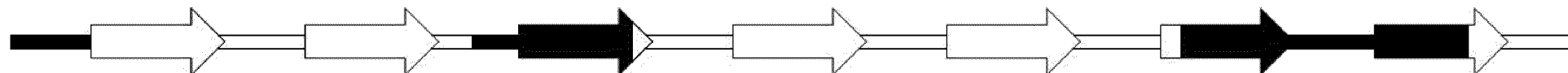
* Отсутствуют данные о структуре или недостаточно доступных данных: выравнивание согласно предсказанию JPred вторичных структур (наиболее длинное кумулятивное предсказание) и

Множественное выравнивание последовательностей

*¹ Выравнивание пересматривали, учитывая структуру родственного домена мыши

Фигура 5

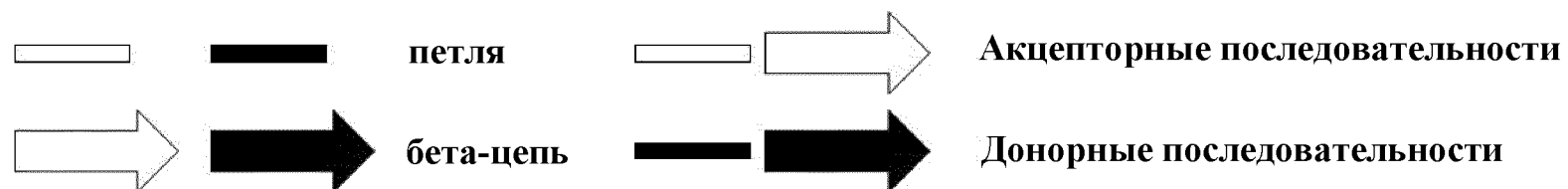
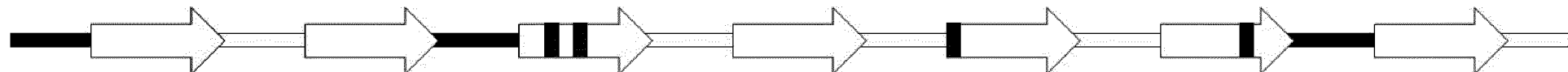
А) Донорные последовательности 1, 2 (№ 43 - 51) и 3 (№ 103 - 132)



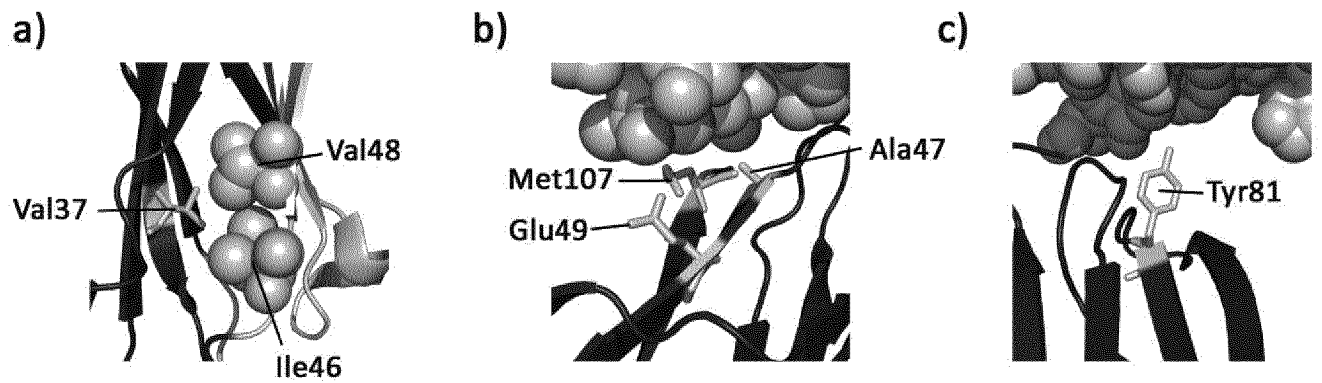
В) Донорные последовательности 1, 2 (№ 45 - 51) и 3 (№ 103 - 130) и остаток 37



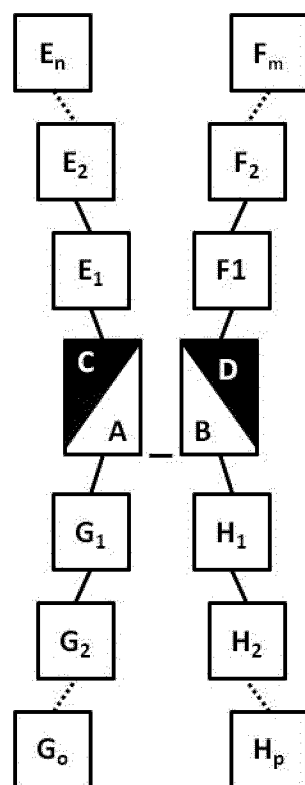
С) Донорные последовательности 1, 2 (№ 41 - 45) и 3 (№ 109 - 127) и остатки 47, 49 и 107 или остаток 81



Фигура 6



Фигура 7



Варианты для E_{1-n} - H_{1-n}

Различные домены Ig

Цитокины

Лиганды TNFSF

Токсины

...

Фигура 8

Бета-слой:

[illegible]

Бета-слой:

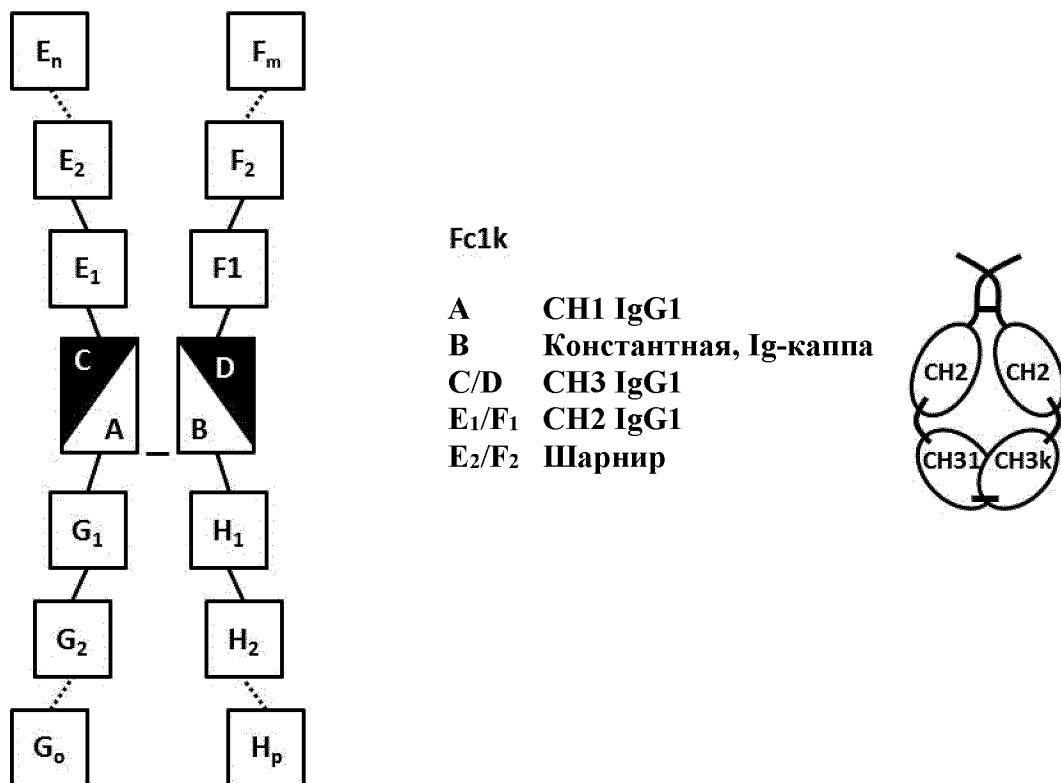
[illegible]

Бета-цепи, предсказанные с помощью PDB/JPred

Остатки исключены из бета-цепей А-Г вручную в соответствии со структурным выравниванием

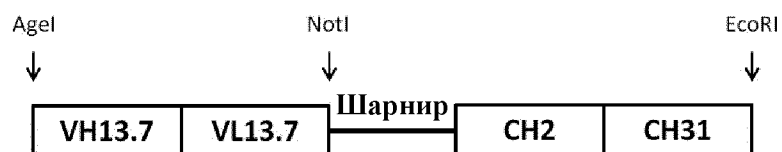
Остатки добавлены в бета-цепи A-G в соответствии с выравниванием последовательности и структуры

Фигура 9

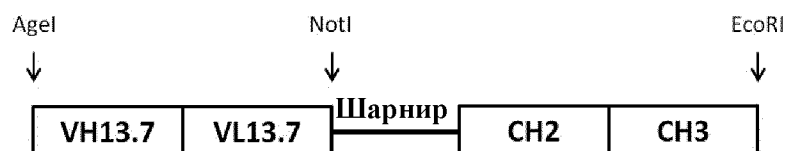


Фигура 10

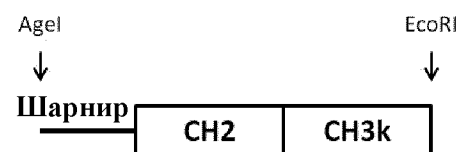
Тяжелая цепь:



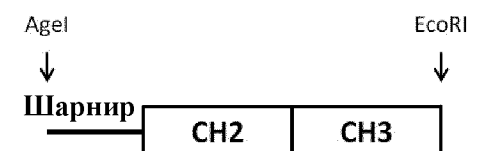
Тяжелая цепь:



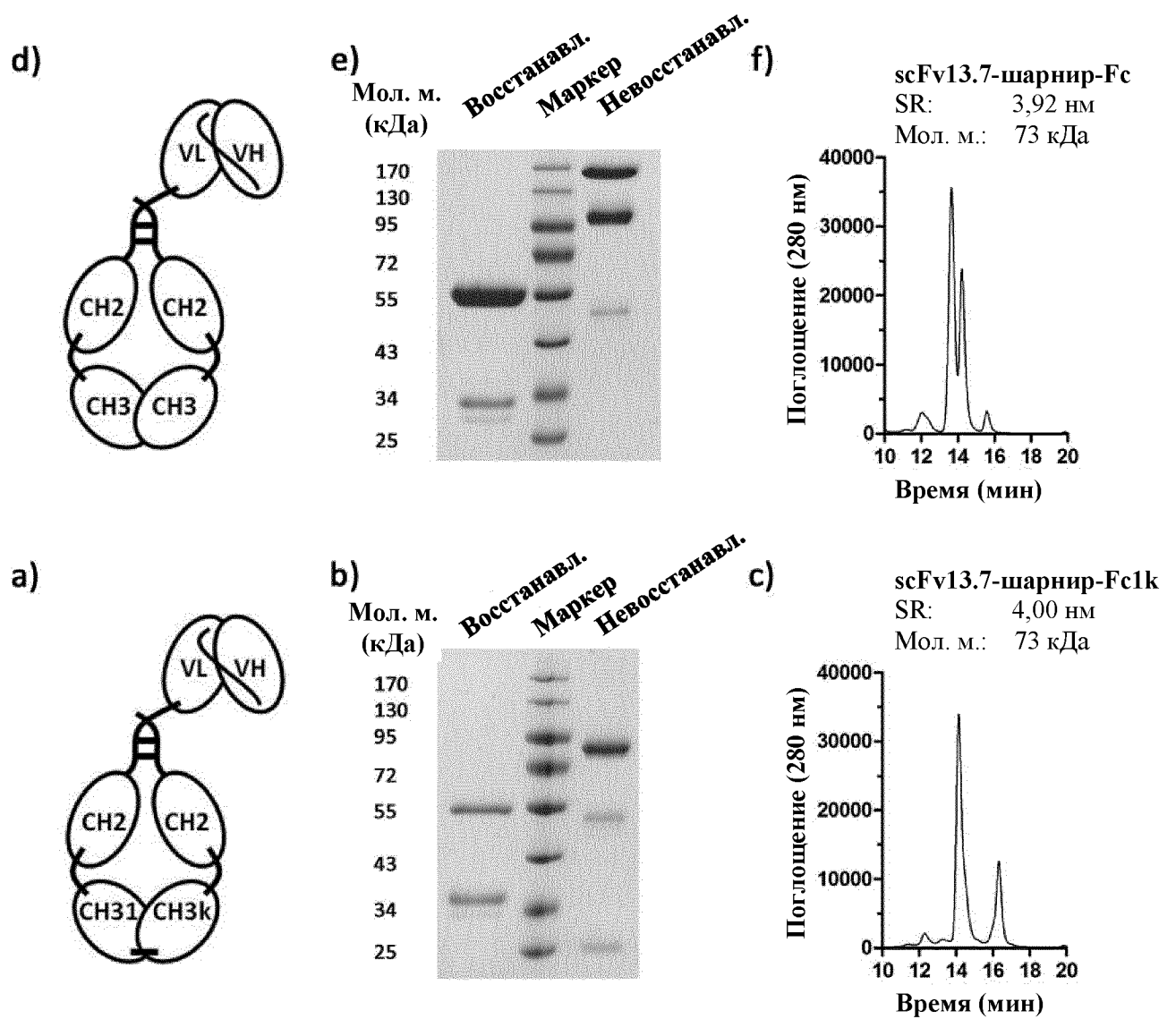
Легкая цепь:



Легкая цепь:

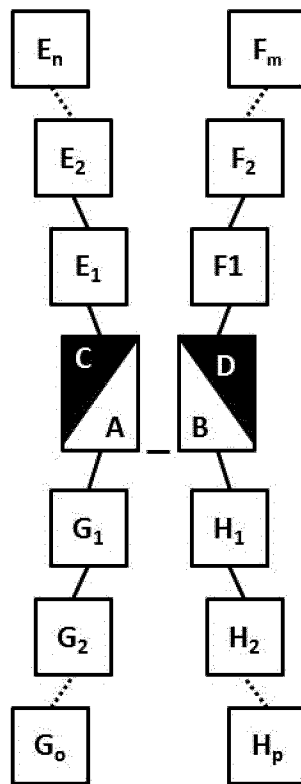


Фигура 11



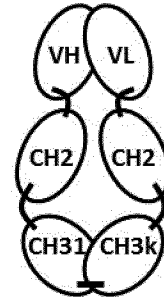
SR – радиус Стокса

Фигура 12

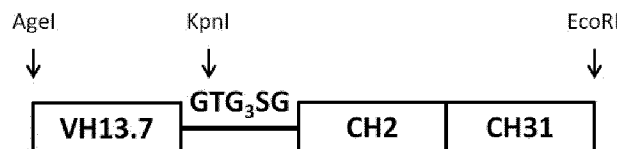


Пример 2 Fv13.7-Fc1k

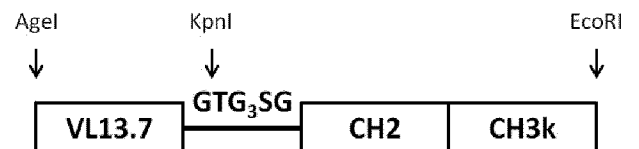
A CH1 IgG1
B Константная, Ig-каппа
C/D CH3 IgG1
E1/F1 CH2 IgG1
E2/F2 Линкерная последовательность
E3 VH13.7
F3 VL13.7



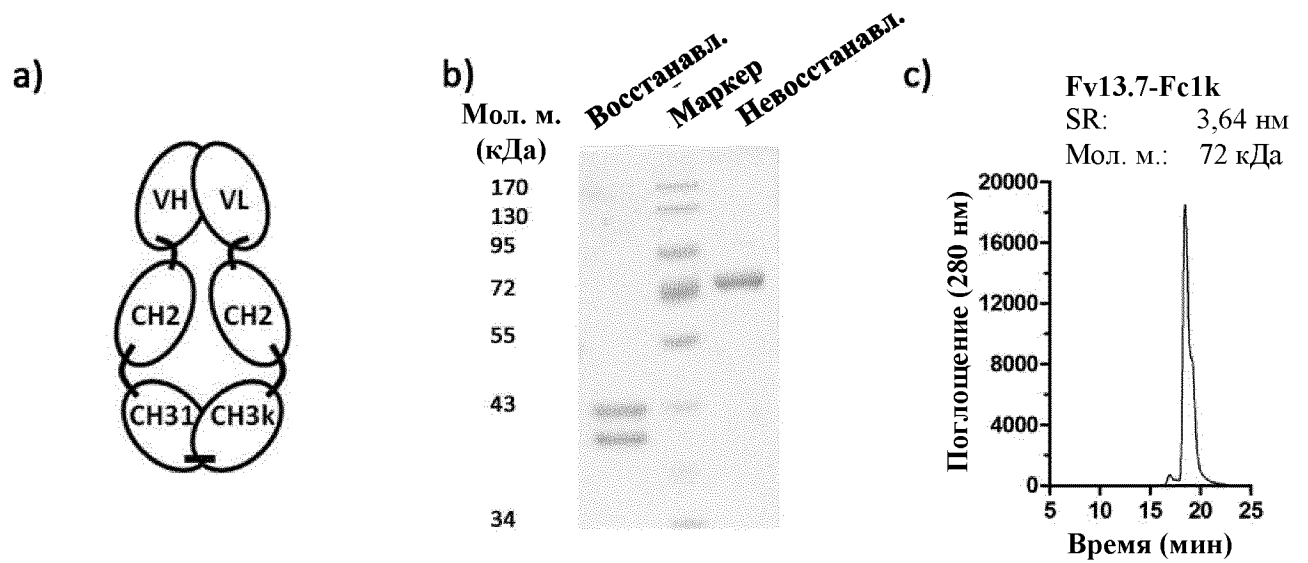
Тяжелая цепь:



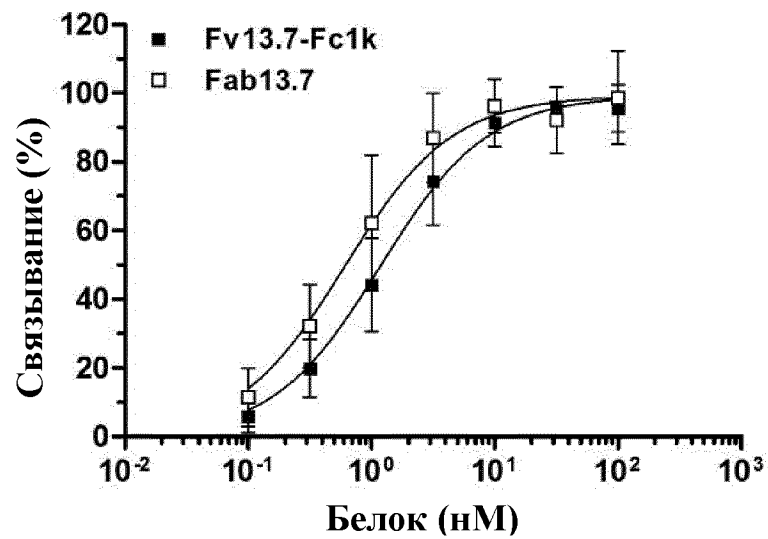
Легкая цепь:



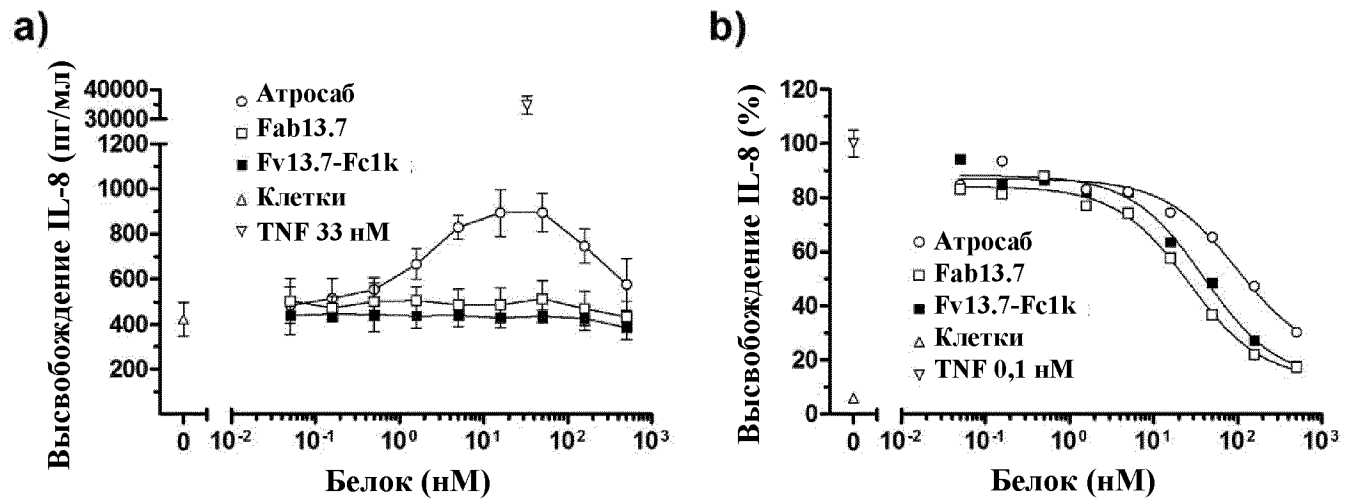
Фигура 13



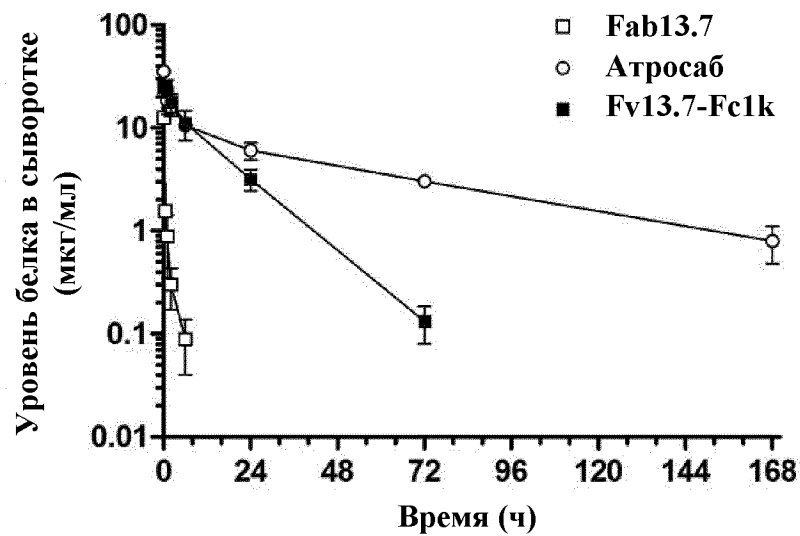
Фигура 14



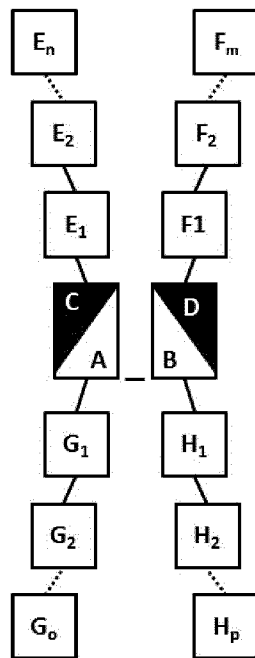
Фигура 15



Фигура 16



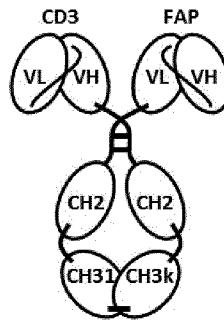
Фигура 17



Пример 3а

FAP_N-CD3_N-hFc1k

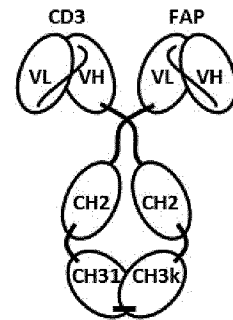
A CH1 IgG1
B Константная, Ig-каппа
C/D CH3 IgG1
E₁/F₁ CH2 IgG1
E₂/F₂ Шарнир
E₃ scFvhu36
F₃ scFvhuU3



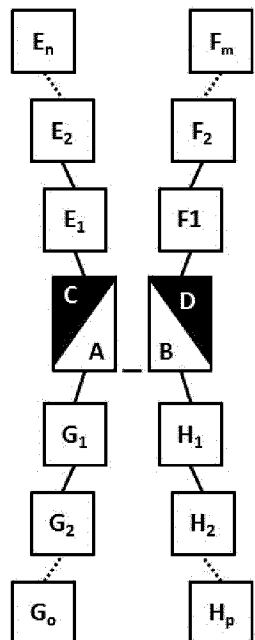
Пример 3б

FAP_N-CD3_N-Fc1k

A CH1 IgG1
B Константная, Ig-каппа
C/D CH3 IgG1
E₁/F₁ CH2 IgG1
E₂/F₂ Шарнир без цистеинов
E₃ scFvhu36
F₃ scFvhuU3



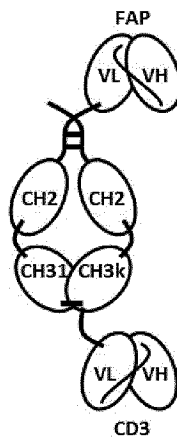
Фигура 18



Пример 4а

FAP_N-CD3_C-hFc1k

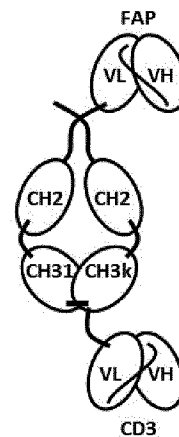
A CH1 IgG1
B Константная, Ig-каппа
C/D CH3 IgG1
E₁/F₁ CH2 IgG1
E₂/F₂ Шарнир
E₃ scFvhu36
H₁ Линкер
H₂ scFvhuU3



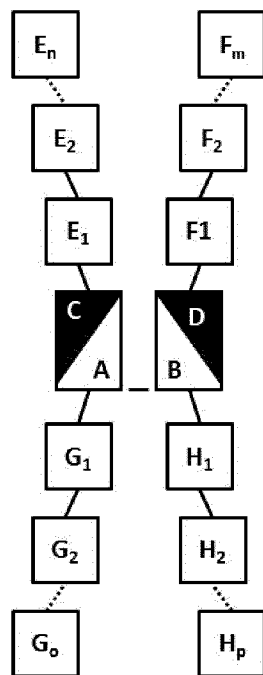
Пример 4б

FAP_N-CD3_C-Fc1k

A CH1 IgG1
B Константная, Ig-каппа
C/D CH3 IgG1
E₁/F₁ CH2 IgG1
E₂/F₂ Шарнир без цистеинов
H₁ Линкер
E₃ scFvhu36
H₂ scFvhuU3



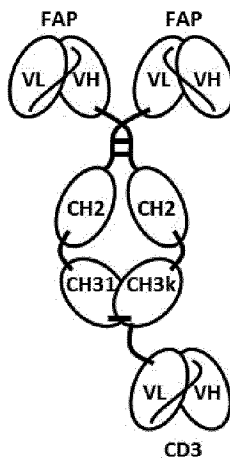
Фигура 19



Пример 5a

FAP_{NN}-CD3_C-hFc1k

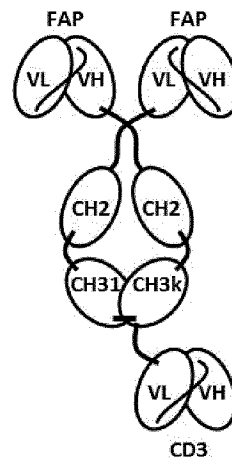
A CH1 IgG1
B Константная, Ig-каппа
C/D CH3 IgG1
E₁/F₁ CH2 IgG1
E₂/F₂ Шарнир
H₁ Линкер
E₃/F₃ scFvhu36
H₂ scFvhuU3



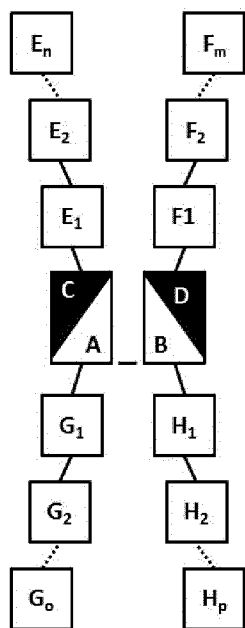
Пример 5b

FAP_{NN}-CD3_C-Fc1k

A CH1 IgG1
B Константная, Ig-каппа
C/D CH3 IgG1
E₁/F₁ CH2 IgG1
E₂/F₂ Шарнир без цистеинов
H₁ Линкер
E₃/F₃ scFvhu36
H₂ scFvhuU3



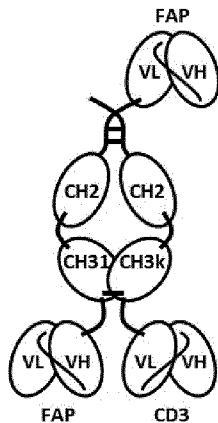
Фигура 20



Пример 6a

FAP_{NC}-CD3_C-hFc1k

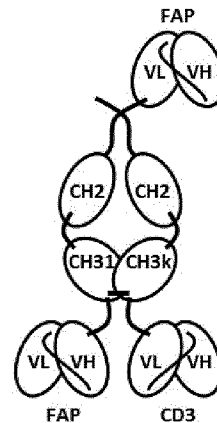
A CH1 IgG1
B Константная, Ig-каппа
C/D CH3 IgG1
E₁/F₁ CH2 IgG1
E₂/F₂ Шарнир
G₁/H₁ Линкер
E₃/G₂ scFvhu36
H₂ scFvhuU3



Пример 6b

FAP_{NC}-CD3_C-Fc1k

A CH1 IgG1
B Константная, Ig-каппа
C/D CH3 IgG1
E₁/F₁ CH2 IgG1
E₂/F₂ Шарнир без цистеинов
G₁/H₁ Линкер
E₃/G₂ scFvhu36
H₂ scFvhuU3



Фигура 21

a)

Бета-слой:		A			B			C			D			E			F			G			
IgLCRC	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	SEQ	ID						
NO																							
Пол.	1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234																						
b2m	-----	IQRTP	IQVYSRHPAE	---NGKSNFLNCYVSGHHP	SDIEVDLLKNGERIEK	---VHSDISFS	-----	KDWSFYLLYYTEFTPT	-----	KDEYACRVNHVT	-----	LSQ	KIVKWD	DRDM	-----	13							
g1_CH3	-----	GQPRE	OVYTLPPSRDELT	-K-NQVSLTCLVKGY	YP-SDIAVEWESNGQEN	---NYKTTPPVLD	-----	SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG	---NVFSCSVMEAL	-----	HNHYTQKSL	SLSPGK	-----		45								
b2mH3	-----	GQPRE	IQVYSRHPAE	---NGKSNFLNCYVSGHYP	SDIAVELLKNGERIEK	---VHSDISFS	-----	KDWSFYLLYYTEFTPT	-----	KDEYACRVMEAL	-----	HNH	KIVKWD	DRDM	-----	24							

Бета-слой:		A		B		C		D		E		F		G	
IgLCRC	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Пол.	1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234														
FcRn	GKGNL-EWKEPP	SMRLKA	-RPS	---	SPGFSVLTCFAFSHYP	PEIQRLFLRNGLAAG	---	TCQGDFFGN	---	SDGSFHASSSLTVKSGD	---	EHHYCCIVCHAG	---	LAQFLRVET	---
g1_CH3	-----	GQPREPOVYTLPPSRDELT	-K-NQVSLTCLVKGY	YP-SDIAVEWESNGQEN	---	NYKTTPPVLD	---	SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG	---	NVFSCSVMEAL	---	HNHYTQKSL	SLSPGK	---	45
FcRnH3	-----	GQPREPSMRLKA-RPS	---	SPGFSVLTCFAFSHYP	SDIALEFLRNGLAAG	---	TCQGDFFGN	---	SDGSFHASSSLTVKSGD	---	EHHYCCIVMEAL	---	HNHFLRVET	---	25

Бета-цепи, предсказанные с помощью PDB/JPred

Остатки исключены из бета-цепей A-G вручную в соответствии со структурным выравниванием

Остатки добавлены в бета-цепи A-G в соответствии с выравниванием последовательности и структуры

b)

Бета-слой:		A			B			C			D			E			F			G			
IgLCRC	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	SEQ ID							
NO																							
Пол.	1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234																						
TCRa	-----	PNIQNP	PAVYQLRDS	-----	KSSDKSVCLFTDHP	DSQTNVSQSKDS	-----	VYITDKIVLDM	-----	RSMDFKSN	SAVAWSNK	-----	SDFACANA	FNN	-----	SI	PEDTFFPSP	ESSCD--	10				
k_CL	-----	TVAAP	SVFIFPPSDEQLK-S-GTASVVCLLNNEYP-REAKVQWKVDNALQSG	---	NSQESVTEQDS	-----	KDSTYSLSSTLTLSKADYEKH	---	KVYACEVTHQG	-----	LSS	EVTKSFN	RGEC	-----					18				
TCRaLk	-----	TVAAP	PAVYQLRDS	-----	KSSDKSVCLFTDHP	YP-REVSQSKDS	-----	VYITDKIVLDM	-----	RSMDFKSN	SAVAWSNK	-----	SDFACANA	FQ	-----	LSS	PEDTFFPSP	ESSCD--	29				

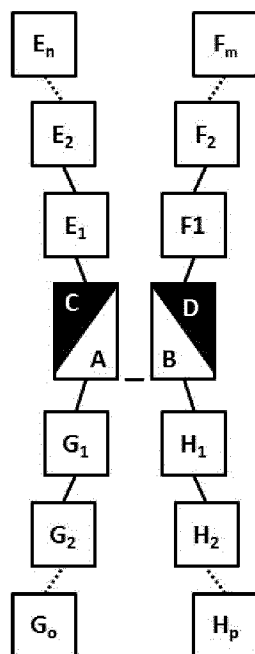
Бета-слой:		A			B			C			D			E			F			G		
IgLCRC	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14							
Пол.	1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234																					
TCRb1	---	EDLNKVFPP	EVAVFEPSEAEIS	-HTQKATLVCLATGFFP	DHVELSWVNGKEVHS	---GVSTDPQPLKEQ	PALNDSRYCLSSRLRV	SATFWQNP	-RNHFRCCVQFHYGLSEN	DEWTQDRAKPVT	QIVSAEAW	GRADC	-----			58						
g1 CH1	-----	ASTKGPSVFPLAPSSKSTS	---GGTAALGCLVKDYFP	EPVTVSWNSGALT	---S-GVHTFFPAVL	-----	QSSGLYSLSSVTV	PSSSLGTQ	---TICNVNHKP	-----	SNTKVDKK	VEPKSC	-----			1						
TCRbH1	-----	ASTKGP	EVAVFEPSEAEIS	-HTQKATLVCLATGFFP	EPVVELSWVNGKEVHS	---GVSTDPQPLKEQ	PALNDSRYCLSSRLRV	SATFWQNP	-RNHFRCCVQFKP	-----	SNTIVSAEAW	GRADC	-----			31						

Бета-цепи, предсказанные с помощью PDB/JPred

Остатки исключены из бета-цепей A-G вручную в соответствии со структурным выравниванием

Остатки добавлены в бета-цепи A-G в соответствии с выравниванием последовательности и структуры

Фигура 22



Пример 7а

Биспецифическое IgG

A FcRn-альфа-3

В бета-2-микроглобулин

C/D CH3 IgG1

E₁/F₁ CH2 IgG1

E_2/F_2	Шарнир
-----------	--------

G₁ Fab-фрагмент (антиген X)

Н₁ Fab, описанный в Прим. 7b

Пример 7b

Альтернативно

димеризованный Fab

А Константная, TCR-альфа

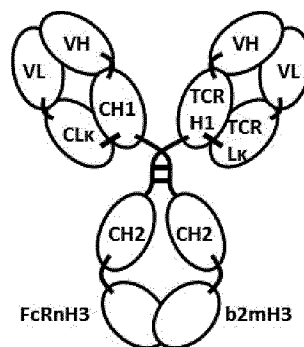
В Константная, TCR-бета

C CH1 IgG1

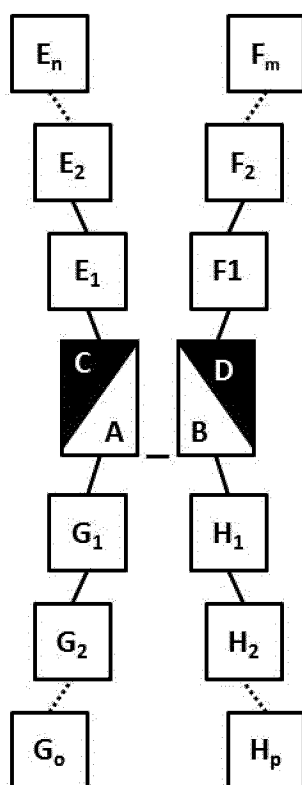
D CL Ig-каппа

E ₁	VH (против Y)
----------------	---------------

F ₁	VL (против Y)
----------------	---------------



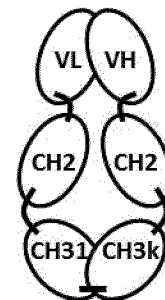
Фигура 23



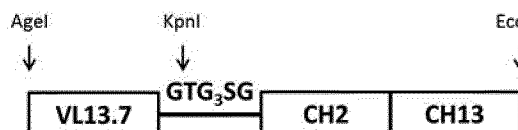
Пример 8

Fv13.7_x-Fc1k

- A CH1 IgG1
 B Константная, Ig-каппа
 C/D CH3 IgG1
 E₁/F₁ CH2 IgG1
 E₂/F₂ Линкерная последовательность
 E₃ VL13.7
 F₃ VH13.7



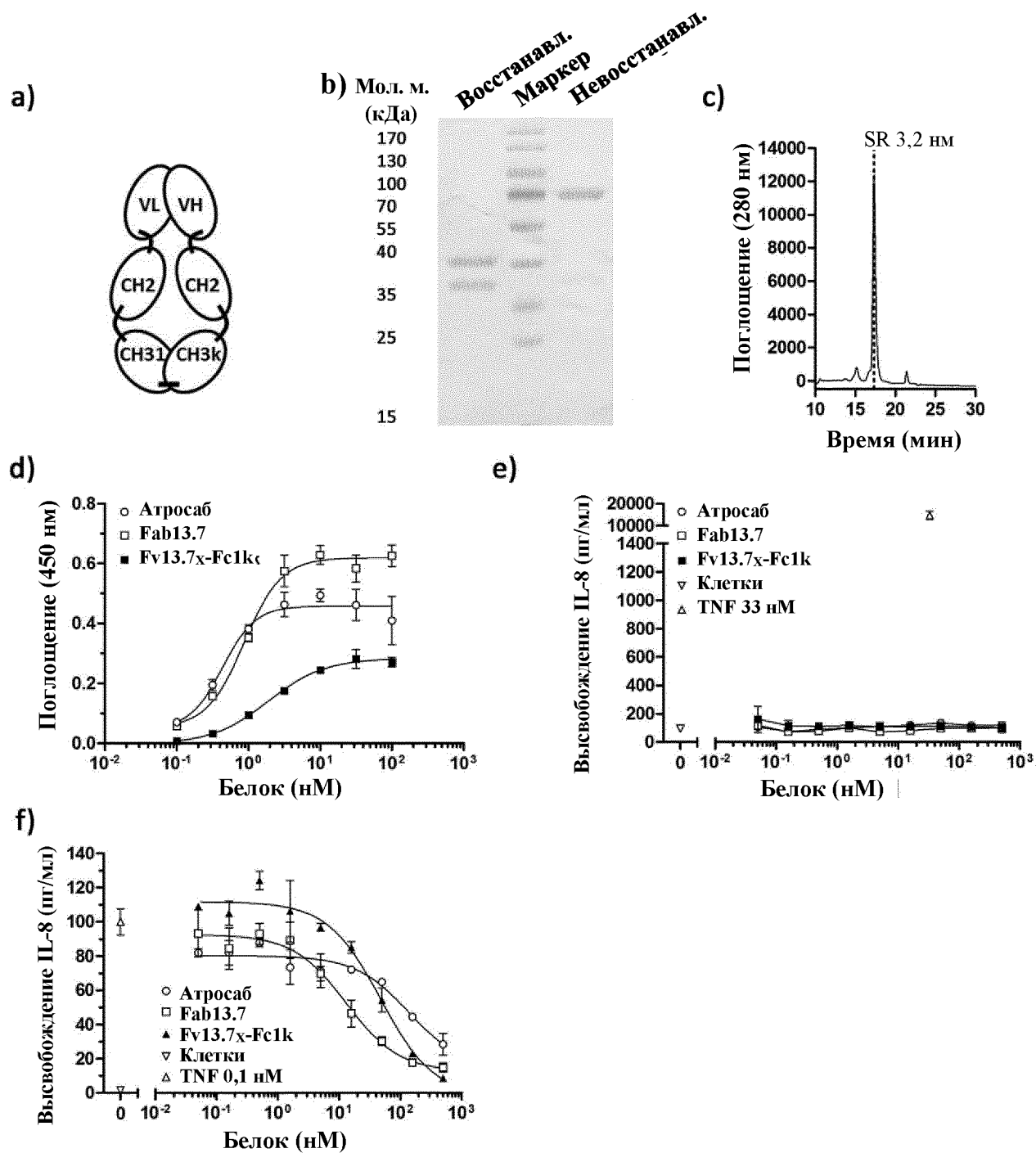
Легкая цепь:



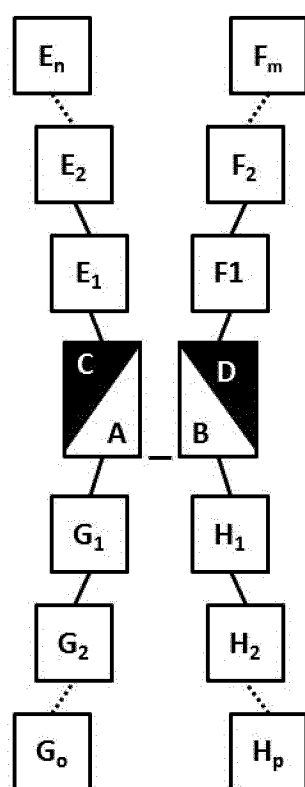
Тяжелая цепь:



Фигура 24



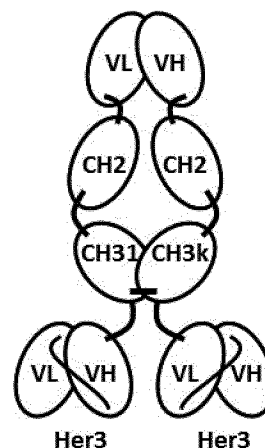
Фигура 25



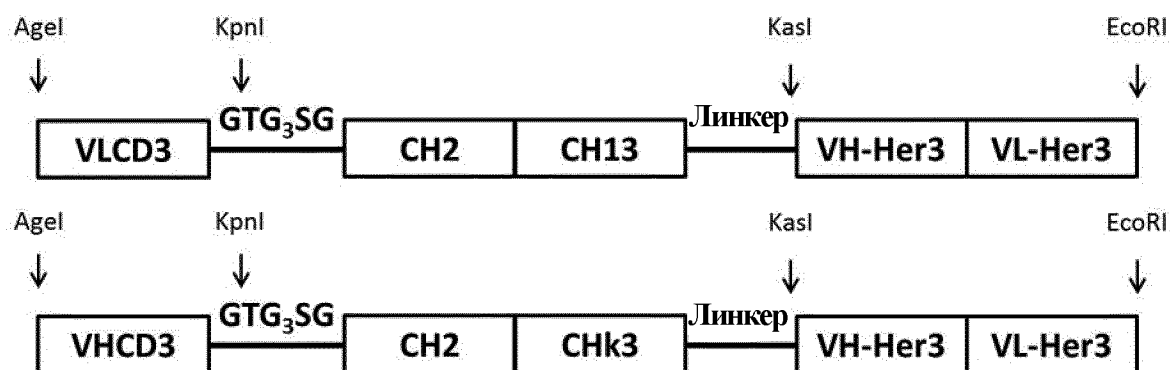
Пример 9

FvCD3-Fc1k-scFvHer32

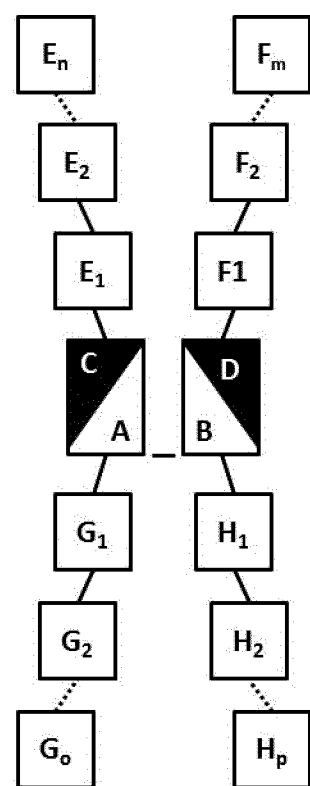
- A CH1 IgG1
- B Константная, Ig-каппа
- C/D CH3 IgG1
- E₁/F₁ CH2 IgG1
- E₂/F₂ Линкерная последовательность
- E₃ VLCD3
- F₃ VHCD3
- G₁/H₁ Линкер
- G₂/H₂ scFvHer3



Генотипическое расположение



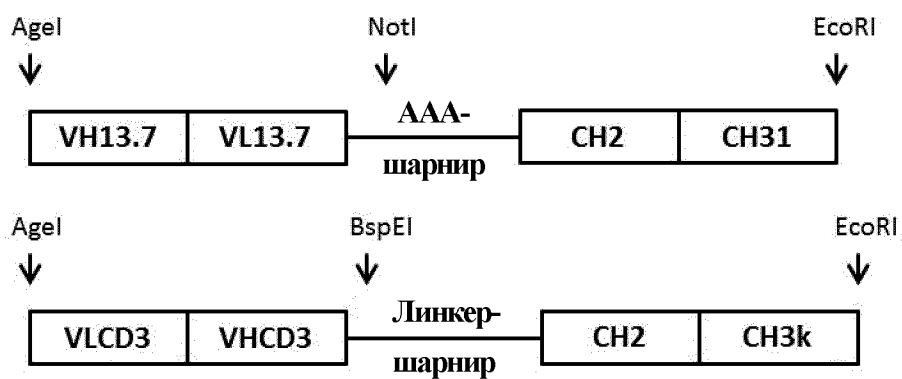
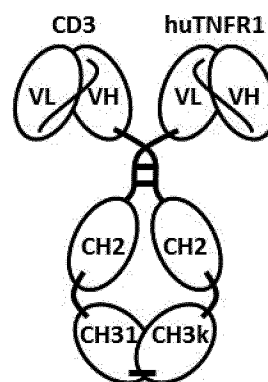
Фигура 26



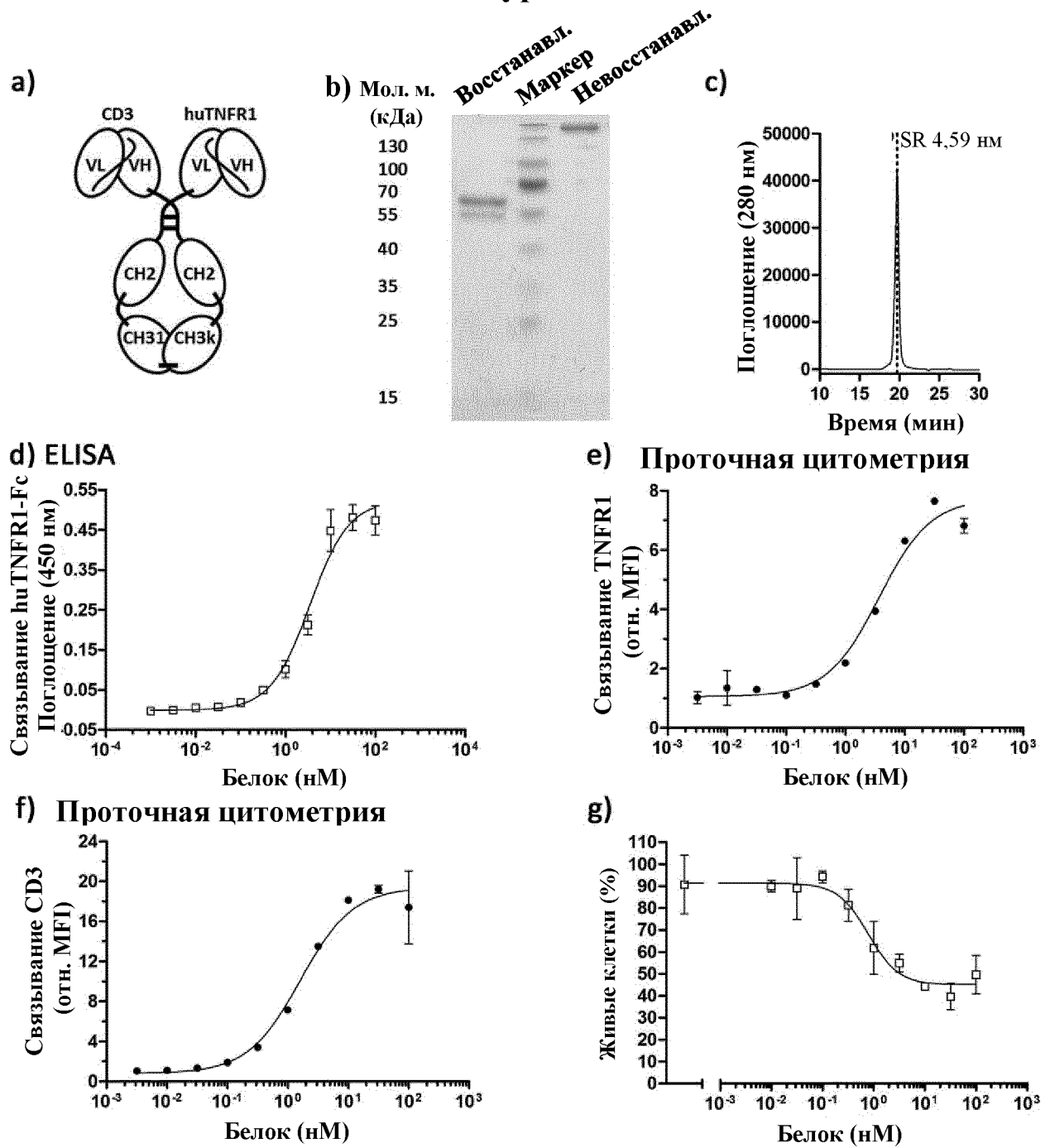
Пример 10

13.7_N-CD3_N-hFc1k

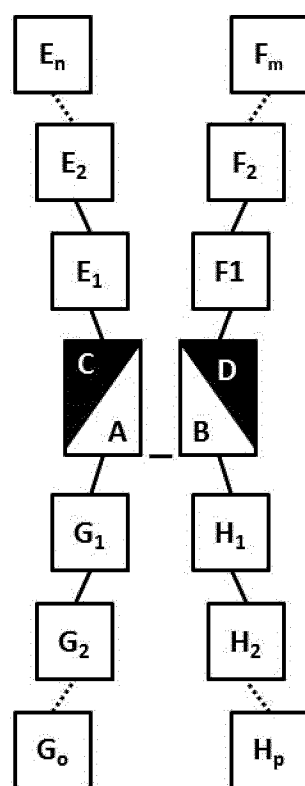
- A CH1 IgG1
- B Константная, Ig-каппа
- C/D CH3 IgG1
- E₁/F₁ CH2 IgG1
- E₂/F₂ Шарнир
- E₃ scFv13.7
- F₃ scFvhU3



Фигура 27



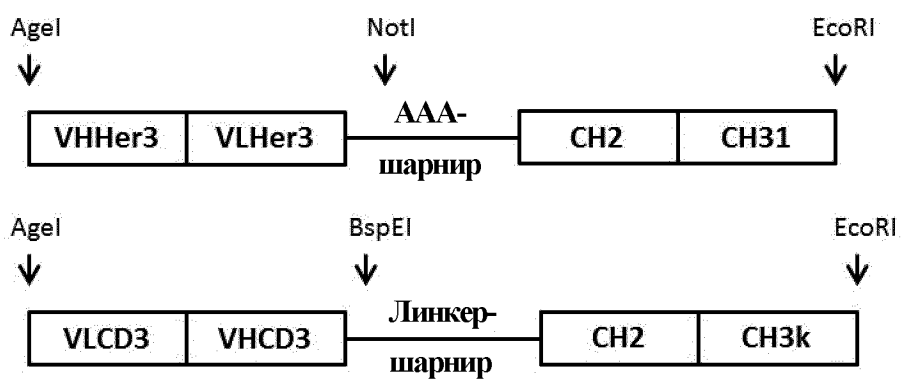
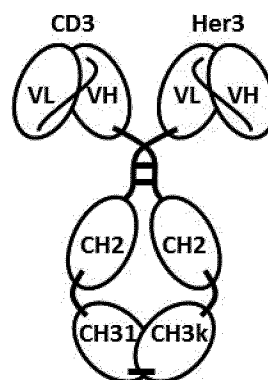
Фигура 28



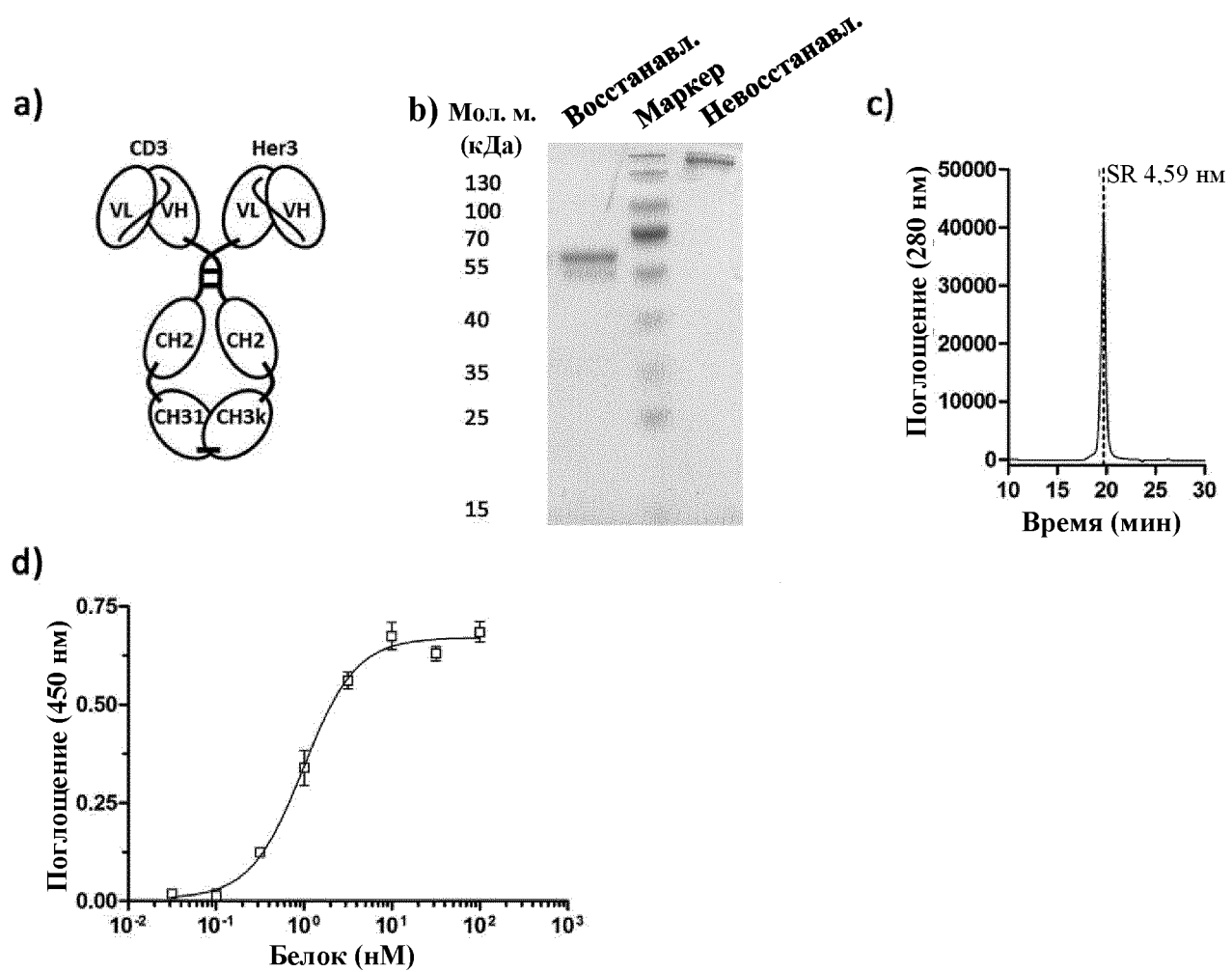
Пример 11

Her3_N-CD3_N-hFc1k

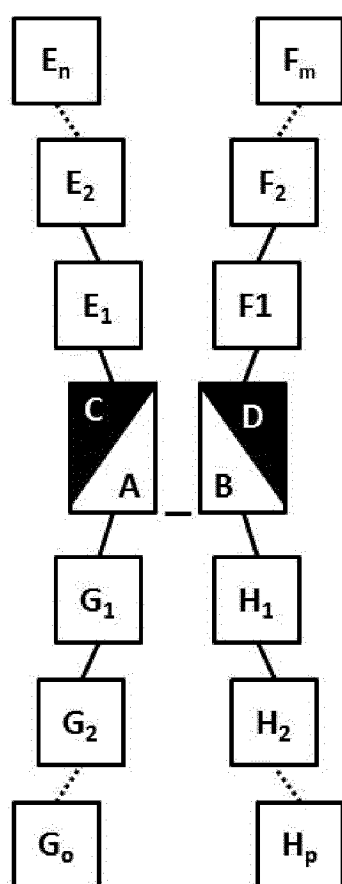
- A CH1 IgG1
- B Константная, Ig-каппа
- C/D CH3 IgG1
- E₁/F₁ CH2 IgG1
- E₂/F₂ Шарнир
- E₃ scFvHer3
- F₃ scFvhuU3



Фигура 29



Фигура 30



Пример 12

MSCP_NCD3_N-hFc1k

A CH1 IgG1

B Константная, Ig-каппа

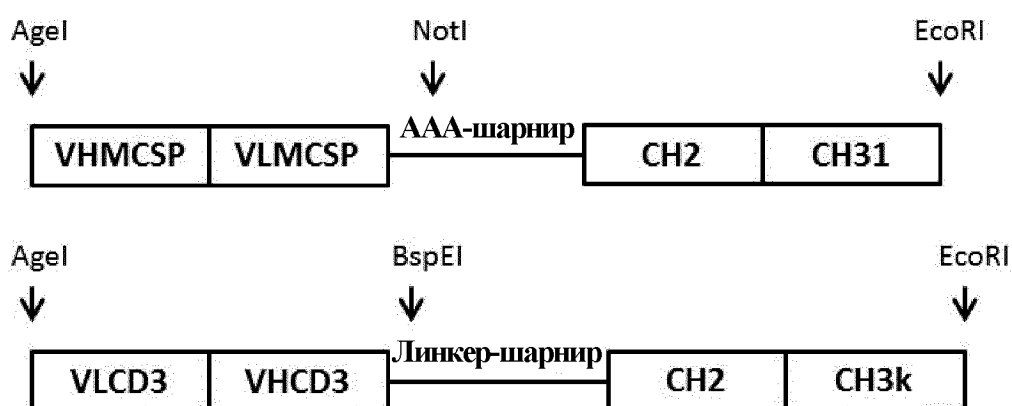
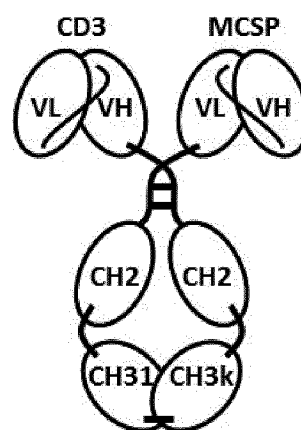
C/D CH3 IgG1

E₁/F₁ CH2 IgG1

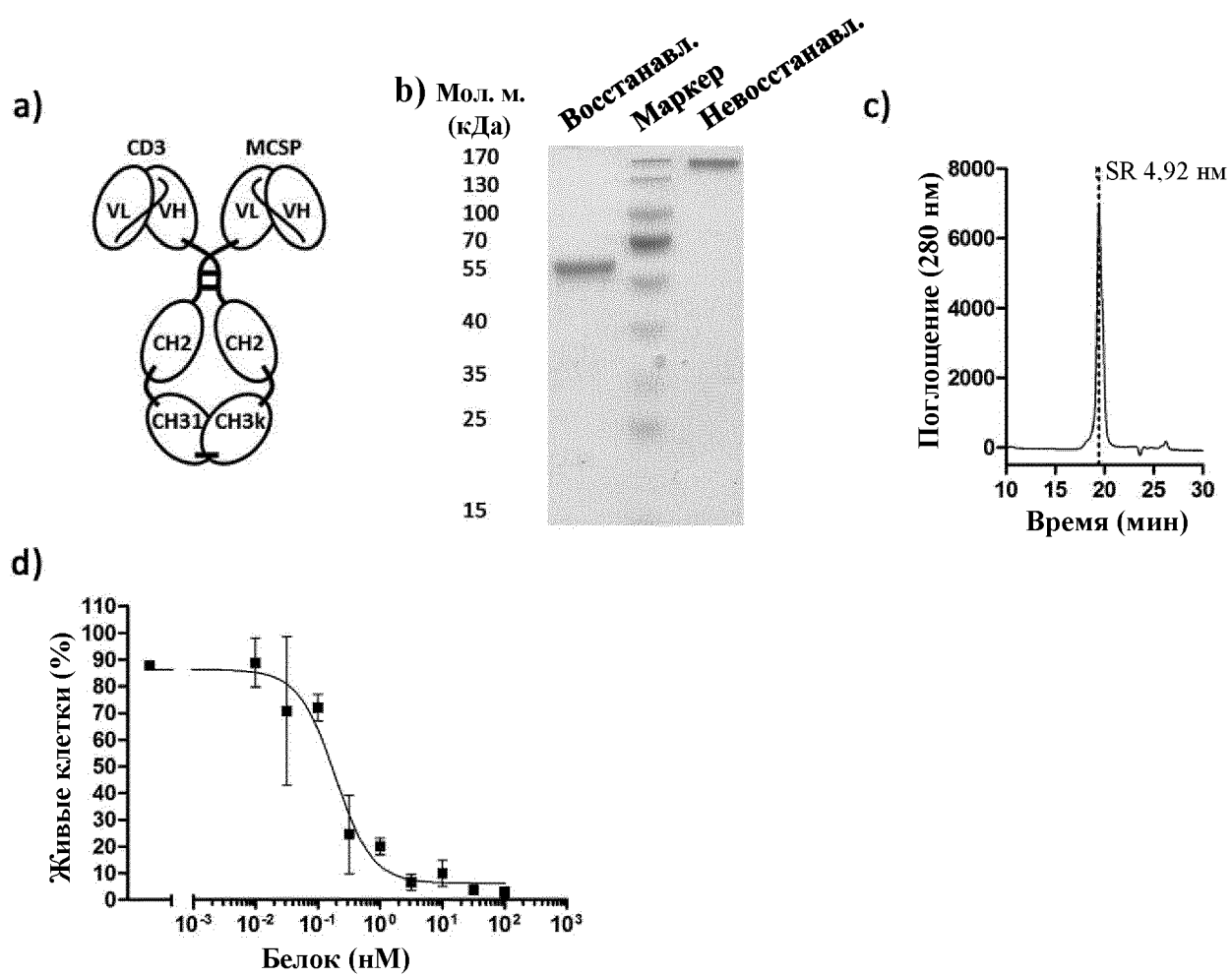
E₂/F₂ Шарнир

E₃ scFvMSCP

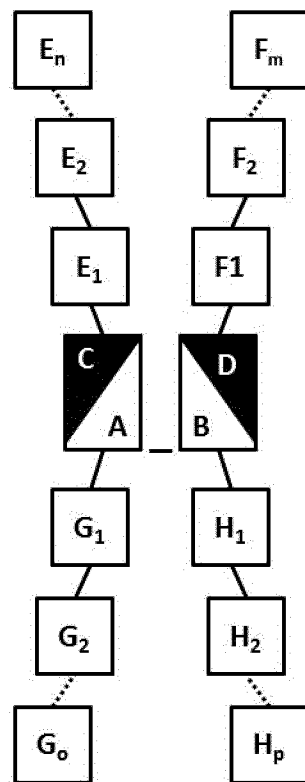
F₃ scFvhU3



Фигура 31



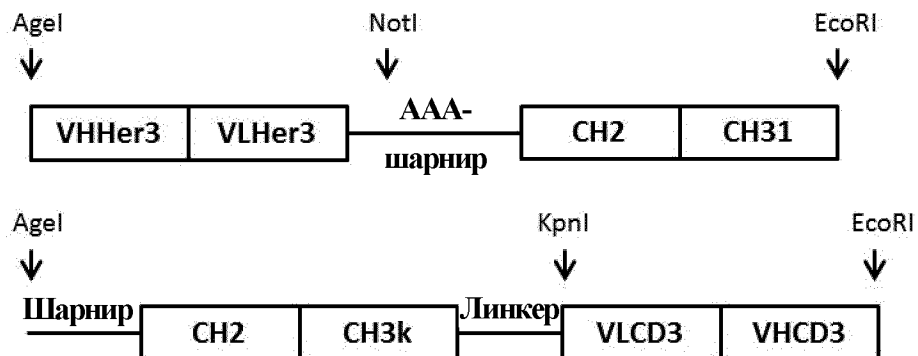
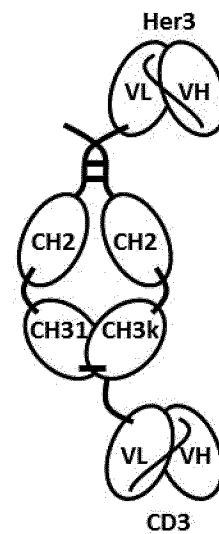
Фигура 32



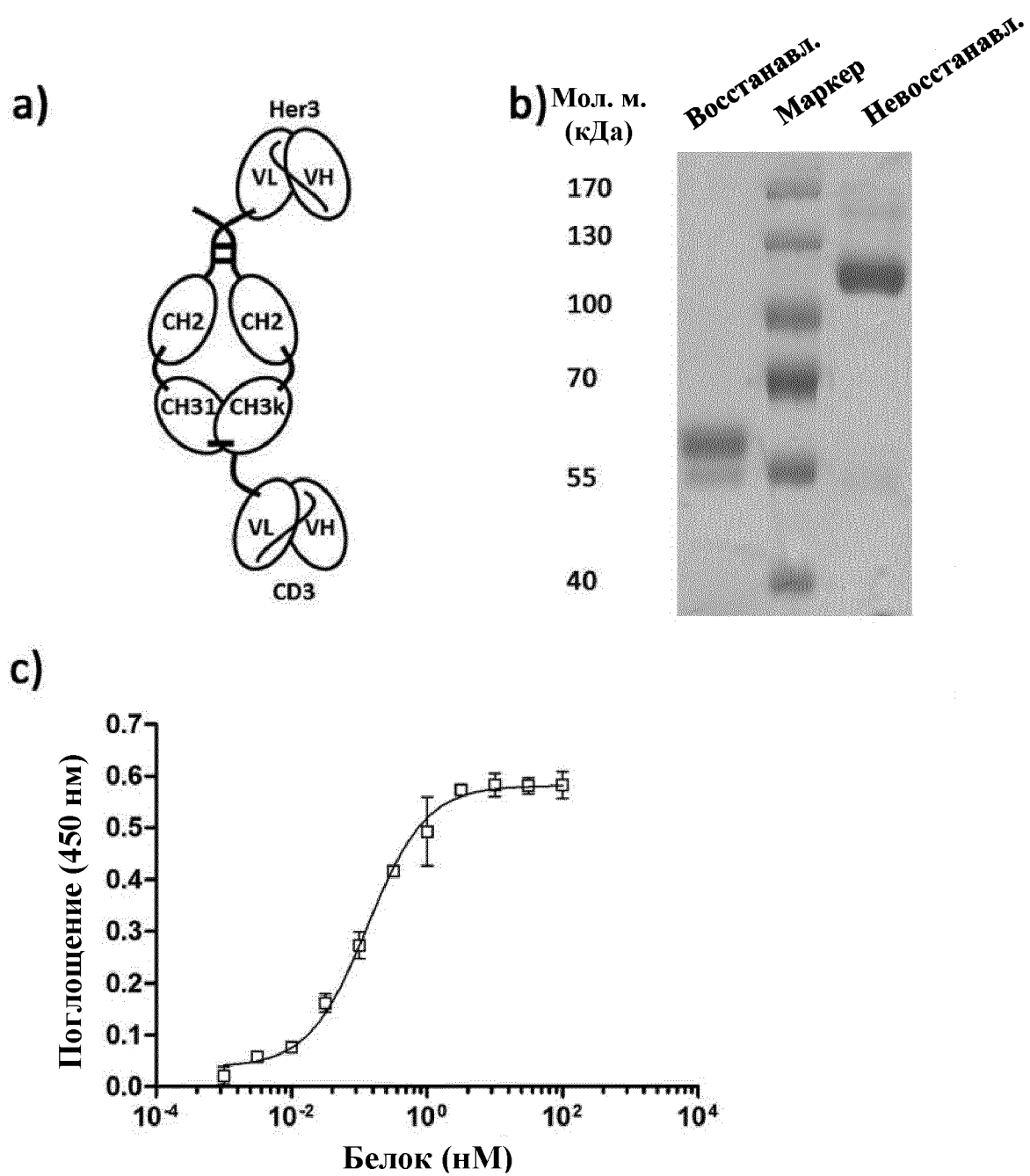
Пример 13

Her3_NCD3_C-hFc1k

- A CH1 IgG1
- B Константная, Ig-каппа
- C/D CH3 IgG1
- E₁/F₁ CH2 IgG1
- E₂/F₂ Шарнир
- E₃ scFvHer3
- H₁ Линкер
- H₂ scFvhuU3



Фигура 33



Фигура 34

SEQ ID NO: 1, CH1 из IgG1

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKKVEPKSC

SEQ ID NO: 2, CH1 из IgG2

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVD
HKPSNTKVDKTKVERK

SEQ ID NO: 3, CH1 из IgG3

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVN
HKPSNTKVDKRVELKTP

SEQ ID NO: 4, CH1 из IgG4

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVD
HKPSNTKVDKRVESKYG

SEQ ID NO: 5, CH1 из IgA1

ASPTSPKVFPLSLCSTQPDGNVVIACLVQGFFPQEPLSVTWSESGQVGTARNFPPSQDASGDLYTTSSQLTLPATQCLAGKSVTCH
VKHYTNPSQDVTVPC

SEQ ID NO: 6, CH1 из IgA2

ASPTSPKVFPLSLDSTPQDGNVVVACLQVGGFFPQEPLSVTWSESGQNVGTARNFPPSQDASGDLYTTSSQLTLPATQCPDGKSVTCH
VKHYTNPSQDVTVPC

SEQ ID NO: 7, CH1 из IgD

APTKAPDVFPIISGRHRPKDNSPVVLACLITGYHPTSVTVTWYMGTSQSPQRTTFPEIQRRDSYYMTSSQLSTPLQWRQGEYKCVV
QHTASKSKKEIFRWPESP

SEQ ID NO: 8, CH1 из IgE

ASTQSPSVFPLTRCCKNIPSNATSVTLGCLATGYFPEPVMVTWDTGSLNGTTMTLPATTLTSLGHYATISLLTVSGAWAKQMFTCR
VAHTPSSTDWVDNKTFSVC

SEQ ID NO: 9, CH1 из IgM

GSASAPTLFPLVSCENSSPSSTVAVGCLAQDFLPDSITFSWKYKNNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVMOGTDEHVV
CKVQHPNGNKEKDVLPFVVI

SEQ ID NO: 10, TCR- α

PNIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDSVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNIIPED
TFFPSPESSCD

SEQ ID NO: 11, TCR- β 2

DLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPDHVELSWVWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFW
QNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTTQIVSAEAWGRADC

Фигура 34 (продолжение)

SEQ ID NO: 12, FcRn-альфа-3

GKGNLEWKPEPPSMRLKARPSSPGFSVLTCSAFSFYPPPELQLRFLRNGLAAGTGQGDGFPNSDGSFHASSSLTVKSGDEHHYCCIVQ
HAGLAQPLRVEL

SEQ ID NO: 13, β2-микро-глобулин

IQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSEFYLLYYTEFTPTTEKDEYACRVNHVT
LSQPKIVKWDRDM

SEQ ID NO: 14, HLA-A

GKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEITLTWQRDGEDQTDDELVETRPAGDGTQKWAADVVPSPGQEQRYTCH
VQHEGLPKPLTLRWE

SEQ ID NO: 15, HLA-B α3

DIETLQRADPPKTHVTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTDDELVETRPAGDRTQKWAADVVPSPGEEQRYTCH
VQHEGLPKPLTLRWE

SEQ ID NO: 16, HLA-D α2

GRIPVSRGFPIAEVFTLKPLEFGKPNLTLCFVSNLFPMLTVNWHDHSEVPVEGFGPTFVSAVDGLSFQAFSYLNFTPEPSDIFSCI
VTHEPDRYTAIAYWVPRNAL

SEQ ID NO: 17, HLA-D β2

WGSLTNRTRPPSVQAKTTFNTREPVMACYVWGFYPAEVTITWRKNGKLVHSSAHKTAQPNGDWTYQTLSHLALTPSYGDTYT
CVVEHIGAPEPILRDWTPGLSP

SEQ ID NO: 18, константная область Igκ

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC
EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 19, константная область Igλ

GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPKSKQSNKYAASSYLSTPEQWKSHRYS
CQVTHEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO: 20: CH31, 1ая CRI: CH1(IgG1), 2ая CRI: CH3(IgG1)

GQPREPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFSPSDIAVEWESGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYSCSV
HEALHNHYTQKSVEPKSC

SEQ ID NO: 21: CH3κ, 3я CRI: CLκ, 2ая CRI: CH3(IgG1)

GQPREPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLVNNFYPRIADIAVEWEVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYS
CSVMHEALHNHYTQKSFNRGEC

SEQ ID NO: 22: CH1H3, 1ая CRI: CH1 (IgG1), 2ая CRI: CH3 (IgG1)

GQPREPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFSPDVAVEWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVM
HEALHNHKVDKKVEPKSC

Фигура 34 (продолжение)

SEQ ID NO: 23: CLKH3, 3я CRI: CLK, 4ая CRI: CH3 (IgG1)

GQPREPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPSDAAVEWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYA
CEVMHEALHNHPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 24: b2mH3, 1ая CRI: бета-2-микроглобулин, 2ая CRI: CH3 (IgG1)

GQPREPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFYPSDIAVELLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTKDEYACRMHE
ALHNHPKIVKWRDM

SEQ ID NO: 25: FcRnH3, 3я CRI: домен альфа-3 FcRn, 4ая CRI: CH3 (IgG1)

GQPREPSMRLKARPSSPGFSVLTCSAFSFYPSDLALEFLRNGLAAGTGQDGFPSNSDGSFHASSSLTVKSGDEHHYCCIVMHEALH
NHPLRVEL

SEQ ID NO: 26: TCRaH3, 1ая CRI: константный домен альфа-цепи TCR, 2ая CRI: CH3 (IgG1)

GQPREPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFYPSDVAQEKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKNSAVAWSNKSDFACANMFEALHNHI PE
DTFFPSPESSC

SEQ ID NO: 27: TCRbH3, 3я CRI: константный домен бета-цепи TCR, 4ая CRI: CH3 (IgG1)

GQPREPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPSDVALEWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQN
PRNHFRQCVMFEALHNHIVSAEAWGRADC

SEQ ID NO: 28: TCRaH1, 1ая CRI: константный домен альфа-цепи TCR, 2ая CRI: CH1 (IgG1)

ASTKGPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFFPEPVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSM DYKNSAVAWSNKSDFACANAFKPSNTIPED
TFFPSPESSCD

SEQ ID NO: 29: TCRaLk, 3я CRI: константный домен альфа-цепи TCR, 4ая CRI: CLK

TVAAPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFYPREVVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSM DYKNSAVAWSNKSDFACANAFQGLSSIPEDT
FFPSPESSCD

SEQ ID NO: 30: TCRaLL, 3я CRI: константный домен альфа-цепи TCR, 4ая CRI: CLλ

GQPKANPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFYPGAVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSM DYKNSAVAWSNKSDFACANAFEGSIPEDT
FFPSPESSCD

SEQ ID NO: 31: TCRbH1, 1ая CRI: константный домен бета-цепи TCR, 2ая CRI: CH1 (IgG1)

ASTKGPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPEPEVLSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQN
PRNHFRQCQVQFKPSNTIVSAEAWGRADC

SEQ ID NO: 32: TCRb1Lk, 3я CRI: константный домен бета-цепи TCR, 4ая CRI: CLK

TVAAPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPREVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQN
RNHFRQCQVQFQGLSSIVSAEAWGRADC

SEQ ID NO: 33: TCRbLL, 3я CRI: константный домен бета-цепи TCR, 4ая CRI: CLλ

GQPKANPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPGAVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQ
NPRNHFRQCQVQFEGSIVSAEAWGRADC

Фигура 34 (продолжение)

SEQ ID NO: 34: VH13.7-CH2-CH31

HVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGYTFTDFYINWVRQAPGQGLEWIGEIVPSQGEAKYNDKFKARVTITADKSTSTAYMELSSL
RSEDTAVYYCARWDFLDYWGQGTTVTVSSSGTGGGSGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
PSDIAVEWESGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYSCSVMEALHNHYTQKSVEPKSC

SEQ ID NO: 35: VL13.7-CH2-CH3κ

DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLHNSGNTYLHWYQKPKGKAPKLLIYTVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE
DFATYYCSQSTHVPYTFGGGTKEIKGTGGGSGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLVNNFYPRD
IAVEWEVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYSCSVMEALHNHYTQKSFNRGEC

SEQ ID NO: 36: scFv13.7-шарнир-CH2-CH31

HVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGYTFTDFYINWVRQAPGQGLEWIGEIVPSQGEAKYNDKFKARVTITADKSTSTAYMELSSL
RSEDTAVYYCARWDFLDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLHNSGNTYLHWYQ
QKPGKAPKLLIYTVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCSQSTHVPYTFGGGTKEIKAAADKTHTCPPCPAPP
VAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPSDIAVEWESGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SVTVTPSSSLGTQTYSCSVMEALHNHYTQKSVEPKSC

SEQ ID NO: 37: шарнир-CH2-CH3κ

DKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLVNNFYPRDIAVEWEVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYSCSVMEALHNHYTQKSFNRGEC

SEQ ID NO: 38: scFvhuU3-шарнир-CH2-CH3κ

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQKPKGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATY
YCQQGNTLPWTFGQGTKEIKRGGGGSGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGGTFSGYTMNWVRQAPGQGLEWMG
LINPYKGVSTYNGKFKDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGSYGDSWDYFDVWGQGTTLTVTVSSGGGGSGGGGSDKT
HTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLVNNFYPRDIAVEWEVDNALQSGNSQESV
TEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYSCSVMEALHNHYTQKSFNRGECGGGGSGGGSGGGGSGTGGSGG

SEQ ID NO: 39: scFv3-43-шарнир-CH2-CH31

QVQLQQSGPGLVKPQSTLSLTCAISGDSVSNRAAWNIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAQSLKSRITINPDTPKNQFSLQL
NSVTPEDTAVYYCARDGQLGLDALDIWGQGTMTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSAGLTQPPAVSVAPGQTASITCGRDNIGSRSVHW
YQQKPGQAPVLYVYDDSDRPAGIPERFSGSNYENTATLTISRVEAGDEADYYCQVWGITSDHVVFGGKTTLVLAADKTHTCPPC
PAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPSDIAVEWESGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVTVTPSSSLGTQTYSCSVMEALHNHYTQKSVEPKSC

Фигура 34 (продолжение)

SEQ ID NO: 40: scFhuMCSP-шарнир-CH2-CH31

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSRWMNVWRQAPGQGLEWMGRIYPGDGTNYNGKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSL
RSEDTAVYYCARGNTVVVPYTM DYWGQGT TTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESDSYGNSF
MHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQNNEDPLTFGGGTKEIKRAADKTHTCP
PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFSPDIAVEWESGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYSCSVMEALHNHYTQKSVEPKSC

SEQ ID NO: 41: Последовательность аминокислот VH13.7-CH2-CH3k

HVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTDFYINWVRQAPGQGLEWIGEIVPSQGEAKYNDKFKARVTITADKSTSTAYMELSSL
RSEDTAVYYCARWDFLDYWGQGT TTVTVSSSGTGGGSGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPSVFI FPPSDEQLKSGTASVCLVNNFY
PRDIAVEWEVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYSCSVMEALHNHYTQKSFNRGEC

SEQ ID NO: 42: Последовательность аминокислот VL13.7-CH2-CH31

DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLHNSGNTYLHWYQQKPGKAPKLLIYTVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE
DFATYYCSQSTHVPYTFGGGTKEIKGTGGGSGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFSPD
IAVEWESGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYSCSVMEALHNHYTQKSVEPKSC

SEQ ID NO: 43: Последовательность аминокислот VHCD3-CH2-CH3k-scFvHer3

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSGYTMNVWRQAPGQGLEWMGLINPYKGVSTYNGKFKDRVTITADKSTSTAYMELSSL
RSEDTAVYYCARSGYYGDSWDYFDVWGQGT LVTVSSSGTGGGSGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPSVFI FPPSDEQLKSGTASV
CLVNNFYPRDIAVEWEVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYSCSVMEALHNHYTQKSFNRGECDKTH
TAPAPPVAGQVQLQSGFGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNRAAWNWI RQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAQSLKSRITINPDT
PKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDGQLGLDALDIWGQGTMTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSAAGLTQPPAVSVAPGQTASITCGRD
NIGSRSVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRPAGI PERFSGSNYENTATLTISRVEAGDEADYYCQVWGITS DHVVFVGGGT KLTVL

SEQ ID NO: 44: Последовательность аминокислот VLCD3-CH2-CH31-scFvHer3

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDIATY
YCQQGNTLPWTFGQGTKEIKGTGGGSGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFSPDIAVEW
ESGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYSCSVMEALHNHYTQKSVEPKSCDKTHHTAPAPPVAGQVQLQSGPG
LVKPSQTLSTCAISGDSVSSNRAAWNWI RQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAQSLKSRITINPDT PKNQFSLQLNSVTPEDTAV
YYCARDGQLGLDALDIWGQGTMTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSAAGLTQPPAVSVAPGQTASITCGRDNIGSRSVHWYQQKPGQAPV
LVVYDDSDRPAGI PERFSGSNYENTATLTISRVEAGDEADYYCQVWGITS DHVVFVGGGT KLTVL

SEQ ID NO: 45: Последовательность аминокислот CH3 IgG1

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Фигура 34 (продолжение)

SEQ ID NO: 46; Последовательность аминокислот CH3 IgG2

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 47; Последовательность аминокислот CH3 IgG3

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCS
VMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 48; Последовательность аминокислот CH3 IgG4

GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO: 49; Последовательность аминокислот CH4 IgM

VALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFSPADVFWQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEEWNTGE
TYTCVVAHEALPNRVTERTVDKSTGK

SEQ ID NO: 50; Последовательность аминокислот CH3 IgA1

GNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVLTCLARGFSPKDVLRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTFFAVTSILRVAEDWKKG
DTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRLAGK

SEQ ID NO: 51; Последовательность аминокислот CH3 IgA2

GNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVLTCLARGFSPKDVLRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTFFAVTSILRVAEDWKKG
DTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRLAGK

SEQ ID NO: 52; Последовательность аминокислот CH3 IgD

VPAQAPVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSQPAT
YTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSYVT

SEQ ID NO: 53; Последовательность аминокислот CH4 IgE

GPRAAPEVYAFATPEWPGSRDKRTLACLIQNFMPEDISVQWLHNEVQLPDARHSTTQPRKTKSGGFFVFSRLEVTRAWEQKDEFI
CRAVHEAASPSQTVQRAVSVNPGK

SEQ ID NO: 54, константная область Igλ.

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS
CQVTHEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO: 55, константная область Igλ.

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPAKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYS
CQVTHEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO: 56, константная область Igλ.

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVKVAWKADGSPVNTGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS
CQVTHEGSTVEKTVAPAECS

Фигура 34 (продолжение)

SEQ ID NO: 57, константная область Igλ

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLVSDFYPGAVTVAWKADGSPVKVGVEITKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS
CRVTHEGSTVEKTVAPAECS

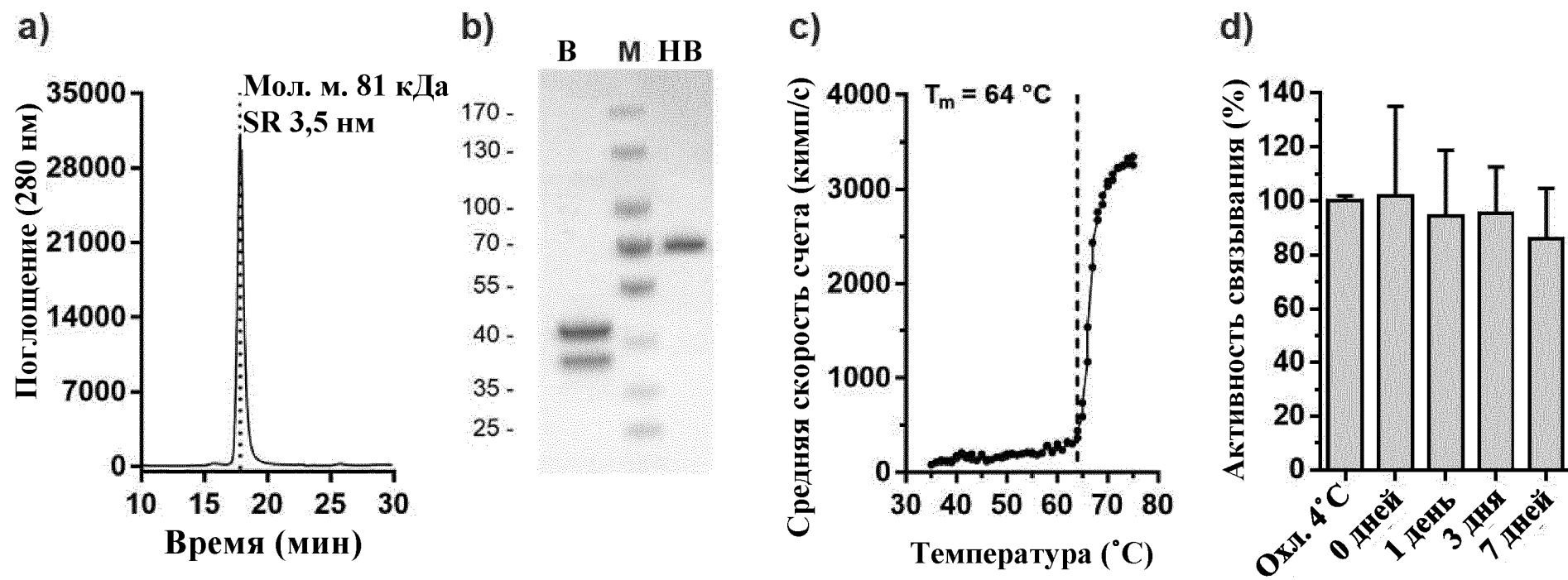
SEQ ID NO: 58, TCR-β1

EDLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWVNGKEVHSGVSTDPOPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATF
WQNPRNHFRQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVITQIVSAEAWGRADC

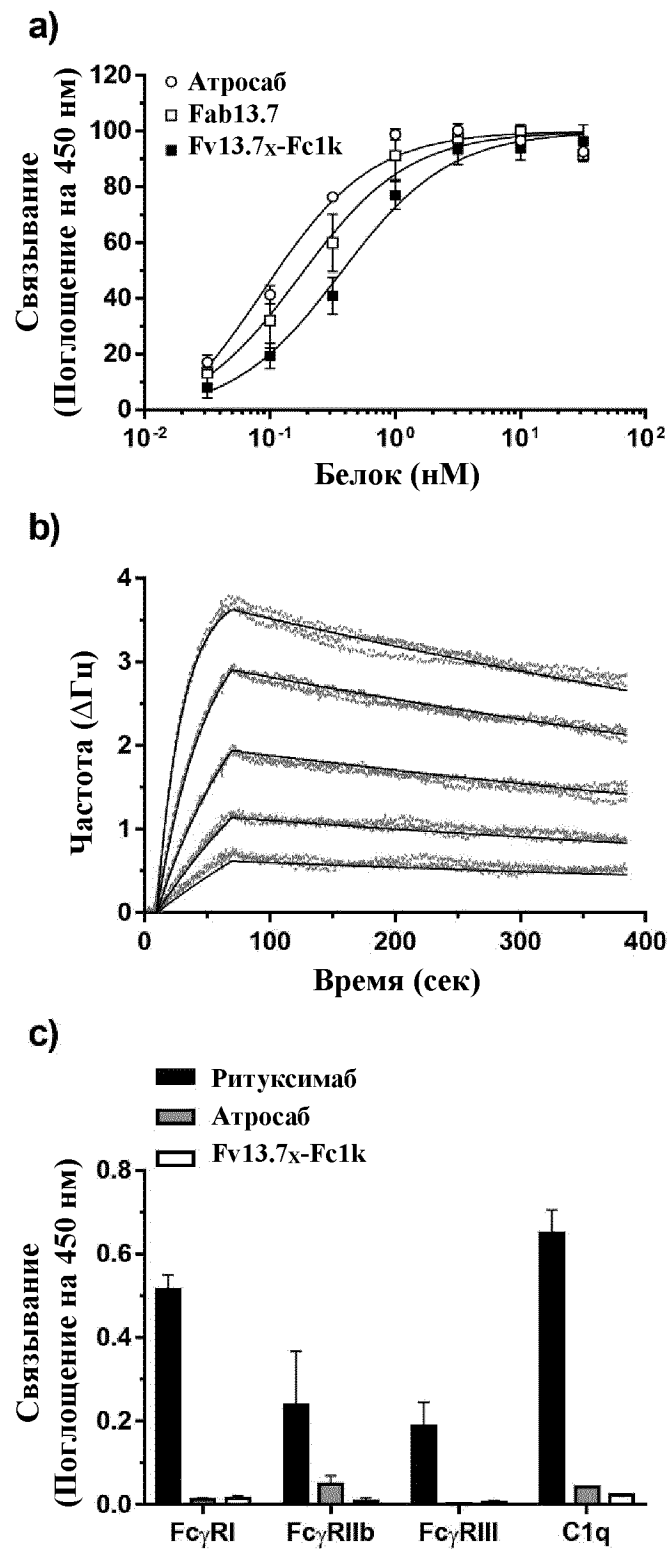
SEQ ID NO: 59, HLA-D-β2

WGSLTNRTRPPSVQAKTTPFNTREPVMLACYVWGFYPAEVTITWRKNGKLVMHSSAHKTAQPNGDWTYQTLSHLALTPSYGDTYT
CVVEHIGAPEPILRDWTFGLSPMQTLK

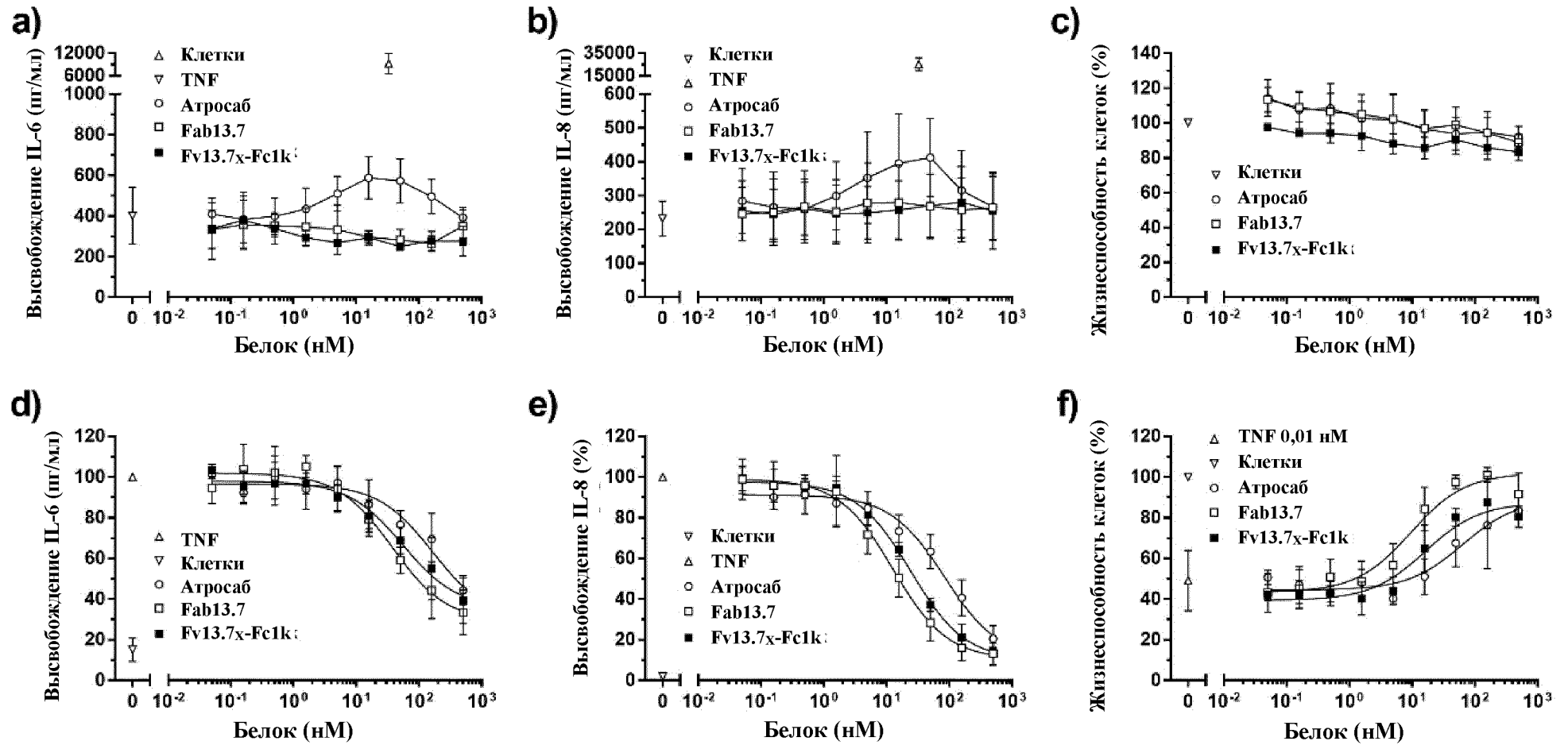
Фигура 35



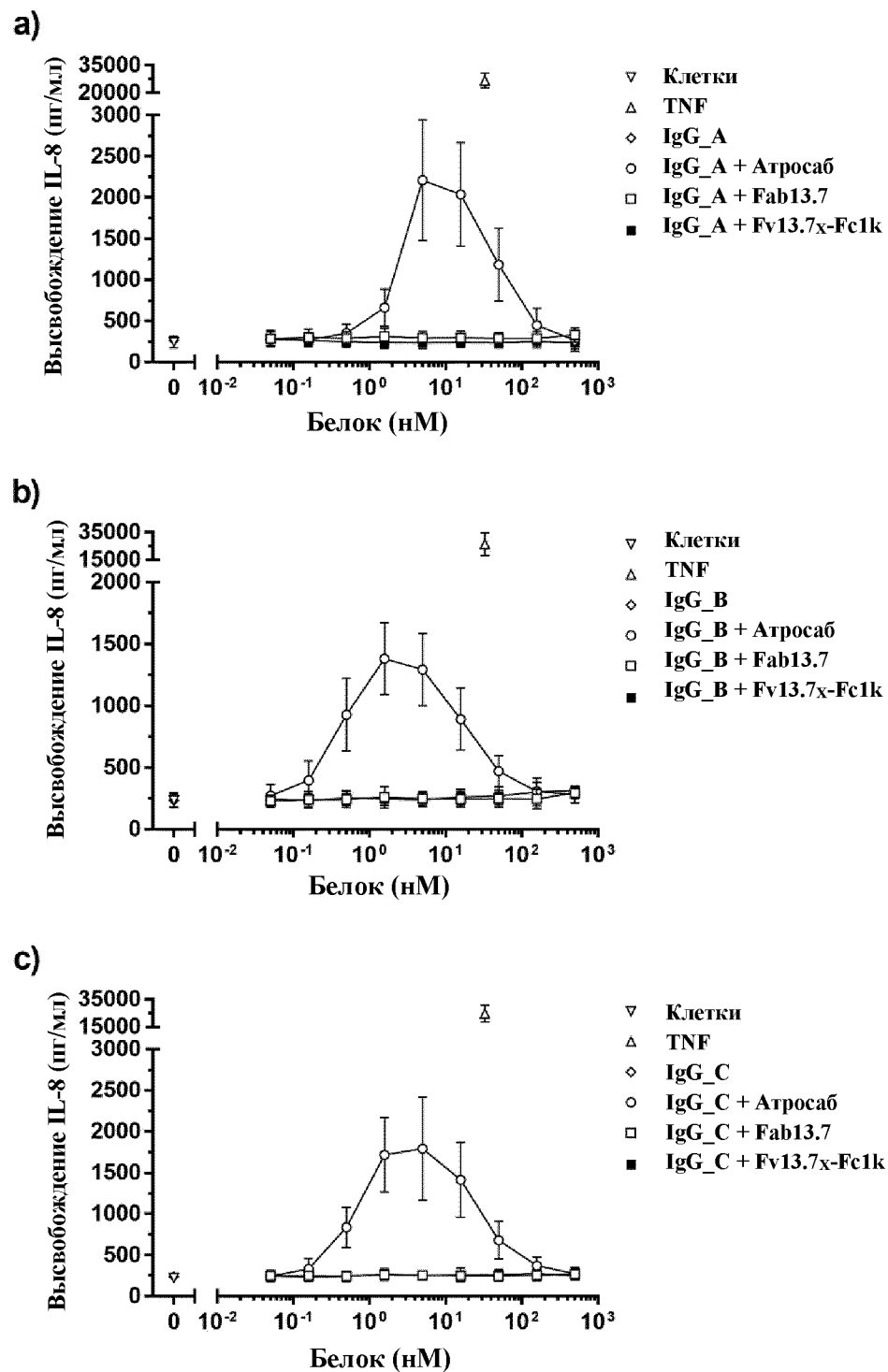
Фигура 36



Фигура 37



Фигура 38



Фигура 39

