

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202191242** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.11.25

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

(22) Дата подачи заявки
2019.12.30

(54) УСЕЧЕННЫЕ ПОЛИВАЛЕНТНЫЕ МУЛЬТИМЕРЫ

(31) 62/786,806

(32) 2018.12.31

(33) US

(86) PCT/NL2019/050880

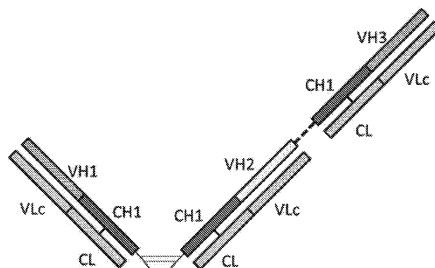
(87) WO 2020/141974 2020.07.09

(71) Заявитель:
МЕРУС Н.В. (NL)

(72) Изобретатель:
Де Крёйф Корнелис Адриан (NL)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Изобретение относится к усеченному поливалентному мультимеру, содержащему два или более связывающих домена, причем каждый связывающий домен связывается с разным антигеном или эпитопом, и при этом два из указанных связывающих доменов соединены посредством шарнирной области, причем в мультимере отсутствует область CH2 или CH3. Настоящее изобретение также предусматривает два полипептида, которые соединены на своих соответствующих С-концах или вблизи них, содержащие два или более дисульфидных мостиков, причем каждый из указанных полипептидов содержит вариабельный связывающий домен, содержащий вариабельную область, причем каждая вариабельная область связывается с одинаковыми или разными антигенами или эпитопами на антигене.



A1

202191242

202191242

A1

УСЕЧЕННЫЕ ПОЛИВАЛЕНТНЫЕ МУЛЬТИМЕРЫ

Область техники

5 Настоящее изобретение относится к поливалентным мультимерам, имеющим два или более связывающих доменов, соединенных посредством шарнира на своих С-концах, и к способу
получения таких поливалентных мультимеров. Кроме того, изобретение дополнительно относится
к полипептидам, образующим поливалентные мультимеры, способные связываться с двумя или
более эпитопами или антигенами, причем такие полипептиды соединяются посредством
10 ковалентных связей, содержащих дисульфидный мостик.

Уровень техники

В данной области техники известны поливалентные антитела, такие как биспецифические
15 антитела, способные связываться с двумя антигенами или двумя эпитопами. Такие поливалентные
связывающие белки могут быть получены с использованием различных технологий, включая
слияние клеток, химическую конъюгацию или методики рекомбинантной ДНК.

Антитела, как правило, представляют собой мультимеры, состоящие из четырех белков,
включая две идентичные тяжелые цепи и две идентичные легкие цепи, причем тяжелая цепь состоит
20 из переменного домена (VH) и трех константных областей (CH1, CH2, CH3), а легкая цепь состоит
из переменного домена (VL) легкой цепи и константной области (CL). Как правило, легкая цепь
соединяется с тяжелой цепью за счет влияния нековалентных взаимодействий, а также посредством
дисульфидной связи. Две тяжелых цепи соединяются друг с другом в шарнирной области через
дисульфидные связи и посредством взаимодействий аминокислот на интерфейсе между двумя
25 доменами CH3. Соединение VH с VL образует антигенсвязывающий домен, и, как правило,
вариабельность встречается в трех образующих поверхностную петлю областях в доменах VH и VL,
которые представляют собой определяющие комплементарность области или CDR.

В данной области техники известны определенные поливалентные форматы, такие как
антитела, имеющие два разных связывающих домена, например, как в биспецифических антителах,
30 которые могут связывать два разных антигена или два разных эпитопа в пределах одного и того же
антигена. Благодаря такому формату можно применять калиброванное связывание, которое
позволит селективно нацеливать поливалентный мультимер на клетки или мишени, которые
экспрессируют два антигена или эпитопа, такие как опухолевая клетка, и при этом не воздействуют
на здоровые клетки, экспрессирующие один антиген, или нацеливать на такие здоровые клетки,
35 экспрессирующие один антиген на более низких уровнях экспрессии. Аналогичным образом
наличие двух различных связывающих доменов на поливалентном мультимере, таком как
биспецифическое антитело, может обеспечивать возможность связывания с различными
антигенами так, что указанный поливалентный мультимер можно использовать для нацеливания
как на ингибирующую, так и на стимулирующую молекулу на одной клетке или на двух

взаимодействующих клетках, что приводит к повышению активности поливалентного мультимера. Поливалентный мультимер можно также использовать для переориентирования клеток, например иммуномодулирующих клеток, которые могут быть переориентированы на опухоль.

Хотя в данной области техники описаны определенные поливалентные антитела, существует потребность в новых форматах, и новых линкерах, и новых методологиях для получения таких форматов, с помощью которых можно эффективно продуцировать форматы поливалентных антител, для которых можно легко получать связывающие домены с набором антигенов и эффективно и стабильно преобразовывать их в поливалентный мультимер, и которые способны связываться с широким спектром антигенов и эпитопов, включая такой формат, в котором отсутствует (частично или полностью) область Fc, содержащая область CH2 и/или CH3.

Создание мультиспецифических форматов, не содержащих область Fc, таких как формат $F(ab')_2$ или $F(ab')_n$ (где n составляет два или более), может обеспечивать преимущества по сравнению с существующими мультиспецифическими антителами. Например, если может потребоваться вовлечение или перенаправление иммуномодулирующих клеток посредством нацеливания на такую клетку и интересующий антиген, наличие Fc-компонента на таком нацеливающем фрагменте может в определенных областях применения отрицательно влиять на эффективность.

Аналогичным образом мультиспецифический формат $F(ab')_n$ может быть желателен по сравнению с полноразмерным форматом в случаях, когда предпочтительным является формат меньшего размера, включая возможность инфильтрации в солидные опухоли и/или обеспечение более короткого периода полужизни, когда такой признак может обеспечивать преимущества при выборе схемы дозирования. Важно отметить, что конструирование форматов $F(ab')_n$, содержащих более двух связывающих доменов, имеющих разные мишени, обычно требует много времени, является неэффективным и/или дорогостоящим. Например, в данной области техники известно создание фрагментов $F(ab')_2$ различными способами, каждый из которых имеет свои недостатки, где целью является создание большого производства однородных партий таких фрагментов для терапевтического применения.

Одним из способов создания $F(ab')_2$, известных в данной области техники, является применение химических средств. Nisonoff и Rivers использовали процесс химического соединения еще несколько десятилетий назад. Nisonoff A, Rivers MM (1961) Arch Biochem Biophys 93:460. Впоследствии были разработаны различные способы с использованием гомобифункциональных и гетеробифункциональных химических реагентов. На сегодняшний день не существует химической методологии, которая может эффективно или практически использоваться в качестве подхода к разработке потенциального терапевтического мультиспецифического фрагмента $F(ab')_n$ из-за времени, стоимости, низкого количества и гетерогенности, которые могут быть получены такими химическими средствами. Аналогичным образом такие средства химического синтеза фрагментов $F(ab')_n$ также не получили широкого признания из-за применения синтетических средств соединения двух доменов Fab, которые вызывают отдельные опасения, связанные с применением в терапевтических целях, а также вопросы с проблемами производства.

Например, F(ab')₂ можно создавать с использованием *o*-PDM. Фрагмент Fab' антитела А взаимодействует с *o*-PDM, что приводит к образованию вицинальных дитиолов, входящих в состав *o*-PDM (R), а одна из SH групп связывается с *o*-PDM через оставшуюся свободную малеимидную группу. Fab А–*o*-PDM взаимодействует со свободным фрагментом Fab' В, в результате чего образуется тиоэфирная связь между двумя Fab. Следует отметить, что трудности, связанные с такими синтетическими средствами получения, включают в себя сложности очистки таких объектов до гомогенности и конструирования таких фрагментов без изменения шарнирной области человеческого антитела, что может приводить к иммуногенности и отсутствию стабильности *in vivo*.

Действительно, хотя такие искусственные антитела были созданы в течение 2000-х годов, и были проведены клинические исследования с химически соединенными Fab для лечения различных типов рака, от этой концепции в конечном итоге отказались, в том числе из-за сложностей в создании таких антител.

Другим способом создания фрагментов F(ab')₂ является частичное протеолитическое расщепление IgG неспецифическими протеазами, такими как папаин. Такие ферменты могут разрезать шарнирную область антител IgG, содержащих соединяющие тяжелые цепи дисульфидные связи, но также и ниже участка дисульфидной связи между легкой и тяжелой цепями. Такие методики страдали от наличия нерасщепленного IgG, избыточного расщепления и отсутствия воспроизводимости. Такие неспецифические протеазы также применяли в качестве средства создания фрагментов F(ab')₂ посредством расщепления полноразмерных антител для отщепления Fc. Эти методики также требуют много времени и специфичной для IgG оптимизации и ингибирования протеазы или очистки Fab для предотвращения их разложения. Более того, эти расщепления приводили к получению гетерогенных популяций фрагментов, включая чрезмерно расщепленные, недостаточно расщепленные, без какой-либо точности в отношении сайта расщепления, что делает использование таких фрагментов для исследовательского и терапевтического применения непрактичным. Оказалось сложно контролировать расщепления папаином таким образом, чтобы отщепление велось только по верхней шарнирной области, а не также в альтернативных сайтах, что может происходить в зависимости от структуры и гибкости расщепляемого антитела. Соответственно, расщепление поливалентных антител, имеющих два или более связывающих доменов, посредством папаина для некоторых областей применения является неприемлемым и неосуществимым. Аналогичным образом использовали пепсин для расщепления антител ниже шарнирной области с целью получения интактного F(ab')₂. Недостатки работы с пепсином были аналогичны работе с папаином.

Недавно в литературе были описаны ферменты, способные отщеплять участки Fab от Fc у полноразмерного иммуноглобулина с получением отдельных фрагментов Fab или F(ab')₂. Такие ферменты описаны для ограниченных сфер применения, включая оценку различий авидности по сравнению с аффинностью или анализ молекулярной массы или состава составляющих частей данного мультимера.

Соответственно, существует потребность в новых и полезных форматах для поливалентных антигенсвязывающих мультимеров, имеющих две или более переменные области человека и линкеры, для получения усеченных поливалентных мультимеров, не имеющих всех или части Fc, имеющих природное (не химически синтезированное) шарнирное соединение или объединения областей Fab (F(ab')_n), которые могут быть получены эффективно и гомогенно. В настоящем документе описано создание усеченных поливалентных мультимеров, не имеющих Fc-областей, способных нацеливаться на антигены и пригодных к использованию в терапевтических целях.

Изложение сущности изобретения

10

Настоящее изобретение относится к поливалентному мультимеру, содержащему два или более связывающих доменов, причем каждый связывающий домен связывается с разным антигеном или эпитопом или с одним и тем же антигеном или эпитопом, и при этом два из указанных связывающих доменов соединены посредством шарнирной области, причем в мультимере отсутствует константный домен, включающий область CH2 или CH3.

Настоящее изобретение дополнительно содержит два полипептида, которые соединены на своих соответствующих С-концах или вблизи них, содержащие дисульфидный мостик, причем каждый из указанных полипептидов содержит переменную область, причем каждая переменная область связывается с одинаковыми или разными антигенами или эпитопами на антигене. Указанные связывающие домены сами предпочтительно соединены с переменной областью с образованием связывающего домена, обычно VH-CH1, соединенного с доменом VL-CL, причем VL или VH представляют собой общую цепь, общую для каждого связывающего домена мультимера.

В одном варианте осуществления поливалентный мультимер содержит три или более переменных областей тяжелой цепи человека, содержащих короткое плечо переменной области (VH1), и длинное плечо, содержащее две переменные области (VH2 и VH3). В другом варианте осуществления каждая тяжелая цепь содержит scFv. В другом варианте реализации каждая область тяжелой цепи содержит домен CH1. В другом варианте осуществления каждая переменная область тяжелой цепи соединена с общей легкой цепью (VLc). В другом варианте осуществления общая легкая цепь содержит VL-CL. В другом варианте осуществления общая легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 1. В другом варианте осуществления каждая тяжелая цепь мультимера содержит общую переменную область (VHc).

В одном варианте осуществления две из переменных областей, предпочтительно переменные области тяжелой цепи, соединены посредством переменной области и домена CH1 (см. штриховую линию на Фиг. 1). В другом варианте осуществления переменные области связаны посредством полипептидного линкера. В другом варианте осуществления линкер, соединяющий переменные области на полипептиде, содержит последовательность, выбранную из группы, содержащей последовательности SEQ ID NO: 2–25, или полипептид, имеющий степень идентичности по меньшей мере приблизительно 85% с одной из указанных последовательностей. В другом варианте осуществления линкер является коротким, длинным, заряженным, жестким или

гибким. В другом варианте осуществления аминокислотная последовательность линкера содержит последовательность природного происхождения или содержит последовательность, полученную из последовательности природного происхождения. В другом варианте осуществления линкер содержит последовательность средней шарнирной области. В другом варианте осуществления линкер содержит верхнюю и нижнюю шарнирные последовательности. В другом варианте осуществления линкер содержит образующую спираль последовательность.

В другом варианте осуществления две из двух или более указанных переменных областей тяжелой цепи соединены друг с другом (димеризованы) на своих соответствующих С-концах или вблизи них, предпочтительно содержат два или более дисульфидных мостиков, причем указанные дисульфидные мостики являются такими же или по существу такими же, как и те мостики у антитела природного IgG, которые присутствуют между областью СН1 и СН2. Специалистам в данной области техники понятно, что количество шарнирных дисульфидных связей в подклассах иммуноглобулинов варьируется, каждая из них охватывается изобретением, описанным в настоящем документе (Papadea and Check 1989).

В одном варианте осуществления каждая переменная область мультимера специфически связывается с разным эпитопом.

В другом варианте осуществления поливалентный мультимер связывается с по меньшей мере двумя разными антигенами.

Изобретение также относится к способу получения поливалентного мультимера, включающему:

получение панели антител, содержащих переменную область общей легкой цепи и перестроенные тяжелые цепи, которые специфически связываются с двумя или более мишенями;

интеграцию в клетку-хозяина нуклеиновой кислоты, кодирующей общую переменную область легкой цепи и две или более перестроенные тяжелые цепи, причем две из указанных перестроенных тяжелых цепей содержат константную область, содержащую домен СН1, СН2 и/или СН3, способный к соединению;

культивирование клетки-хозяина в условиях, обеспечивающих экспрессию интактного поливалентного мультимера, содержащего общую легкую цепь и две или более перестроенных тяжелых цепей, причем две из указанных перестроенных тяжелых цепей соединены между доменом СН1 и СН2 каждой из указанных двух перестроенных тяжелых цепей; и

обработку интактного поливалентного мультимера ферментом, который отщепляет область СН2 и/или СН3 от каждой из двух указанных перестроенных тяжелых цепей, сохраняя соединение двух указанных перестроенных тяжелых цепей с образованием поливалентного мультимера.

В другом варианте осуществления, описанном в настоящем документе, панель антител получают путем иммунизации мишенью трансгенного животного, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую общую переменную область легкой цепи и неперестроенную переменную область тяжелой цепи.

В другом варианте осуществления, описанном в настоящем документе, соединение осуществляется посредством двух или более дисульфидных мостиков.

В одном варианте осуществления константная область тяжелой цепи двух из указанных перестроенных тяжелых цепей, содержащая домен СН1, СН2 и/или СН3, содержит модификацию, способствующую гетеродимеризации. В другом варианте осуществления модификация содержится в областях СН2 или СН3 иммуноглобулина. В другом варианте осуществления модификация представляет собой модификацию типа выступ-во-впадину, электростатическую модификацию или модификацию DEKK для соответствующих двух тяжелых цепей. В другом варианте осуществления экспрессируемый клеткой-хозяином мультимер содержит первый домен СН3, который димеризуется со вторым доменом СН3, причем первый из них содержит аминокислотный остаток лизина в положениях 351 и 366 или в положениях, соответствующих им, а второй из них содержит аминокислотные остатки аспарагиновой кислоты в положении 351 и глутаминовой кислоты в положении 368 или в положениях, соответствующих им, согласно схеме нумерации EU.

В другом варианте осуществления клетка-хозяин интегрирована с нуклеиновой кислотой, кодирующей две или более различные переменные области легкой цепи, способные связываться с различными антигенами, а две или более переменные области тяжелой цепи являются общими, так что способность мультиспецифического мультимера связываться с двумя или более антигенами или эпитопами обеспечивается различной специфичностью связывания переменных областей легкой цепи.

В одном варианте осуществления общие переменные области кодируются нуклеиновой кислотой, полученной из, производной от или основанной на нуклеиновой кислоте, кодируемой трансгенным животным, предпочтительно грызуном, содержащим в своей зародышевой линии нуклеиновую кислоту, которая кодирует перестроенную переменную цепь.

В одном варианте осуществления способ дополнительно содержит восстановление поливалентного мультимера.

В одном варианте осуществления фермент, расщепляющий домены СН2 и/или СН3 указанных двух тяжелых цепей, метят так, чтобы его можно было удалять посредством аффинной хроматографии, а затем очищают смесь фермента, поливалентного мультимера и фрагментов константных доменов. В дополнительном варианте осуществления фермент заряжают таким образом, чтобы его можно было удалять из смеси поливалентных мультимеров и отщепленных константных доменов посредством хроматографии на основе заряда.

Настоящее изобретение также относится к поливалентному мультимеру, который может быть произведен или получен способами настоящего изобретения.

Настоящее изобретение также относится к клетке, содержащей нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды, которые способны к сборке в поливалентный мультимер изобретения.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, которая содержит поливалентный мультимер изобретения и фармацевтически приемлемый носитель и/или разбавитель.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения, страдающего от медицинского состояния субъекта, включающему введение субъекту терапевтически эффективного количества поливалентного мультимера изобретения.

Настоящее изобретение также относится к поливалентному мультимеру изобретения для применения в терапии.

5

Краткое описание графических материалов

На Фиг. 1a представлен пример формата описанных ранее поливалентных мультимеров, а на Фиг. 1b представлен пример формата изобретения, описанного в настоящем документе. Поливалентные мультимеры изобретения, описанные в настоящем документе, содержат два полипептида, соединенные на своих соответствующих С-концах посредством двух или более дисульфидных мостиков.

10

На Фиг. 2a–e представлен SDS-PAGE анализ IgG, Fab, F(ab')₂ в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях.

15

На Фиг. 3 представлен анализ зависимой от херегулина пролиферации MCF-7, демонстрирующий эффективность биспецифического F(ab')₂, полученного способами, описанными в настоящем документе.

20

25

30

На Фиг. 4a представлен пример ранее описанного мультиспецифического формата, содержащего общую легкую цепь, три отдельные перестроенные тяжелые цепи, способные связываться с различными антигенами, причем две из указанных отдельных тяжелых цепей спарены посредством гетеродимеризации DEKK. Пример приведен по WO 2019/190327, который включен в настоящий документ путем ссылки. На Фиг. 4b представлен пример поливалентного мультимера изобретения, описанного в настоящем документе, содержащего в элементе 4b1 F(ab')₃, в котором две тяжелые цепи соединены на своих соответствующих С-концах посредством двух дисульфидных мостиков. В элементе 4b2 также показан 2Fab' (где дисульфидный мостик, соединяющий тяжелые цепи, расщеплен, а два Fab связаны посредством линкера, описанного в настоящем документе), а в элементе 4b3 — Fab. Как описано в настоящем документе, 2Fab' и Fab получают, когда трехвалентный мультимер расщепляется в области между CH1 и CH2 для каждой соответствующей тяжелой цепи. Эта фигура не имеет ограничительного характера, поскольку к базовому фрагменту F(ab')₂ можно добавлять дополнительные связывающие домены в модульном формате путем добавления к N-концевым областям областей VL или VH линкеров, соединяющих домен CH1-VH или CL-VL, который способен соединяться с когнатным доменом с образованием дополнительного связывающего домена.

35

На Фиг. 5a представлен SDS-PAGE анализ трехвалентных молекул IgG в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях, демонстрирующий успешное получение мультимеров IgG, Fab, F(ab')₃.

Подробное описание

Изобретение основано на новых и модульных форматах для поливалентных мультимеров, содержащих две или более переменные области, причем две переменные области содержат на своих соответствующих С-концах два или более дисульфидных мостиков, которые соединяют указанные переменные области, как в антителе природного IgG, причем указанный поливалентный мультимер способен связываться с двумя или более различными антигенами или эпитопами. Указанные поливалентные мультимеры не содержат Fc-области антитела (содержащей домен CH2 и/или CH3) и могут быть получены таким образом, что указанные поливалентные мультимеры включают в себя F(ab')_n, где n составляет два или более.

Такие поливалентные мультимеры отличаются от типичных фрагментов антитела, таких как стандартный F(ab')₂, поскольку поливалентные мультимеры, включая F(ab')₂ или F(ab')_n, описанные в настоящем документе, могут связываться с одинаковыми или разными антигенами и не могут быть получены путем расщепления IgG пепсином с последующим восстановлением и повторным окислением полученных фрагментов Fab', но могут быть получены после гетеродимеризационного соединения, включая использование конструирования DEKK, с последующим ферментативным отщеплением Fc, что оставляет неизменным естественный шарнир, соединяющий полипептиды F(ab')_n посредством дисульфидных мостиков. Такие поливалентные мультимеры необязательно содержат общую цепь (тяжелую или легкую) в каждом связывающем домене и используют линкеры для соединения двух или более указанных связывающих доменов.

Такие поливалентные мультимеры обладают потенциальным преимуществом более короткого периода полужизни, который может быть связан с меньшим накоплением в организме, что тем самым снижает риски, возникающие из-за продуктов их разложения, и более быстрых корректировок концентрации антитела, что может быть полезно, когда, например, терапевтический поливалентный мультимер обладает клинической эффективностью, но требует быстрого выведения из организма. Кроме того, поливалентные мультимеры могут быть менее иммуногенными, чем интактные антитела или связывающие фрагменты антитела, которые содержат синтетические компоненты для объединения связывающих доменов, таких как (scFv)₂, ди-scFv и фрагменты диатела. Изобретение, описанное в данном документе в отношении фрагментов F(ab')_n, является новым и легко воспроизводимым, несущим общую цепь в каждом связывающем домене, таком как Fab, и включает в себя соединение CH1/CL, которое повышает стабильность при соединении двух или более Fab посредством линкеров, причем указанные линкеры предпочтительно не содержат мотивов, распознаваемых протеолитическим ферментом, используемым в способах, описанных в настоящем документе.

Определения

Термин «антитело» означает белковую молекулу, относящуюся к классу белков иммуноглобулинов, содержащих один или более доменов, которые связывают эпитоп на антигене,

причем такие домены получены из вариабельной области антитела или имеют общую с ним гомологию последовательности. Связывание антител имеет различные качества, включая специфичность и аффинность. Специфичность определяет, какой антиген или его эпитоп специфически связывается со связывающим доменом. Аффинность является показателем силы связывания с конкретным антигеном или эпитопом. Стоит отметить, что «специфичность» антитела относится к его селективности в отношении конкретного антигена, тогда как «аффинность» относится к прочности взаимодействия между антигенсвязывающим сайтом антитела и эпитопом, с которым он связывается.

Таким образом, термин «специфичность связывания» при использовании в настоящем документе относится к способности отдельного сайта связывания реагировать с антигенной детерминантой. Как правило, сайт связывания мультимера настоящего изобретения расположен в доменах Fab и сконструирован из гипервариабельной области тяжелой и/или легкой цепей.

«Аффинность» представляет собой прочность взаимодействия между одним антигенсвязывающим сайтом и его антигеном. Один антигенсвязывающий сайт мультимера настоящего изобретения для антигена может быть выражен в виде константы диссоциации (КД). Как правило, антитела для терапевтического применения могут иметь аффинность до 1×10^{10} М или даже выше.

«Антиген» представляет собой молекулу, способную индуцировать иммунный ответ (выработку антител) в организме-хозяине и/или быть мишенью для антитела. На молекулярном уровне антиген характеризуется способностью связываться с антигенсвязывающим сайтом антитела. Кроме того, смеси антигенов можно считать «антигеном», т. е. специалисту в данной области техники будет понятно, что иногда лизат опухолевых клеток или вирусных частиц может быть обозначен в качестве «антигена», тогда как такой лизат опухолевых клеток или препарат вирусных частиц содержит множество антигенных детерминант (например, эпитопов). Антиген содержит по меньшей мере один, но часто больше эпитопов.

Термины «эпитоп» и «антигенная детерминанта» означают участок на антигене, с которым специфически связывается иммуноглобулин или антитело. Эпитопы могут быть образованы из смежных аминокислот или несмежных аминокислот, расположенных рядом друг с другом в результате третичной укладки белка (так называемые линейные и конформационные эпитопы соответственно). Эпитопы, образованные из смежных, линейных аминокислот, как правило, сохраняются под воздействием денатурирующих растворителей, тогда как конформация эпитопов, образованных в результате третичной укладки, как правило, нарушается при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп может, как правило, включать в себя 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

Термин «тяжелая цепь» или «тяжелая цепь иммуноглобулина» включает в себя последовательность константной области тяжелой цепи иммуноглобулина (или ее функционального фрагмента) и, если не указано иное, включает в себя вариабельный домен тяжелой цепи (или ее функционального фрагмента) из любого организма. Термин «вариабельные домены тяжелой цепи» включает в себя три CDR тяжелой цепи и четыре каркасные (FR) области, если не

указано иное. Фрагменты тяжелых цепей включают в себя CDR, и FR, и их комбинации. Типичная тяжелая цепь включает в себя (от N-конца к С-концу) переменный домен, домен CH1, шарнир, домен CH2 и домен CH3. Функциональный фрагмент тяжелой цепи включает в себя фрагмент, способный специфически распознавать антиген и содержащий по меньшей мере один CDR.

- 5 Тяжелые цепи, которые можно использовать с настоящим изобретением, включают в себя цепи, которые, например, не связывают избирательно эпитоп, избирательно связываемый когнатными легкими цепями.

- Термин «легкая цепь» или «легкая цепь иммуноглобулина» включает в себя переменный домен легкой цепи иммуноглобулина, или V_L (или его функциональный фрагмент); и константный домен иммуноглобулина, или последовательность C_L (или ее функциональный фрагмент) из любого организма. Если не указано иное, термин легкая цепь может включать в себя легкую цепь, выбранную из человеческой цепи каппа, лямбда и их комбинации. Переменные домены (V_L) легкой цепи, как правило, включают три CDR легкой цепи и четыре каркасных области (FR), если не указано иное. Как правило, полноразмерная легкая цепь включает в себя (от N-конца до С-конца) домен V_L , который включает в себя FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 и константный участок легкой цепи. Легкие цепи, которые можно использовать с настоящим изобретением, включают в себя цепи, которые, например, не связывают избирательно эпитоп, избирательно связываемый когнатными тяжелыми цепями.

- Подходящие легкие цепи для применения в поливалентном мультимере настоящего изобретения включают в себя общую легкую цепь, такую как цепи, которые могут быть идентифицированы путем скрининга для поиска наиболее часто используемых легких цепей в существующих библиотеках антител (влажные библиотеки или электронные), причем легкие цепи по существу не влияют на аффинность и/или селективность связывающих эпитоп доменов тяжелых цепей, но также могут быть соединены с рядом тяжелых цепей. Например, подходящая легкая цепь включает в себя цепь от трансгенного животного, такого как трансгенный грызун, содержащий общую легкую цепь, встроенную в его геном, и которую можно использовать для получения больших панелей антител с общей легкой цепью, обладающих разнообразием тяжелой цепи при воздействии антигена. Тяжелые цепи для применения в поливалентном мультимере настоящего изобретения могут аналогичным образом включать в себя общую тяжелую цепь.

- В соответствии с изобретением термин «общая легкая цепь» относится к легким цепям, которые могут быть идентичными или могут иметь некоторые различия в аминокислотной последовательности, не приводящие к изменению специфичности связывания антитела изобретения, т. е. различия не оказывают существенного влияния на образование функциональных связывающих областей.

- Например, оставаясь в рамках объема определения общих цепей, используемого в настоящем документе, возможно получить или обнаружить переменные цепи, которые не являются идентичными, но сохраняют функциональную эквивалентность, например, посредством внедрения и исследования консервативных аминокислотных изменений, изменений аминокислот в областях, которые не влияют или лишь частично влияют на специфичность связывания при

объединении с когнатной цепью и т. п. Таким образом, такие варианты также способны связываться с различными когнатными цепями и образовывать функциональные антигенсвязывающие домены. Таким образом, в настоящем документе термин «общая легкая цепь» относится к легким цепям, которые могут быть идентичными или могут иметь некоторые различия в аминокислотной последовательности, не приводящие к изменению специфичности связывания получаемого антитела после соединения с тяжелой цепью. Комбинация определенной общей легкой цепи и таких функционально эквивалентных вариантов охватывается термином «общая легкая цепь».

Термин «естественная шарнирная область» относится к немодифицированной гибкой междоменной области в центральной части тяжелых цепей классов иммуноглобулинов, которая связывает эти 2 цепи дисульфидными связями.

Шарнирная область представляет собой гибкий аминокислотный участок в центральной части тяжелых цепей классов иммуноглобулинов (т. е. тот участок, который соединяет Fab с Fc), который соединяет эти две тяжелые цепи дисульфидными связями. Он насыщен цистеиновыми и пролиновыми аминокислотами и существенно отличается от любой другой области иммуноглобулина.

«Домен Fab» означает связывающий домен, содержащий переменную область, как правило, связывающий домен, содержащий соединенные переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи. Домен Fab может содержать домены константной области, включая домен CH1 и VH, соединенный с доменом константной области легкой цепи (CL) и доменом VL. Такое соединение может происходить, например, в виде ковалентного связывания посредством дисульфидного мостика в доменах CH1 и CL.

«Модифицированный домен Fab» означает связывающий домен, содержащий домен CH1 и домен VH, причем домен VH соединен с доменом VL, а домен CL отсутствует. В альтернативном варианте осуществления модифицированный домен Fab представляет собой связывающий домен, содержащий домен CL и VL, причем VL соединен с доменом VH, а домен CH1 отсутствует. Для того чтобы область CH1 или CL могла присутствовать в несоединенной форме, может потребоваться удалить или уменьшить длины областей гидрофобности. Можно использовать области CH1 от животных тех видов, которые естественным образом экспрессируют одноцепочечные антитела, например от животного семейства верблюдовых, такого как лама или верблюд, или от акулы. Другие примеры модифицированного домена Fab включают в себя константную область (CH1 или CL), которая не соединена с ее когнатной областью, и/или присутствует переменная область VH или VL, которая не соединена с ее когнатной областью.

В настоящем документе «интактное» антитело представляет собой антитело, которое содержит антигенсвязывающий сайт, а также домен CL и по меньшей мере константные домены тяжелой цепи, CH1, CH2 и CH3. Константные домены могут представлять собой константные домены с нативной последовательностью (например, константные домены с нативной последовательностью человека) или их варианты с аминокислотными последовательностями.

Термины «рекомбинантная клетка-хозяин» или «клетка-хозяин» относятся к клетке, в которую была введена экзогенная ДНК. Такие термины относятся не только к конкретной клетке-

субъекту, но и к потомству такой клетки. Так как в последующих поколениях могут возникать некоторые модификации вследствие либо мутации, либо воздействий внешней среды, такое потомство фактически может быть не идентично исходной клетке, но оно тем не менее также включено в объем используемого в настоящем документе термина «клетка-хозяин». В одном варианте осуществления клетки-хозяева включают в себя прокариотические и эукариотические клетки. В одном варианте осуществления эукариотические клетки включают в себя простейшие, грибковые, растительные и животные клетки. В другом варианте осуществления клетки-хозяева включают в себя, без ограничений, прокариотическую клеточную линию *E. Coli*; линии клеток млекопитающих CHO, HEK 293, COS, NS0, SP2 и PER.C6; линии клеток насекомых Sf9; и грибковые клетки *Saccharomyces cerevisiae*.

Используемый в настоящем документе термин «иммунная эффекторная клетка» или «эффекторная клетка» относится к клетке в естественном репертуаре клеток в иммунной системе млекопитающего, которая может быть активирована с возможностью влияния на жизнеспособность клетки-мишени. Иммунные эффекторные клетки включают в себя клетки лимфоидной линии, такие как естественные клетки-киллеры (NK-клетки), Т-клетки, включая цитотоксические Т-клетки, или В-клетки, но также в качестве иммунных эффекторных клеток могут рассматриваться клетки миелоидной линии, такие как моноциты или макрофаги, дендритные клетки и нейтрофильные гранулоциты. Предпочтительные эффекторные клетки включают в себя NK-клетку, Т-клетку, В-клетку, моноцит, макрофаг, дендритную клетку или нейтрофильный гранулоцит.

Термин «процент (%) идентичности», используемый в настоящем документе в отношении аминокислотных последовательностей, определяется как процентная доля остатков в потенциальной последовательности, идентичных остаткам в выбранной последовательности, после выравнивания последовательностей для оптимального сравнения. Процент идентичности последовательностей для сравнения нуклеотидных последовательностей определяют с помощью приложения AlignX программного обеспечения Vector NTI Program Advance 10.5.2, используя настройки по умолчанию, в которых задействован модифицированный алгоритм ClustalW (Thompson, J.D., Higgins, D.G., и Gibson T.J. (1994) *Nuc. Acids Res.* 22: 4673–4680), матрица вкладов swgapdnarnt, штраф за внесение гэпа равен 15, и штраф за удлинение гэпа равен 6,66. Аминокислотные последовательности выравнивают с помощью приложения AlignX программного обеспечения Vector NTI Program Advance 11.5.2, используя настройки по умолчанию, в которых задействованы модифицированный алгоритм ClustalW (Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson T.J., 1994), матрица вкладов blosum62mt2, штраф за внесение гэпа равен 10, и штраф за удлинение гэпа равен 0,1.

В настоящем документе термин «соединенный» или «связанный» относится к доменам, которые соединены друг с другом посредством пептидных связей в первичной аминокислотной последовательности. Например, тяжелая цепь участка вариабельной области, содержащего VH-CH1-CH2-CH3, может быть связана с тяжелой цепью дополнительного связывающего домена VH-CH1 (или дополнительного связывающего домена с дополнительным связывающим доменом) посредством линкера (соединяющего тяжелую цепь дополнительного связывающего домена в

области CH1 с областью VH участка вариабельной области), которые вместе составляют одну полипептидную цепь. Аналогичным образом домен CH1 может быть соединен с вариабельной областью тяжелой цепи, а домен CL может быть соединен с вариабельной областью легкой цепи. Термин «линкер» означает аминокислотный остаток или полипептид, содержащий два или более

5 аминокислотных остатков, соединенных пептидными связями, которые используют для связывания двух полипептидов.

Термин «соединение» относится к таким взаимодействиям между полипептидами, составляющими поливалентный мультимер настоящего изобретения, что они могут мультимеризоваться. Например, дополнительный связывающий домен может содержать область

10 (VH-CH1) тяжелой цепи, соединенную с областью (VL-CL) легкой цепи, причем CH1 и CL соединяются с образованием указанного связывающего домена. Аналогичным образом два полипептида тяжелой цепи, каждый из которых содержит вариабельную область, домен CH1, CH2 и/или CH3, могут быть соединены между соответствующим доменом CH1 и CH2 каждого полипептида посредством образования двух или более дисульфидных связей, которые

15 присутствуют в IgG1 (или большего числа дисульфидных связей, как, например, в IgG3). Два полипептида тяжелой цепи могут быть дополнительно соединены на доменах CH3. Как описано в настоящем документе, соединение доменов антител (например, тяжелой и легкой цепей) может дополнительно происходить из-за нековалентных взаимодействий, а также посредством дисульфидных связей, и может быть сконструировано с помощью методик, описанных в настоящем

20 документе, и способов, известных в данной области техники.

В настоящем описании и в приложенных пунктах формулы изобретения слова «содержать», «включать в себя» и «имеющий», а также их вариации, такие как «содержит», «содержащий», «включает в себя» и «включающий в себя», следует интерпретировать как включающие. То есть эти слова предназначены для того, чтобы отразить возможное включение других элементов или целых

25 чисел, не перечисленных специально, в тех случаях, когда это позволяет контекст.

Существительные в единственном числе используют в настоящем документе для обозначения одного или более (т. е. одного или по меньшей мере одного) грамматических объектов. Например, «элемент» может означать один элемент или более одного элемента.

30 Различные форматы поливалентного мультимера

В изобретении предложен усеченный поливалентный мультимер, который способен связываться со своей мишенью или мишенями посредством своих двух или более связывающих доменов. Поливалентный мультимер настоящего изобретения может содержать две или более

35 вариабельных областей или их участков, способных связываться с антигеном. Следует отметить, что в мультимере отсутствует вся Fc-область или ее участок, предпочтительно вся Fc-область. Мультимер изобретения, описанный в настоящем документе, содержит две области тяжелой цепи, соединенные на своих соответствующих С-концах шарниром, предпочтительно естественным шарниром, и более предпочтительно содержит две или более дисульфидные связи.

В некоторых вариантах осуществления мультимер содержит один или более дополнительных связывающих доменов. В одном варианте осуществления мультимер содержит домен Fab, содержащий область VH-CH1, соединенную с областью VL-CL.

Таким образом, указанный поливалентный мультимер может содержать три области VH и три области VL. Любая из областей VH или VL может представлять собой общую переменную область (VHc или VLc), соединенную с перестроенной переменной областью когнатной цепи, или область, в которой специфичность связывания с эпитопом или антигеном обеспечивается необщей цепью. Например, три области VL могут представлять собой общую цепь (VLc), и каждая область VH (VH1–VH3) может содержать перестроенную переменную область, причем указанные области VH1, VH2 и VH3 могут связывать один и тот же эпитоп или три разных эпитопа. Как показано на Фиг. 1a, VH1 используют для обозначения короткого плеча, VH2 и VH3 используют для обозначения длинного плеча, причем VH2 представляет собой внутреннее плечо, которое соединено с VH1 на их соответствующем С-конце, а VH3 используют для обозначения дистального плеча.

При этом поливалентный мультимер содержит общую легкую цепь (VLc) и три переменных области тяжелой цепи (VH1–VH3), причем дополнительный домен Fab, состоящий из области VH3-CH1, соединенной с областью VLc-CL, может быть соединен с переменной областью посредством линкера, расположенного между областью VH2 или VLc и CH1 дополнительного домена Fab или CL дополнительного домена Fab.

В другом варианте осуществления индивидуальные полипептиды, из которых состоит поливалентный мультимер, могут включать в себя тяжелые и легкие цепи в пределах одного и того же белка. Поливалентный мультимер изобретения может содержать модифицированный домен Fab. Модифицированный домен Fab может содержать модифицированную область CH1, благодаря чему ему не нужно соединяться с CL. Например, CH1 может представлять собой CH1 верблюдовых, или быть сформирована на основе CH1 верблюдовых, или быть модифицирована для удаления гидрофобных остатков с помощью способов, известных в данной области техники. Каждая область VH или VL может представлять собой общую или перестроенную переменную область.

Поливалентный мультимер настоящего изобретения может содержать модифицированный домен Fab, которому не нужно соединяться с CH1. Например, CL может быть модифицирован для удаления гидрофобных областей. Каждая область VH или VL модифицированного домена Fab может представлять собой общую или перестроенную переменную область. Дополнительный модифицированный домен Fab может быть соединен с участком переменной области посредством линкера, расположенного между областью VL участка переменной области и областью CL модифицированного домена Fab. Области VH и VL модифицированного домена Fab могут быть соединены посредством цистеинового мостика. Поливалентный мультимер изобретения может содержать модифицированный домен Fab, содержащий модифицированную область CL, которому не нужно соединяться с CH1.

Создание поливалентных мультимеров

В одном варианте осуществления поливалентные мультимеры могут быть получены путем ферментативного расщепления интактных поливалентных антител или расщепления указанных поливалентных антител в специфических областях, которое оставляет естественный шарнир или соединение полипептидов указанного поливалентного мультимера интактным. Интактные антитела могут представлять собой полноразмерный иммуноглобулин, например полноразмерный IgG, IgA, IgE, IgD или IgM, но предпочтительно IgG и более предпочтительно IgG1.

Тяжелые цепи поливалентных мультимеров могут быть сконструированы для предпочтительного соединения с помощью известных специалистам в данной области техники методик, таких как конструирование модификаций DEKK в областях CH3 интактного антитела. См. WO2013/157954 и De Nardis et al., J. Biol. Chem. (2017) 292(35) 14706–14717, включенные в настоящий документ путем ссылки и демонстрирующие конструирование в области CH3 для инициирования гетеродимеризации тяжелых цепей. Альтернативные подходы к инициированию гетеродимеризации, которые можно применять в изобретении, включают формат выступ-вопядину (WO1998/050431) и применение модификации заряда (Gunasekaran, JBC 2010, vol 285, pp 19637–19646), а также иные известные в данной области техники подходящие методики.

Линкеры для применения в формате поливалентного мультимера

Поливалентный мультимер изобретения может содержать один или более линкеров, соединяющих одну или более переменных областей. Линкер вместе со связывающим доменом, с которым линкер соединен, может по меньшей мере частично определять функциональные возможности поливалентного мультимера.

Линкер может содержать шарнирную последовательность или содержать последовательность на основе шарнирной последовательности. Таким образом, аминокислотная последовательность подходящего линкера может содержать последовательность природного происхождения или содержать последовательность, производную от или основанную на последовательности природного происхождения. Использование таких последовательностей может способствовать разработке поливалентных антител изобретения и/или способствовать обеспечению низкой иммуногенности. Для целей настоящей заявки предпочтительно, чтобы линкер не содержал сайта ферментативного распознавания для какого-либо фермента, используемого для отщепления Fab или F(ab')_n от Fc, так чтобы фермент аналогичным образом расщеплял связь между связывающими доменами. Например, при получении усеченного поливалентного мультимера, содержащего три домена Fab, содержащих общую легкую цепь (VLc) и три переменных области тяжелой цепи (VH1–VH3), предпочтительно, чтобы линкер, соединяющий области VH3-CH1, соединенные с областью VLc-CL, с областью VH1 или VH2, или областью VLc, не включал аминокислотный мотив, распознаваемый ферментом, способным отщеплять Fc от Fab, 2Fab' или F(ab')₃.

Соответственно, подходящий линкер для соединения одного или более дополнительных связывающих доменов с двумя или более переменными областями может быть получен из

шарнирной области IgG или IgA. Линкерная область может быть основана на шарнирной области IgG1, шарнирной области IgG2, шарнирной области IgG3 или шарнирной области IgG4.

Как правило, тип используемой шарнирной области соответствует типу константной области, например CH1, дополнительного домена Fab, к которому присоединен линкер. Таким образом, если линкер основан на последовательности или последовательностях из шарнирной области IgG1, область CH1 дополнительного домена Fab, к которому он присоединен, представляет собой CH1 из IgG1.

Линкер антитела может быть основан на верхней, средней или нижней шарнирной области или подгруппе такой области.

10 Шарнирная область IgG1 имеет последовательность: EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 26).

Верхнюю шарнирную область определяют как: EPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 3).

Среднюю шарнирную область определяют как: CPPCP (SEQ ID NO: 27).

Нижнюю шарнирную область определяют как: APELLGG (SEQ ID NO: 28).

15 Таким образом, в мультимере изобретения линкер может содержать одну или более из этих последовательностей и/или последовательность, производную от или основанную на одной или более из этих последовательностей.

Шарнирная область IgG2 имеет последовательность: ERKCCVECPPCPAPPVAG (SEQ ID NO: 29).

20 Верхнюю шарнирную область определяют как: ERKCCVE (SEQ ID NO: 30).

Среднюю шарнирную область определяют как: CPPCP (SEQ ID NO: 27).

Нижнюю шарнирную область определяют как: APPVAG (SEQ ID NO: 31).

Таким образом, в мультимере изобретения линкер может содержать одну или более из этих последовательностей и/или последовательность, производную от или основанную на одной или более из этих последовательностей.

Шарнирная область IgG3 имеет последовательность:

ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPEFLG G (SEQ ID NO: 32).

Верхнюю шарнирную область определяют как: ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO: 7).

30 Среднюю шарнирную область определяют как:

CPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP (SEQ ID NO: 33).

Нижнюю шарнирную область определяют как: APEFLGG (SEQ ID NO: 34).

Шарнирная область IgG4 имеет последовательность: ESKYGPPCSPAPEFLGG (SEQ ID NO: 35).

35 Верхнюю шарнирную область определяют как: ESKYGPP (SEQ ID NO: 2).

Среднюю шарнирную область определяют как: CPSCP (SEQ ID NO: 36).

Нижнюю шарнирную область определяют как: APEFLGG (SEQ ID NO: 34).

Средняя область с консенсусной последовательностью CXXC соединяет обе тяжелые цепи IgG в отношении IgG дикого типа и является жесткой. Эти дисульфидные мостики не требуются

для настоящего изобретения и, следовательно, если линкер содержит среднюю шарнирную область, предпочтительно один или оба цистеиновых остатка в консенсусной последовательности CXXC замещены, например, сериновым остатком. Таким образом, в одном варианте осуществления CxxC может представлять собой SxxS.

- 5 Линкер, подходящий для применения в поливалентном мультимере изобретения, может представлять собой линкер, полученный из или основанный на последовательности средней шарнирной области, например последовательности, которая содержит последовательность средней шарнирной области, но которая не содержит последовательности нижней и/или верхней шарнирной области. Линкер, подходящий для применения в поливалентном мультимере настоящего изобретения, может представлять собой линкер, полученный из или основанный на последовательности верхней шарнирной области, например последовательности, которая содержит последовательность верхней шарнирной области, но которая не содержит последовательности нижней и/или средней шарнирной области. Линкер, подходящий для применения в поливалентном мультимере настоящего изобретения, может представлять собой линкер, который не содержит последовательности средней шарнирной области, например последовательность, которая содержит комбинацию последовательностей нижней и верхней шарнирных областей.

Таким образом, в мультимере изобретения линкер может содержать одну или более из этих последовательностей и/или последовательность, производную от или основанную на одной или более из этих последовательностей. Линкер может состоять по существу из последовательности средней шарнирной области, или может быть получен из или основан на такой последовательности, или состоять по существу из последовательности верхней и нижней шарнирных областей, или может быть получен из или основан на таких последовательностях.

Линкер, подходящий для применения в мультимере изобретения, может быть определен со ссылкой на последовательность, содержащую аминокислотную последовательность любой линкерной последовательности, описанной в настоящем документе, в которую вводят от 0 до 5 аминокислотных вставок, делеций, замен или добавлений (или их комбинаций). В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, содержащую от 0 до 4, предпочтительно от 0 до 3, предпочтительно от 0 до 2, предпочтительно от 0 до 1 и предпочтительно 0 аминокислотных вставок, делеций, замен или добавлений (или их комбинацию) относительно последовательности линкера, описанного в настоящем документе.

Подходящий линкер может иметь длину от примерно 7 до примерно 29 аминокислот, например от примерно 10 до примерно 20 аминокислот. Тем не менее подходящий линкер может представлять собой короткий линкер, например от примерно 7 до примерно 10 аминокислот, или может представлять собой длинный линкер, например от примерно 20 до примерно 29 аминокислот.

35 Линкер может содержать шарнирную область Ig или содержать последовательность, полученную из или основанную на шарнирной области IgG, соединенной с областью CH1 того же подкласса, что и линкер, и может содержать цистеины для ковалентной связи с общей легкой цепью.

Линкер, подходящий для применения в мультимере изобретения, может быть получен из или основан на шарнирной области IgG1, шарнирной области IgG2, шарнирной области IgG3 или шарнирной области IgG4.

5 Если необходимо использовать последовательность $(G_4S)_n$, ее предпочтительно используют в комбинации с шарнирной областью изотипа, отличного от IgG, или подкласса, отличного от IgG1, и она включает в себя область CH1.

В мультимере изобретения линкер может быть жестким или гибким, может содержать заряженную последовательность, может быть прямым или изогнутым.

Жесткая последовательность для целей изобретения представляет собой
 10 последовательность, прогнозный показатель гибкости Карплуса и Шульца которой составляет примерно 1,015 или менее. Частично гибкая последовательность представляет собой последовательность, прогнозный показатель гибкости Карплуса и Шульца которой составляет от примерно 1,015 до примерно 1,04. Гибкая последовательность для целей настоящего изобретения представляет собой последовательность, имеющую прогнозный показатель гибкости Карплуса и
 15 Шульца по меньшей мере примерно 1,015 (Karplus PA, Schulz GE. Prediction of Chain Flexibility in Proteins — A tool for the Selection of Peptide Antigens. Naturwissenschaften 1985; 72:212-3; <http://tools.immuneepitope.org/bcell/>). Прогнозный показатель гибкости вычисляют по последовательным окнам из 7 остатков вдоль последовательности (шаг 1 остаток) с получением прогнозируемого индекса «гибкости» в каждом окне. Общая гибкость в отношении линкерной
 20 последовательности представлена в виде среднего значения по всей последовательности.

Удаление или замещение цистеиновых остатков в шарнирной области IgG может привести к тому, что линкер на основе этого шарнира станет более гибким, в том числе посредством замены цистеинового остатка серином (Ser). В альтернативном варианте осуществления линкер может представлять собой жесткий линкер из-за наличия образующей спираль последовательности.
 25 Соответственно, среднюю шарнирную область, например консервативный мотив CPPCP (SEQ ID NO: 90), можно заменять формирующей спираль последовательностью, например $(EAAAK)_2$ (SEQ ID NO: 91), что приведет к образованию короткой жесткой спирали в линкере. Следовательно, в мультимере изобретения линкер может содержать образующую спираль последовательность, например содержащую аминокислотную последовательность $(EAAAK)_2$ (SEQ ID NO: 91).
 30 Применение такой последовательности может способствовать повышению жесткости.

Линкер изобретения может содержать аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 4–6, 8–12 или 14–25, или аминокислотную последовательность, которая идентична любой одной из них на по меньшей мере 90%, предпочтительно идентична любой одной из них на по меньшей мере 95%, более предпочтительно
 35 идентична любой одной из них на по меньшей мере 97%, более предпочтительно идентична любой одной из них на по меньшей мере 98%, более предпочтительно идентична любой одной из них на по меньшей мере 99%.

Например, линкер, подходящий для применения в поливалентном мультимере изобретения, может быть определен по отношению к последовательности, содержащей

аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 2–25, в которой выполнены от 0 до 5 аминокислотных вставок, делеций, замен или добавлений (или их комбинаций). В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, имеющую от 0 до 4, предпочтительно от 0 до 3, предпочтительно от 0 до 2, предпочтительно от 0 до 1 и предпочтительно 0 аминокислотных вставок, делеций, замен или добавлений (или их комбинацию) относительно последовательности с SEQ ID NO: 4–6, 8–12 или 14–25.

Линкер, подходящий для применения в поливалентном мультимере изобретения, может быть определен по отношению к последовательности, содержащей аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 2–25, или аминокислотную последовательность, которая идентична любой одной из них на по меньшей мере 85%, например идентична любой одной из них на по меньшей мере 90%, например идентична любой одной из них на по меньшей мере 95%, например идентична любой одной из них на по меньшей мере 98%, например идентична любой одной из них на по меньшей мере 99%.

Таблица 1. Последовательности 24 различных линкеров/конструктов и их названия, используемые в настоящем документе

Название линкера	Последовательность	Размер линкера (aa)
IgG4 UH	ESKYGPP (SEQ ID NO: 2)	7
IgG1 UH	EPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 3)	10
IgG2A G4SS	GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 4)	10
IgG2A MH	ERKSSVESPPSP (SEQ ID NO: 5)	12
IgG2B MH	ERKCSVESPPSP (SEQ ID NO: 6)	12
IgG3 UH	ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO: 7)	12
IgG4 MH	ESKYGPPSPSP (SEQ ID NO: 8)	12
IgG2A UL	ERKSSVEAPPVAG (SEQ ID NO: 9)	13
IgG2B UL	ERKCSVEAPPVAG (SEQ ID NO: 10)	13
IgG4 UL	ESKYGPPAPEFLGG (SEQ ID NO: 11)	14
IgG1 MH	EPKSCDKTHTSPSP (SEQ ID NO: 12)	15
IgG1 G4S	EPKSCDGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 13)	16
IgG2 G4SL	GGGSGGGGSAPPVAG (SEQ ID NO: 14)	16
IgG1 UL	EPKSCDKTHTAPELLGG (SEQ ID NO: 15)	17
IgG2A H	ERKSSVESPPSPAPPVAG (SEQ ID NO: 16)	18
IgG2B H	ERKCSVESPPSPAPPVAG (SEQ ID NO: 17)	18
IgG3 ULH	ELKTPLGDTTHTAPEFLGG (SEQ ID NO: 18)	19
IgG4 H	ESKYGPPSPSPAPEFLGG (SEQ ID NO: 19)	19
IgG1 H	EPKSCDKTHTSPSPAPELLGG (SEQ ID NO: 20)	22
IgG2A R	ERKSSVEEAAAKEAAKAPPVAG (SEQ ID NO: 21)	23
IgG2B R	ERKCSVEEAAAKEAAKAPPVAG (SEQ ID NO: 22)	23
IgG4 R	ESKYGPPEAAAKEAAKAPEFLGG (SEQ ID NO: 23)	24
IgG1 R	EPKSCDKTHTTEAAAKEAAKAPELLGG (SEQ ID NO: 24)	27
IgG3 R	ELKTPLGDTTHTTEAAAKEAAKAPEFLGG (SEQ ID NO: 25)	29

Использование линкеров для соединения областей дополнительного связывающего домена

Линкеры, используемые в настоящем документе, могут связывать одну или более переменных областей с по меньшей мере одним дополнительным связывающим доменом. Кроме того, если по меньшей мере один дополнительный связывающий домен представляет собой домен Fab или состоит из соединения переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи, линкер может соединять тяжелые и легкие цепи с помощью ковалентной связи, как правило, посредством дисульфидного мостика. Таким образом, когда линкер связывает переменные области, он образует часть первичной аминокислотной последовательности полипептида, например VH1-CH1-линкер-VH2-CH1. Напротив, когда линкер соединяет два переменных домена, он соединяет посредством мостика эти домены вместе, включая, например, создание точек контакта, ковалентную связь, например дисульфидную связь между двумя переменными доменами, которые представляют собой отдельные полипептиды.

Дисульфидный мостик может образовываться между цистеиновым остатком в линкере и переменной областью дополнительного (-ых) связывающего (-их) домена (-ов). Такое соединение, опосредованное линкером, можно применять к дополнительному связывающему домену, содержащему домен Fab, содержащий общую легкую цепь и соответствующую перестроенную переменную область тяжелой цепи или содержащий общую тяжелую цепь и соответствующую перестроенную переменную область легкой цепи.

20

В таблице 2 показано, каким образом линкерная последовательность может быть соединена с областями CH1 и VH2.

Таблица 2. Подчеркнутая последовательность представляет собой линкерную последовательность; фланкирующие последовательности представляют собой область CH1 области CH1 дополнительного домена Fab и область VH2

№	Название	Линкерные последовательности (подчеркнуты), содержащие область CH1 и последовательность VH до и после линкерной последовательности соответственно. В контрольной последовательности IgG1 присутствует область CH2 (подчеркнута).
1	IgG1 H	NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTSPSPAPPELLGGEVQLVESGGGVVQPG (SEQ ID NO: 37)
2	IgG1 MH	NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTSPSPPEVQLVESGGGVVQPG (SEQ ID NO: 38)
3	IgG1 UH	NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTTEVQLVESGGGVVQPG (SEQ ID NO: 39)
4	IgG1 G4S	NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPG (SEQ ID NO: 40)
5	IgG1 R	NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTTEAAAKEAAKAPPELLGGEVQLVESGGGVVQPG (SEQ ID NO: 41)

6	IgG1 UL	NVNHKPSNTKVDRK <u>VEPKSCDKTHTAPELLGGEVQLVESGGGVVQPG</u> (SEQ ID NO: 42)
7	IgG2A H	NVDHKPSNTKVDKT <u>VERKSSVESPPSPAPPVAGEVQLVESGGGVVQPG</u> (SEQ ID NO: 43)
8	IgG2A MH	NVDHKPSNTKVDKT <u>VERKSSVESPPSPEVQLVESGGGVVQPG</u> (SEQ ID NO: 44)
9	IgG2A UL	NVDHKPSNTKVDKT <u>VERKSSVEAPPVAGEVQLVESGGGVVQPG</u> (SEQ ID NO: 45)
10	IgG2B H	NVDHKPSNTKVDKT <u>VERKCSVESPPSPAPPVAGEVQLVESGGGVVQPG</u> (SEQ ID NO: 46)
11	IgG2B MH	NVDHKPSNTKVDKT <u>VERKCSVESPPSPEVQLVESGGGVVQPG</u> (SEQ ID NO: 47)
12	IgG2B UL	NVDHKPSNTKVDKT <u>VERKCSVEAPPVAGEVQLVESGGGVVQPG</u> (SEQ ID NO: 48)
13	IgG2A G4SL	NVDHKPSNTKVDKT <u>VGGGSGGGGSAPPVAGEVQLVESGGGVVQPG</u> (SEQ ID NO: 49)
14	IgG2A G4SS	NVDHKPSNTKVDKT <u>VGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPG</u> (SEQ ID NO: 50)
15	IgG2A R	NVDHKPSNTKVDKT <u>VERKSSVEEAAAKEAAKAPPVAGEVQLVESGGGVVQPG</u> (SEQ ID NO: 51)
16	IgG2B R	NVDHKPSNTKVDKT <u>VERKCSVEEAAAKEAAKAPPVAGEVQLVESGGGVVQPG</u> (SEQ ID NO: 52)
17	IgG3 ULH	NVNHKPSNTKVDRK <u>VELKTPLGDTTHTAPEFLGGEVQLVESGGGVVQPG</u> (SEQ ID NO: 53)
18	IgG3 UH	NVNHKPSNTKVDRK <u>VELKTPLGDTTHTEVQLVESGGGVVQPG</u> (SEQ ID NO: 54)
19	IgG3 R	NVNHKPSNTKVDRK <u>VELKTPLGDTTHTEAAAKEAAKAPEFLGGEVQLVESGGGVVQPG</u> (SEQ ID NO: 55)
20	IgG4 H	NVDHKPSNTKVDRK <u>ESKYGPSPSPAPEFLGGEVQLVESGGGVVQPG</u> (SEQ ID NO: 56)
21	IgG4 MH	NVDHKPSNTKVDRK <u>ESKYGPSPSPSPEVQLVESGGGVVQPG</u> (SEQ ID NO: 57)
22	IgG4 UL	NVDHKPSNTKVDRK <u>ESKYGPPEFLGGEVQLVESGGGVVQPG</u> (SEQ ID NO: 58)
23	IgG4 UH	NVDHKPSNTKVDRK <u>ESKYGPPEVQLVESGGGVVQPG</u> (SEQ ID NO: 59)
24	IgG4 R	NVDHKPSNTKVDRK <u>ESKYGPPEAAAKEAAKAPEFLGGEVQLVESGGGVVQPG</u> (SEQ ID NO: 60)
25	Шарнирная область IgG1	NVNHKPSNTKVDRK <u>VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM</u> (SEQ ID NO: 61)

Следует отметить, что последовательность VH2 после линкера (подчеркнутого выше) может изменяться в зависимости от конкретной используемой вариативной области. В других

вариантах осуществления последовательность после линкера может представлять собой переменную область легкой цепи, включая общую легкую цепь.

Поливалентность и мультиспецифичность

5

Если две или более переменные области связывают разные антигены, первый и второй антигены могут быть двумя разными молекулами или фрагментами, которые находятся на одной клетке или на разных типах клеток. Антитела, содержащие два связывающих домена, которые опосредуют цитотоксичность путем привлечения и активации эндогенных иммунных клеток, представляют собой новый класс терапевтических средств на основе антител. Этого можно достичь путем комбинирования в одной молекуле специфичностей связывания с антигенами на клетках-мишенях (т. е. опухолевых клетках) и на эффекторных клетках (т. е. Т-клетках, НК-клетках и макрофагах) (см., например, WO2014/051433). Мультимер изобретения содержит по меньшей мере два связывающих домена. Поливалентный мультимер, содержащий три или более связывающих домена, может нацеливаться на один, два, три или более опухолеассоциированных антигенов, что позволяет осуществлять специфическое нацеливание на вредные клетки, а не на здоровые. Например, один связывающий домен или два связывающих домена поливалентного мультимера могут связывать антиген на аберрантной (опухолевой) клетке, тогда как второй или третий связывающий домен поливалентного мультимера может связывать антиген на иммунной эффекторной клетке, способной вызывать направленное уничтожение опухолевой клетки, экспрессирующей один или более опухолеассоциированных антигенов. В альтернативном варианте осуществления два связывающих домена поливалентного мультимера могут специфически связываться с двумя разными эпитопами на одном и том же антигене или разных антигенах, экспрессируемых на опухолевых клетках, в то время как аффинности этих плеч уменьшены для ослабления связывания с клетками, экспрессирующими только один антиген, или когда задействован только один связывающий домен поливалентного мультимера. В альтернативном варианте осуществления три связывающих домена поливалентного мультимера изобретения могут связываться с тремя разными антигенами или одними и теми же антигенами, но на разных эпитопах иммунных эффекторных клеток.

Аналогичным образом поливалентный мультимер, содержащий три или более связывающих домена, может связываться с функциональной мишенью, такой как лиганд или фермент, и запускать биологический ответ или блокировать функцию мишени, что приводит к ингибирующей или агонистической клеточной активности. По меньшей мере один связывающий домен поливалентного мультимера изобретения присоединен посредством линкера к связывающему домену участка переменной области.

В случаях, когда связывающий домен по меньшей мере одной из переменных областей представляет собой домен Fab, он может иметь, например, такую структуру, как VH-CH1-линкер-VH-CH1, причем линкер соединяет тяжелую цепь одной переменной области с по меньшей мере одним дополнительным связывающим доменом, предпочтительно с доменом Fab.

В альтернативном варианте осуществления он может иметь, например, такую структуру, как VL-CL-линкер-VL-CL, причем линкер соединяет легкую цепь одной переменной области с по меньшей мере одним дополнительным связывающим доменом, предпочтительно доменом Fab.

5 Дополнительный связывающий домен, такой как домен Fab, может быть присоединен к двум переменным областям, к каждой посредством отдельного линкера. Два или более линкеров, соединяющих дополнительные переменные области или дополнительные связывающие домены, могут быть одинаковыми или разными. Линкеры могут дополнительно обеспечивать соединение когнатных цепей связывающего домена.

10 Если мультимер изобретения содержит более одного линкера, эти линкеры могут быть одинаковыми, или разными, или их комбинацией. Примером последней ситуации является случай, когда поливалентный мультимер содержит три линкера, два из которых одинаковы, а третий отличается (от двух других).

15 Кроме того, переменная область, соединенная посредством линкера с другой переменной областью, сама может быть присоединена к переменной области, соединенной посредством линкера, описанного в настоящем документе, причем другие переменные области могут быть увеличены модульным способом путем соединения через линкер с дополнительным связывающим доменом и соединения этой переменной области со второй дополнительной переменной областью через линкер и т. д.

20 Таким образом мультимер изобретения может быть способен связываться с двумя, тремя или более эпитопами.

Мультимер изобретения может быть способен связываться с двумя, тремя или более антигенами.

Мультимер изобретения может содержать две или более переменных областей, таких как два или более доменов Fab, которые способны связываться с разными эпитопами на одном антигене.

25 В одном варианте осуществления мультимер изобретения содержит по меньшей мере три связывающих домена, например три или более домена Fab, из которых по меньшей мере два домена Fab различаются.

30 Другой аспект изобретения предусматривает поливалентный мультимер, содержащий по меньшей мере три домена Fab и поэтому способный связываться с тремя эпитопами, которые, как правило, все отличаются друг от друга.

Мультимер изобретения может также быть мультиспецифическим. Термин «поливалентный» означает, что антитело имеет по меньшей мере два связывающих домена и поэтому имеет по меньшей мере два антигенсвязывающих сайта. Термин «мультиспецифический» означает, что антитело способно связываться с по меньшей мере двумя разными эпитопами, например с двумя разными антигенами или с двумя эпитопами на одном и том же антигене. Термин «триспецифический» означает, что антитело способно связываться с тремя разными эпитопами. Термин «квадроспецифический» означает, что антитело способно связываться с четырьмя разными эпитопами и т. д.

Мультимер настоящего изобретения может связывать эпитопы-мишени, расположенные на одной и той же мишени. Благодаря этому возможно более эффективное противодействие (биологической) функции указанной молекулы-мишени по сравнению с ситуацией, когда мишенью является только один эпитоп. Например, мультимер изобретения может одновременно связываться с 2, 3 или более эпитопами, присутствующими на антигенпрезентирующей клетке, например на рецепторах фактора роста или растворимых молекулах, имеющих критически важное значение для пролиферации опухолевых клеток, и таким образом эффективно блокировать несколько независимых сигнальных путей, приводящих к неконтролируемой пролиферации.

Любая комбинация по меньшей мере двух мультимеров изобретения может одновременно связываться с 2, 3, 4 или более эпитопами, присутствующими на молекуле-мишени, такой как рецептор фактора роста или растворимая молекула. В комбинации по меньшей мере двух мультимеров изобретения два мультимера могут иметь общим по меньшей мере один общий связывающий домен.

Фрагмент-мишень может представлять собой растворимую молекулу, мембраносвязанный фрагмент или фрагмент, присутствующий на клеточной поверхности и поглощаемый клеткой при связывании.

Эпитопы-мишени могут быть расположены на разных фрагментах, например на двух (т. е. два или более эпитопов-мишеней на первом фрагменте и один или более эпитопов-мишеней на втором фрагменте) или трех различных фрагментах (т. е. по меньшей мере один эпитоп-мишень на каждом из трех фрагментов). В этом случае каждый из различных фрагментов-мишеней может представлять собой либо растворимый фрагмент, либо мембраносвязанный фрагмент, либо фрагмент, присутствующий на клеточной поверхности и поглощаемый клеткой при связывании. В одном варианте осуществления различные фрагменты-мишени представляют собой растворимые фрагменты. В альтернативном варианте осуществления по меньшей мере один фрагмент-мишень представляет собой растворимый фрагмент, тогда как по меньшей мере один фрагмент-мишень представляет собой мембраносвязанный фрагмент. В еще одном альтернативном варианте осуществления все фрагменты-мишени являются мембраносвязанными фрагментами. В одном варианте осуществления различные фрагменты-мишени экспрессируются на одной и той же клетке, тогда как в других вариантах осуществления различные фрагменты-мишени экспрессируются на разных клетках.

В качестве не имеющего ограничительного характера примера любой мультимер изобретения или любая комбинация мультимера изобретения и дополнительного антитела могут подходить для одновременной блокировки множества мембраносвязанных рецепторов, нейтрализации множества растворимых молекул, таких как цитокины или факторы роста для опухолевых клеток, или для нейтрализации различных вирусных серотипов или вирусных штаммов.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один эпитоп-мишень может быть расположен на опухолевой клетке. В альтернативном или дополнительном варианте осуществления по меньшей мере эпитоп-мишень может быть расположен на поверхности эффекторной клетки. Такой вариант приемлем, например, для привлечения Т-клеток или NK-клеток для уничтожения

опухолевых клеток. Например, мультимер изобретения может быть способен к привлечению иммунных эффекторных клеток, предпочтительно человеческих иммунных эффекторных клеток, путем специфического связывания с молекулой-мишенью, расположенной на иммунных эффекторных клетках. В дополнительном варианте осуществления указанная иммунная

5 эффекторная клетка активируется при связывании мультимера изобретения с молекулой-мишенью. Привлечение эффекторных механизмов может включать, например, переориентирование иммуномодулированной цитотоксичности путем введения Ig-подобной молекулы, полученной способом в соответствии с изобретением, которая способна связываться с цитотоксичной молекулой-триггером, такой как Т-клеточный рецептор или Fc-гамма рецептор и таким образом

10 активировать нижележащие иммунные эффекторные пути или иммунные эффекторные клетки.

Общая переменная область

Поливалентный мультимер изобретения может использовать общую цепь в каждом из двух

15 или более связывающих доменов (переменных областей). Согласно описанию, в одном варианте осуществления поливалентный мультимер имеет первую комбинацию переменной области тяжелой цепи / переменной области легкой цепи (VH/VL), которая связывается с одним антигеном, и вторую комбинацию VH/VL, которая связывается со вторым антигеном. Каждый дополнительный связывающий домен может также содержать дополнительную комбинацию

20 VH/VL, которая связывается с дополнительным эпитопом на антигене.

В одном варианте осуществления мультимер содержит две тяжелые цепи (одна или обе из них содержат один или более дополнительных доменов CH1 и VH) и легкую цепь, которая соединяется с каждым доменом CH1 и VH. В одном варианте осуществления две тяжелые цепи имеют совместимые домены гетеродимеризации, а легкая цепь представляет собой общую легкую

25 цепь. В другом варианте осуществления мультимер содержит две легкие цепи (одна или обе из них содержат один или более дополнительных доменов CL и VL) и переменную область тяжелой цепи, которая соединяется с каждым доменом CL и VL, и переменная область тяжелой цепи представляет собой переменную область общей тяжелой цепи.

В случаях, когда поливалентный мультимер содержит общую легкую цепь, причем

30 указанная легкая цепь экспрессируется в клетках-хозяевах, включающих ДНК, кодирующую две или более переменных областей тяжелой цепи, указанная легкая цепь способна соединяться с каждой из имеющихся тяжелых цепей (или областей CH1-VH1) и тем самым образовывать по меньшей мере три функциональных антигенсвязывающих домена.

Функциональный антигенсвязывающий домен (переменная область) может

35 специфически связываться с эпитопом на антигене. В одном варианте осуществления общая легкая цепь может соединяться со всеми полученными тяжелыми цепями (или областями CH1-VH1), так что ошибочное соединение несогласующихся тяжелых и легких цепей исключается или происходит в значительно меньшей степени, чем формирование поливалентного мультимера.

В одном варианте осуществления поливалентный мультимер изобретения имеет общую легкую цепь (вариабельную область), которую можно комбинировать с рядом вариабельных областей тяжелой цепи с образованием мультимера с функциональными антигенсвязывающими доменами (WO2004/009618, WO2009/157771).

- 5 Общая легкая цепь (вариабельная область) для применения в поливалентном мультимере настоящего изобретения предпочтительно представляет собой легкую цепь человека. В одном варианте осуществления общая легкая цепь (вариабельная область) имеет последовательность зародышевой линии. В одном варианте осуществления последовательность зародышевой линии представляет собой вариабельную область легкой цепи, которая часто используется в человеческом
- 10 наборе и имеет хорошие термодинамическую стабильность, выход и растворимость. Предпочтительная легкая цепь зародышевой линии представляет собой IgV_κ1-39* 01/IGJ_κ1* 01 человека и константную область человека (SEQ ID NO: 1). Нуклеиновая кислота, кодирующая вариабельную область общей легкой цепи, предпочтительно представляет собой перестроенную легкую цепь каппа зародышевой линии IgV_κ1-39* 01/IGJ_κ1* 01 человека (SEQ ID NO: 62). Общая
- 15 легкая цепь предпочтительно содержит аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи с SEQ ID NO: 63 и аминокислотную последовательность константной области легкой цепи человека с SEQ ID NO: 64 с 0–5 аминокислотными вставками, делециями, заменами, добавлениями или их комбинацией. Общая легкая цепь может дополнительно содержать константную область легкой цепи, предпочтительно константную область легкой цепи каппа.
- 20 Нуклеиновая кислота, кодирующая общую легкую цепь (SEQ ID NO:1), может быть кодон-оптимизированной для клеточной системы, используемой для экспрессии белка общей легкой цепи. Кодирующая нуклеиновая кислота может иметь отклонения от нуклеотидной последовательности зародышевой линии.

- Общая легкая цепь (вариабельная область) для применения в поливалентных антителах
- 25 изобретения может представлять собой легкую цепь лямбда, поэтому она также предусмотрена в контексте изобретения, однако предпочтительной является легкая цепь каппа. Общая легкая цепь изобретения может содержать константную область легкой цепи каппа или лямбда. В одном варианте осуществления используют константную область легкой цепи каппа, причем предпочтительно указанная общая легкая цепь представляет собой легкую цепь зародышевой
- 30 линии, предпочтительно перестроенную легкую цепь каппа зародышевой линии, содержащую сегмент IgV_κ1-39 гена, например перестроенную легкую цепь каппа зародышевой линии IgV_κ1-39*01/IGJ_κ1*01. Специалистам в данной области техники будет понятно, что термин «общая» также относится к функциональным эквивалентам легкой цепи, аминокислотные последовательности которых не являются идентичными. Существует множество вариантов
- 35 указанной легкой цепи, в которых присутствуют мутации (делеции, замены, добавления), которые не оказывают существенного влияния на формирование функциональных связывающих областей.

IgV_κ1-39 представляет собой сокращение от гена вариабельной цепи каппа иммуноглобулина 1-39. Ген также известен как вариабельный участок каппа иммуноглобулина 1-39; IGKV139; IGKV1-39. Внешними идентификаторами для гена являются

HGNC: 5740; Entrez Gene: 28930; Ensembl: ENSG00000242371. Предпочтительная аминокислотная последовательность для IgVκ1-39 представлена в SEQ ID NO: 65. Здесь указана последовательность V-области. V-область может быть скомбинирована с одной из пяти J-областей. Варибельная область общей легкой цепи предпочтительно связана с константной областью легкой цепи каппа. В предпочтительном варианте осуществления варибельная область легкой цепи, используемая в поливалентном мультимере изобретения, содержит легкую цепь каппа IgVκ1-39*01/IGJκ1*01 или IgVκ1-39*01/IGJκ5*01. В предпочтительном варианте осуществления общая легкая цепь в поливалентном мультимере представляет собой IgVκ1-39*01/IGJκ1*01.

Клетка, продуцирующая общую легкую цепь, может продуцировать, например, перестроенную легкую цепь каппа зародышевой линии IgVκ1-39*01/IGJκ1*01 и легкую цепь, содержащую варибельную область упомянутой легкой цепи, слитую с константной областью лямбда. Если в настоящем документе упоминается последовательность зародышевой линии, в одном варианте осуществления варибельная область представляет собой последовательность зародышевой линии.

Предпочтительной общей легкой цепью для применения в поливалентном мультимере изобретения является цепь, содержащая последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1.

Общая цепь для применения в поливалентных антителах изобретения может также представлять собой тяжелую цепь, поэтому она также предусмотрена в контексте изобретения. В данной области техники используют общие тяжелые цепи для получения биспецифических антител, и их можно использовать в создании поливалентного мультимера, содержащего три или более связывающих доменов, причем два или более из указанных связывающих доменов содержат общую тяжелую цепь, известную в данной области техники. Например, использование библиотек антител, в которых варибельный домен тяжелой цепи одинаков для всех членов библиотеки, и, таким образом, разнообразие основано на варибельном домене легкой цепи. Такие библиотеки описаны, например, в PCT/US2010/035619 и PCT/US2010/057780, каждая из которых полностью включена в настоящий документ путем ссылки. Эти и другие методики получения связывающих доменов, имеющих общие тяжелые цепи, могут быть разработаны специалистом в данной области техники и могут быть использованы в настоящем изобретении для получения поливалентных антител, имеющих новые форматы, описанные в настоящем документе.

Получение усеченного поливалентного мультимера

В одном варианте осуществления для получения поливалентного мультимера клетку-хозяина можно котрансфицировать нуклеиновой кислотой, кодирующей две или более варибельных областей тяжелой цепи и варибельную область общей легкой цепи, причем две из указанных варибельных областей тяжелой цепи содержат константную область, включающую домены CH1, CH2 и/или CH3, которые способны к гетеродимеризации, в том числе посредством соединения на шарнире между доменами CH1 и CH2, и при этом каждая из указанных двух тяжелых цепей содержит ниже указанного шарнира аминокислотную последовательность, распознаваемую протеолитическим ферментом, способным расщеплять область CH2 и/или CH3. В альтернативном варианте осуществления поливалентный мультимер изобретения может быть получен путем

котрансфекции отдельных клеток одним или более генетическими конструктами, которые вместе кодируют две или более переменных областей легкой цепи и общую тяжелую цепь, причем две общие тяжелые цепи содержат константную область, включающую домены СН1, СН2 и/или СН3, которые способны к гетеродимеризации, в том числе посредством соединения на шарнире между доменами СН1 и СН2, и при этом каждая из указанных двух тяжелых цепей содержит ниже указанного шарнира аминокислотную последовательность, распознаваемую протеолитическим ферментом, способным расщеплять область СН2 и/или СН3.

Поливалентный мультимер изобретения также можно получать путем иммунизации трансгенного животного, несущего общую переменную цепь, двумя или более интересующими антигенами. Из трансгенного животного получают панель антител, содержащих общую переменную цепь и перестроенную цепь антитела, которая специфически связывается с интересующим антигеном. Затем нуклеиновую кислоту, кодирующую общую цепь и переменную связывающую цепь, интегрируют в клетки-хозяева, которые продуцируют интактное поливалентное антитело. Затем формируют поливалентный мультимер. Указанный поливалентный мультимер может содержать общую легкую цепь и две или более переменных связывающих цепей, причем две из указанных переменных связывающих цепей предпочтительно представляют собой тяжелые цепи, содержащие СН1, СН2 и/или СН3, при этом указанные тяжелые цепи соединены посредством шарнира, обычно состоящего из двух или более дисульфидных мостиков между доменом СН1 и СН2. Затем поливалентный мультимер расщепляют ферментом, который удаляет область СН2 и/или СН3 из указанных тяжелых цепей, оставляя на С-концах тяжелых цепей шарнир, соединяющий тяжелые цепи поливалентного мультимера, как правило, посредством двух или более дисульфидных связей.

Опубликовано несколько способов, способствующих продукции антител, представляющих собой гетеродимеры. В настоящем изобретении клетка способствует продукции гетеродимеров по сравнению с продукцией соответствующих гомодимеров. Как правило, это достигается нуклеиновыми кислотами, которые кодируют константные области тяжелых цепей, предпочтительно область СН3 тяжелых цепей, таким образом, чтобы они способствовали гетеродимеризации (т. е. димеризации, при которой одна тяжелая цепь объединяется со второй тяжелой цепью), а не гомодимеризации. В предпочтительном варианте осуществления мультимер изобретения содержит две разные тяжелые цепи иммуноглобулина с совместимыми доменами гетеродимеризации.

Совместимые домены гетеродимеризации предпочтительно представляют собой совместимые домены гетеродимеризации тяжелой цепи СН3 иммуноглобулина. При использовании СН3-доменов дикого типа посредством совместная экспрессия двух разных тяжелых цепей (А и В) и общей легкой цепи будет давать в результате три разных типа антител: АА, АВ и ВВ. АА и ВВ представляют собой обозначения для двух гомодимерных антител, а АВ — обозначение для гетеродимерного антитела. Для увеличения процентного содержания необходимого гетеродимерного продукта (АВ) можно применять конструирование СН3-доменов, или, иными словами, можно использовать тяжелые цепи с совместимыми доменами гетеродимеризации. В

данной области техники описаны различные способы, которыми можно обеспечивать такую гетеродимеризацию тяжелых цепей.

В настоящем документе термин «совместимые домены гетеродимеризации» относится к белковым доменам, которые сконструированы таким образом, что сконструированный домен А' 5 будет предпочтительно образовывать гетеродимеры со сконструированным доменом В', а гомодимеризация между А'–А' и В'–В' наоборот будет снижена.

В заявке на патент США № 13/866,747 (в настоящее время выпущен под номером US 9,248,181), заявке на патент США № 14/081,848 (в настоящее время выпущен под номером US 9,358,286), WO2013/157953 и WO2013/157954 описаны способы и средства для получения 10 поливалентных антител с использованием совместимых доменов гетеродимеризации. Эти средства и способы можно также преимущественно использовать в рамках настоящего изобретения. В частности, мультимер изобретения предпочтительно содержит в константной области первой и второй тяжелых цепей остатки для получения по существу только биспецифических полноразмерных молекул IgG. Предпочтительными остатками являются аминокислоты L351K и 15 T366K (нумерация ЕС) в первом домене CH3 (причем первая буква соответствует остатку CH3-домена дикого типа, а вторая буква соответствует остатку, кодируемому доменом CH3, который способен предпочтительно участвовать в гетеродимерном соединении) или в соответствующих им положениях (тяжелая цепь варианта KK) и аминокислоты L351D и L368E во втором домене или в соответствующих им положениях (тяжелая цепь варианта DE), или наоборот. Ранее в наших 20 публикациях US 9,248,181 и US 9,358,286, а также в заявке WO2013/157954 РСТ было показано, что вариант DE и вариант KK предпочтительно формируют пару с образованием гетеродимеров (так называемых биспецифических молекул DEKK). Гомодимеризация DE-варианта тяжелых цепей (гомодимеры DEDE) или KK-варианта тяжелых цепей (гомодимеры KKKK) не происходит или происходит только в пренебрежимо малых количествах из-за отталкивания заряженных остатков 25 друг от друга на интерфейсе CH3-CH3 между одинаковыми тяжелыми цепями.

Одну клетку-хозяина настоящего изобретения, способную экспрессировать белки, которые мультимеризируются с образованием поливалентного мультимера, трансформируют нуклеиновой кислотой, которая кодирует три белка. В порядке от N-конца до C-конца закодированные белки 30 включают в себя первый белок, содержащий VH3-CH1---VH2-CH1-CH2-CH3, причем линкер соединяет в направлении от N-конца к C-концу CH1 с VH2 (обозначено как «---») на первом белке, второй закодированный белок, содержащий VLc-CL, третий закодированный белок, содержащий VH1-CH1-CH2-CH3, причем домены CH1 первого и третьего закодированных белков соединяются с доменом CL второго закодированного белка, а кодируемая CH3 область первого и третьего белков 35 кодирует аминокислоты L351K и T366K (нумерация ЕС) в домене CH3 первого белка или в соответствующих им положениях и аминокислоты L351D и L368E в третьем белке или соответствующих им положениях соответственно, или наоборот. В альтернативном варианте осуществления указанные первый и третий белки содержат другие совместимые домены гетеродимеризации, способствующие эффективному соединению доменов CH3 каждого из этих белков.

Для получения поливалентного мультимера изобретения нуклеиновые кислоты, кодирующие указанные белки, могут находиться на одном или более векторах. Указанные нуклеиновые кислоты, кодирующие указанные белки, могут быть дополнительно стабильно интегрированы в геном клетки-хозяина, предпочтительно в хромосомные области, известные 5 высокой экспрессией и отсутствием или уменьшением сайленсинга генов.

Клетка-хозяин настоящего изобретения может быть способна продуцировать поливалентный мультимер с чистотой по меньшей мере примерно 50%, по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 98% поливалентного мультимера 10 изобретения на основе общего экспрессированного иммуноглобулина.

Клетка-хозяин изобретения может быть способна продуцировать поливалентный мультимер, причем по меньшей мере примерно 50%, по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 98% полученного поливалентного мультимера 15 содержит вариабельную перестроенную область, соединенную с когнатной общей цепью во всех сайтах связывания.

Клетка-хозяин изобретения может быть способна продуцировать поливалентный мультимер, причем по меньшей мере примерно 50%, по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере 20 мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 98% экспрессированной общей цепи соединено с поливалентным мультимером и не является свободным, несвязанным белком.

При воздействии на поливалентный мультимер протеолитического фермента, который расщепляет указанный мультимер под шарниром двух димеризованных тяжелых цепей, можно получить образующийся усеченный поливалентный мультимер изобретения, причем по меньшей 25 мере примерно 50%, предпочтительно 60%, более предпочтительно более 70% и до более 90% концентрации исходного белка преобразуется в усеченный поливалентный мультимер изобретения.

Не относящиеся к человеку животные

С помощью способов и композиций, описанных в настоящем документе, можно получать 30 подходящие поливалентные связывающие белки, имеющие связывающие домены, полученные подходящими способами, происходящие от них или основанные на них. Подходящие способы могут включать в себя способы фагового дисплея (включая модификацию последовательностей зародышевой линии, сгенерированных в системах фагового дисплея) и другие способы *in vitro*, известные в данной области техники. Особенно подходящим способом является получение 35 генетически модифицированного не относящегося к человеку животного, которое в результате естественных процессов соматической рекомбинации и созревания аффинности начинает продуцировать подходящий вариабельный домен тяжелой цепи, который может связываться и экспрессироваться с общей легкой цепью.

В одном варианте осуществления переменные домены, используемые в поливалентном мультимере настоящего изобретения, получены из, являются производными от или основаны на переменных областях тяжелой и легкой цепей не относящегося к человеку трансгенного животного, которое содержит в своей зародышевой линии неперестроенный локус переменной области тяжелой цепи и экспрессирует один перестроенный человеческий переменный домен легкой цепи, например общую легкую цепь млекопитающего, например грызуна. Такое не относящееся к человеку трансгенное животное под воздействием антигена будет экспрессировать множество различных соматически перестроенных переменных областей тяжелой цепи, соединенных с общей легкой цепью, которые затем можно использовать для разработки нуклеотидных последовательностей, кодирующих переменные области тяжелой цепи, полученные из, являющиеся производными от или основанные на переменных областях указанного трансгенного животного, которые можно эффективно трансформировать в клетки-хозяева для получения поливалентных антител.

В частности, в качестве источника потенциальных доменов VH для поливалентного мультимера изобретения можно использовать последовательности переменной области человека из подходящих В-клеток иммунизированного животного с общей легкой цепью, которое модифицировано методами генной инженерии для экспрессии переменных доменов легкой цепи человека, производных от сегмента (-ов) гена VL человека. В-клетки указанных животных, которые иммунизированы одним или более интересующими антигенами, которые в различных вариантах осуществления представляют собой антигены, с которыми будет связываться поливалентный мультимер. Клетки, ткани или сыворотку, материалы из селезенки или лимфатической ткани указанных животных подвергают скринингу для получения переменных доменов тяжелой цепи (или В-клеток, которые их экспрессируют), которые демонстрируют необходимые характеристики по отношению к интересующим антигенам, например высокую аффинность, низкую аффинность, способность к блокированию, активацию, интернализацию или другие характеристики. Поскольку практически все переменные домены тяжелой цепи, формируемые в ответ на антигенную стимуляцию у указанного трансгенного животного, получены в сочетании с экспрессированием легкой цепи иммуноглобулина человека, являющейся производной предпочтительно не более одного или не более двух сегментов гена VL, переменные области тяжелой цепи способны экспрессироваться и связываться с доменами общей легкой цепи, экспрессируемыми у трансгенного животного.

В одном аспекте предложен эпитоп-связывающий белок, описанный в настоящем документе, в котором последовательности VL и VH человека кодируют нуклеиновой кислотой, основанной на нуклеиновой кислоте, полученной из В-клетки трансгенной мыши, описанной в настоящем документе, и/или трансгенного животного, описанного в WO2009/157771, включенном в настоящий документ путем ссылки, которое было иммунизировано антигеном, содержащим интересующий эпитоп.

Нуклеотидные последовательности, полипептиды, векторы и клетки

В изобретении дополнительно предложены нуклеотидные последовательности, кодирующие полипептиды или линкеры, которые можно использовать для сборки поливалентного мультимера изобретения; векторы, содержащие такие нуклеотидные последовательности; клетка, которая способна продуцировать поливалентный мультимер изобретения; и способ получения
5 такого поливалентного мультимера с использованием такой клетки.

Поливалентные антитела в соответствии с изобретением, как правило, продуцируются клетками, которые экспрессируют нуклеотидные последовательности, кодирующие полипептиды, которые собираются вместе с образованием мультимера изобретения.

Соответственно, в изобретении предложен линкер, содержащий аминокислотную
10 последовательность, представленную в одной из SEQ ID NO: 2–25, или полипептид с идентичностью последовательности с любой из них по меньшей мере примерно 85% с идентичностью последовательности с любой из них по меньшей мере примерно 85%, например с идентичностью последовательности с любой из них по меньшей мере примерно 90%, например с идентичностью последовательности с любой из них по меньшей мере примерно 95%, например с
15 идентичностью последовательности с любой из них по меньшей мере примерно 98%, например с идентичностью последовательности с любой из них по меньшей мере примерно 99%.

В изобретении дополнительно предложен полипептид, содержащий VH2-CH1-линкер на основе шарнира-VH3-CH1.

В определенных вариантах осуществления VH3 и VH2 связывают один и тот же эпитоп. В
20 определенных вариантах осуществления VH3 и VH2 связывают один и тот же антиген, но разные эпитопы. И в определенных вариантах осуществления VH3 и VH2 связывают отдельные эпитопы и антигены.

В изобретении также предложена нуклеотидная последовательность, кодирующая такой линкер или полипептид, и вектор, содержащий такую нуклеотидную последовательность.

25 Нуклеотидные последовательности, используемые для получения описанных полипептидов, могут быть размещены в любом подходящем экспрессионном векторе и в соответствующих обстоятельствах двух или более векторах в одной клетке-хозяине.

По существу нуклеотидные последовательности, кодирующие переменные домены, клонируют с соответствующими линкерами и/или константными областями, и последовательности
30 размещают в функциональной связи с промотором в подходящем экспрессионном конструкте в подходящей клеточной линии для экспрессии.

Экспрессия поливалентного мультимера

Экспрессия антител в рекомбинантных клетках-хозяевах описана в данной области
35 техники. Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие легкие и тяжелые цепи мультимера изобретения, могут присутствовать в виде экстрахромосомных копий и/или быть стабильно интегрированы в хромосому клетки-хозяина. Последний вариант является предпочтительным, и в этом случае мишенью могут быть локусы, в которых отсутствует или понижен сайленсинг генов.

В отношении обеспечения экспрессии нуклеотидных последовательностей, кодирующих полипептиды, которые собираются в мультимер изобретения, специалистам в данной области техники хорошо известно, что последовательности, способные инициировать такую экспрессию, могут быть функционально связаны с нуклеотидными последовательностями, кодирующими полипептиды. Термин «функционально связанный» означает, что нуклеотидные последовательности, кодирующие полипептиды или их предшественники, связаны с последовательностями, способными инициировать экспрессию так, что эти последовательности могут инициировать экспрессию полипептидов или их предшественников. В данной области техники доступны используемые экспрессионные векторы, например серия векторов pcDNA компании Invitrogen. Если последовательность, кодирующая интересующий полипептид, правильно вставлена со ссылкой на последовательности, регулирующие транскрипцию и трансляцию кодируемого полипептида, полученную экспрессионную кассету используют для получения интересующего полипептида, называемого экспрессионным. Последовательности, инициирующие экспрессию, могут включать в себя промоторы, энхансеры и т. п., а также их комбинации. Они должны быть способны к функционированию в клетке-хозяине и, таким образом, инициировать экспрессию функционально связанных с ними нуклеотидных последовательностей. Промоторы могут быть конститутивными или регулируемыми и могут быть получены из различных источников, включая вирусы, прокариотические или эукариотические источники, или могут быть искусственно сконструированы.

Экспрессия нуклеотидных последовательностей изобретения может происходить от природного промотора или его производного или от полностью гетерологичного промотора. Некоторые хорошо известные и часто используемые промоторы для экспрессии в эукариотических клетках содержат промоторы, полученные из вирусов, таких как аденовирус, например промотор E1A, промоторы, полученные из цитомегаловируса (CMV), например немедленно-ранний промотор (IE) CMV, промоторы, полученные из вируса Simian Virus 40 (SV40) и т. п. Подходящие промоторы могут также быть получены из эукариотических клеток, например промоторы металотионеина (MT), промотор фактора удлинения Ia (EF-Ia), промотор актина, промотор иммуноглобулина, промоторы теплового шока и т. п. В изобретении приемлем любой промотор или энхансер/промотор, способный инициировать экспрессию нуклеотидной последовательности изобретения в клетке-хозяине. В одном варианте осуществления последовательность, способная инициировать экспрессию, содержит область, полученную от промотора CMV, предпочтительно область, содержащую нуклеотиды от -735 до +95 из гена немедленно-раннего энхансера/промотора CMV. Специалисту в данной области техники будет понятно, что экспрессионные последовательности, используемые в изобретении, можно подходящим образом комбинировать с элементами, которые могут стабилизировать или усиливать экспрессию, такими как изоляторы, области прикрепления к матриксу, элементы STAR и т. п. Таким образом можно повышать стабильность и/или уровни экспрессии.

Для создания мультимера изобретения можно использовать любую клетку, подходящую для экспрессии рекомбинантной нуклеотидной последовательности. Указанная клетка может быть предпочтительно выращена в суспензии.

Поливалентный мультимер изобретения может быть экспрессирован в клетках-хозяевах, как правило, путем культивирования подходящей клетки изобретения и сбора указанного антитела из указанной культуры. Указанную клетку предпочтительно культивируют в бессывороточной среде. Мультимер изобретения может быть извлечен из клеток или предпочтительно из культуральной среды способами, которые по существу известны специалисту в данной области техники.

После извлечения интактное антитело обрабатывают для отщепления домена Fc (например, домена CH2 и/или CH3) от антитела. Мультимеры изобретения могут быть извлечены способами, известными в данной области техники. Такие способы могут включать в себя осаждение, центрифугирование, фильтрацию, гель-фильтрацию, аффинную хроматографию, катионо- и/или анионообменную хроматографию, гидрофобную хроматографию и т. п. В качестве средства отделения поливалентного мультимера изобретения можно использовать аффинную хроматографию, в том числе на основе линкерной последовательности.

Эффективное создание усеченных поливалентных мультимеров

Ранее в данной области техники для получения F(ab')₂ использовали ферментативное расщепление и химическую конъюгацию. Например, аффинность по сравнению с авидностью связывания антител анализировали путем создания и сравнения связывания Fab с мишенью по сравнению с F(ab')₂, изучая, приводит ли одновалентное нацеливание к меньшему взаимодействию с антигеном, чем двухвалентное нацеливание, и выясняя, приводит ли двухвалентное нацеливание к авидности. Предшествующие способы создания фрагментов F(ab')₂ посредством химической конъюгации и протеолитического расщепления оказались неэффективны для исследовательского и терапевтического применений из-за их неэффективности, создания нестабильных или потенциально иммуногенных фрагментов и гетерогенных смесей фрагментов антител, что делает разделение и применение таких фрагментов непрактичным. Появление нового формата поливалентных мультимеров, экспрессируемых с высокой степенью чистоты с помощью методик, описанных в настоящем документе, в сочетании с использованием ферментов, способных к специфическому отщеплению области Fc, позволяет получать высокие концентрации продуктов указанных усеченных поливалентных мультимеров путем устранения C-концевой гетерогенности, наблюдаемой при расщеплении пепсином.

Поливалентный мультимер, содержащий область F(ab')_n или (модифицированный F(ab')_n), может быть получен в связи с описанными в настоящем документе способами и получен из любого полноразмерного мультимера (например, полного моноклонального мультиспецифического антитела) с использованием любых соответствующих методик ферментативного отщепления и/или расщепления. В определенных вариантах осуществления фрагмент антитела можно получать путем расщепления протеазой IdeS — разлагающим IgG ферментом из *Streptococcus pyogenes*, который

расщепляет IgG1 человека в конкретном сайте под шарниром, оставляя мультимер F(ab')_n интактным, причем тяжелая цепь на одной стороне F(ab')_n соединена с тяжелой цепью на другой стороне на их соответствующем С-конце, при этом соединение содержит два или более дисульфидных мостиков. (Фиг. 4b1).

- 5 В альтернативном варианте осуществления поливалентный мультимер, не содержащий области Fc, может быть получен с использованием цистеиновой протеазы из *Porphyromonas*
gnavalis, которая расщепляет человеческий IgG1 в конкретном сайте над шарниром (KSCDK /
 THTCPPC) (SEQ ID NO: 92), генерируя интактные фрагменты Fab (Фиг. 4b2), 2Fab' (Фиг. 4b3) и Fc
 (Фиг. 4b4). Мультимер, который может быть образован по данной методике путем
 10 экспрессирования тяжелой цепи, содержащей переменный домен и константный домен
 (например, CH1, CH2 и/или CH3), соединен с дополнительным переменным доменом посредством
 линкера, описанного в настоящем документе, или соединен с легкой цепью, которая связана с
 дополнительным переменным доменом посредством линкера, описанного в настоящем
 документе, и при этом протеолитический фермент, такой как фермент из *Porphyromonas gregalis*,
 15 отщепляет константные домены указанной тяжелой цепи, оставляя интактный усеченный 2 Fab' или
 мультимер из большего количества связывающих доменов в зависимости от количества
 связывающих доменов, присутствующих на длинном плече.

- Используя клетки-хозяева, описанные в настоящем документе, и технологию
 гетеродимеризации, можно эффективно создавать в больших партиях биспецифические и
 20 мультиспецифические фрагменты, в которых удалена область Fc (например, CH2 и/или CH3),
 создавая пулы высокой концентрации фрагментов F(ab')_n, пригодные к эффективному
 использованию в исследовании и потенциальному терапевтическому применению, которые
 обеспечивают преимущества, связанные с сайленсированным (например, отсутствующим)
 фрагментом Fc, более коротким периодом полужизни и меньшим размером.

25

Удаление протеолитического фермента

- Хотя это и не является обязательным, может быть предпочтительно удалять
 протеолитический фермент после создания усеченных поливалентных мультимеров. Также может
 быть предпочтительным применение иммобилизованных ферментов (например,
 30 иммобилизованных на агарозе). Удаление ферментов может быть выполнено различными
 средствами, известными в данной области техники, включая использование протеолитических
 ферментов, включающих метку, такую как HIS-NiNTI, биотин-авидин или метка VSV/FLAG-анти-
 VSV/FLAG, присутствующая на конце фермента (предпочтительно N-конце), что позволяет удалять
 фермент с помощью аффинной колонки с анти-меткой. Фрагменты антитела, такие как Fc, также
 35 могут быть выделены с помощью способов аффинной хроматографии. Аналогичным образом,
 протеолитический фермент может быть удален посредством зарядовой хроматографии, или может
 быть получен модифицированный фермент, имеющий повышенный заряд, так чтобы после этого
 его можно было удалить посредством зарядовой хроматографии.

В альтернативном варианте осуществления смесь поливалентного мультимера изобретения, протеолитического фермента и фрагмента константного домена может подвергаться воздействию условий pH или температурных условий, способных денатурировать протеолитический фермент, но по существу не препятствующих соединению поливалентных мультимеров, что упрощает инактивацию и отделение фермента без повреждения целевого поливалентного мультимера.

Фармацевтические композиции и способы применения

В изобретении также предложена фармацевтическая композиция, которая содержит мультимер изобретения и фармацевтически приемлемый носитель и/или разбавитель.

Соответственно, в изобретении предложен поливалентный мультимер, описанный в настоящем документе, для применения в лечении организма человека или животного посредством терапии.

В настоящем изобретении дополнительно предложен способ лечения человека или животного, страдающего от медицинского состояния, включающий введение человеку или животному терапевтически эффективного количества поливалентного мультимера, описанного в настоящем документе.

Количество мультимера в соответствии с изобретением, которое необходимо ввести пациенту, как правило, находится в терапевтическом окне, и это означает, что используемого количества достаточно для достижения терапевтического эффекта, но при этом оно не превышает порогового значения, приводящего к развитию побочных эффектов в неприемлемой степени. Чем меньше количество поливалентного мультимера, необходимое для достижения желательного терапевтического эффекта, тем больше, как правило, будет терапевтическое окно. Таким образом, предпочтительным является поливалентный мультимер в соответствии с изобретением, оказывающий достаточный терапевтический эффект в низкой дозе.

Ссылка в настоящем документе на патентный документ или другое заявление, представленное в качестве известного уровня техники, не должна рассматриваться как признание того, что данный документ или заявление были известны или что содержащаяся в нем информация является частью общих знаний на дату приоритета любого из пунктов формулы изобретения.

Описание каждой ссылки, указанной в настоящем документе, полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Сравнение поливалентного мультимера с аналогичным ему интактным антителом

Использовали 5 разных антител (PG6058p02 (HER3 IgG Fc WT) SEQ ID NO: 66 и 67; PG3004p04 (HER2 IgG Fc WT) SEQ ID NO: 68 и 69; биспецифические PB11247 MF6058

(HER3)xMF3004 (HER2) Bionics® Fc WT DEKK (US 2017/0058035) SEQ ID NO: 66–69; PG1337 (TT IgG FcWT) SEQ ID NO: 70 и 71; PB4248 (TTxTT) Bionics® Fc WT DEKK (WO 2017/069628) SEQ ID NO: 70 и 71, расщепляя их с использованием набора Fab GingisKHAN и набора FabRICATOR (Genovis) для получения фрагментов Fab и F(ab')₂ соответственно.

5 Последовательности антител представлены в таблице 3.

Таблица 3

SEQ ID	Композиция	Последовательность
66	ДНК, кодирующая MF6058	ggcccagccg gccatggccc aggtgcagct ggtgcagctc ggggctgacg tgaagaagcc tggggcctca gtgaaggta cgtgcaaggc ttctggatac accttcaccg gctactatat gcactgggtg cgacagggcc ctggacaagc tcttgagtgg atgggatgga tcaaccctca aagtgggtggc aaaaactatg caaagaagtt tcagggcagg gtctctatga ccaggggagacgtccacaagc acagcctaca tgcagctgag caggctgaga tctgacgaca cggctacgta ttactgtgca agagatcatg gtctcgtca ttctggctc tactggggct ttgattattg gggccaaggt accctggta cc
67	MF6058	QVQLVQSGADVKKPGASVKVTCKASGYTFTGYMHWRQAPGQ ALEWM GWINPQSGGTNYAKKFQGRVSMRETSTSTAYMQLSRLSDDTAT YYCARDHGSRRHFSYWGFDYWGQGLVT
68	ДНК, кодирующая MF3004	caggtgcagc tgaagcagtc tggggctgag ctggtgagc ctggggcttc agtgaagctg tctgcaagg ctctggcta cacttcact ggctactata taaactgggt gaagcagagg cctggacagg gacttgatg gattgcaagg attatcctg gaagtggta tactactac aatgagaagt tcaagggcaa ggccactg actgcagaag aatcctccag cactgcctac atgcacctca gcagcctgac atctgaggac tctgctgtc attctgtgc aagacccac tatggttacg acgactggtc ctccgtgtc tggggcacag gcaccacgt cacc
69	MF3004	QVQLKQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTGYYINWVKRPGQGL EWI ARIYPGSGYTYTNEKFKGKATLTAEESSTAYMHLSSLTSEDSAVY FCARPHYGYDDWYFGVWGTTVT
70	ДНК, кодирующая MF1337	gaggtgcagc tgggtgagac tggggctgag gtgaagaagc cgggggcctc agtgaagtc tctgcaagg ctctgacta catctcacc aaatatgaca tcaactgggt gcgccaggcc cctggacaag ggcttgatg gatgggatg atgagcgta acactgaaa cacgggctat gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accagggaca cgtccataaa cacagcctac atggagctga gcagcctgac atctggtgac acggccgttt attctgtgc gaggagtagt ctttcaaga cagagacggc gcctactat cactcgtc tggacgtc gggccaaggg accacggta cc
71	MF1337	EVQLVETGAEVKKPGASVKVSKASDYFTKYDINWVRQAPGQGL EWM GWMSANTGNTGYAQKFQGRVTMTRDTSINTAYMELSSLTSGDTA VYFCARSSLFKTETAPYYHFDLVWGQTTVT

10 По 40 и 200 единиц фермента GingisKHAN инкубировали с 100 и 500 мкг/мл
поливалентного антитела к HER2/HER3 в течение 2 часов при 37 °C в присутствии 2 ммоль
цистеина (слабый восстанавливающий агент). По 40 и 200 единиц FabRICATOR LE также
инкубировали с 100 и 500 мкг/мл поливалентного антитела к HER2/HER3 в течение 2 часов при
37 °C без добавления восстанавливающего агента. Затем обе реакционные смеси очищали с
15 использованием аффинных колонок CaptureSelect CH1 (Genovis). Концентрации IgG, Fab и F(ab')₂

определяли с помощью системы Octet с использованием датчиков Protein L, и они приведены ниже в таблице 4.

Таблица 4. Количественное определение фрагментов антитела из ферментативно расщепленных реакционных смесей

	PG3004p04	PG6058p02	PG1337p324	PB11247p01	PB4248p122	Объем (мкл)
100 мкг/мл IgG	60,7	49,7	52,6	50,2	62,9	400,0
100 мкг/мл IgG + 40 ед. реакционной смеси FabRICATOR	48,2	38,9	46,2	47,3	57,8	400,0
500 мкг/мл IgG + 200 ед. реакционной смеси FabRICATOR	220,7	211,6	219,5	225,3	221,2	400,0
500 мкг/мл IgG + 200 ед. очищенного F(ab') ₂ FabRICATOR	45,6	44,2	38,9	32,3	54,8	550,0
100 мкг/мл IgG + 40 ед. реакционной смеси GingisKHAN	64,1	60,9	57,0	61,5	66,0	400,0
500 мкг/мл IgG + 200 ед. реакционной смеси GingisKHAN	316,1	319,1	295,1	312,2	327,5	400,0
500 мкг/мл IgG + 200 ед. очищенного Fab GingisKHAN	87,3	80,1	64,9	72,0	73,0	550,0

Чистоту также определяли с помощью анализа методом электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE), как показано на Фиг. 2а–е. Как показано на Фиг. 2а–е, как неочищенную смесь из реакции расщепления Fab, так и пропущенные через колонку образцы (Fc) оказались частично восстановленными в невосстанавливающих гелях. Вероятно, это вызвано мягким восстанавливающим агентом (2 ммоль цистеином) в буфере для расщепления. В невосстанавливающих условиях Fc в реакционных смесях F(ab')₂ не наблюдался. Вместо этого появляется полоса «полу-Fc», поскольку расщепляющий фермент разрезает ниже шарнирного цистеина, соединяющего две тяжелые цепи. Таким образом, невосстанавливающий гель «неочищенных» фрагментов F(ab')₂ дает ожидаемые размеры полосы 97 кДа для F(ab')₂ и немного более 25 кДа для полу-Fc фрагмента.

Способность интактных фрагментов IgG, Fab и F(ab')₂ связываться с клетками MCF7 анализировали с помощью цитометрии посредством сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS). Клетки MCF7 были выбраны, поскольку они экспрессируют как HER2, так и HER3.

Таблица 5. Связывание с IgG, Fab и F(ab')₂ на клетках MCF7 в FACS анализе

Первичное окрашивание, планшет 1											
Концентрация антитела/фрагмента (мкг/мл)											
10	3,33	1,11	0,37	0,12	0,041	0,014	0,0046	0,0015	0,00051	0,00017	0
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

PG3004 IgG	A	7645	7468	7585	7449	6194	5560	5192	5037	5071	4999	5038	4840
PG6058 IgG	B	6579	7623	7696	7442	6869	6023	5584	5372	4973	4925	4904	4962
PG1337 IgG	C	4492	4548	4932	4994	5070	5020	5092	4961	4974	4983	4495	5101
PB11247 IgG	D	8950	8826	8826	8721	7919	6371	5562	5312	5207	5183	4807	4891
PG3004 F(ab') ₂	E	7631	8129	8205	7594	7173	6008	5672	5280	4892	5011	4914	4918
PG6058 F(ab') ₂	F	5376	6614	6932	6859	7408	6582	6139	5310	5226	5280	5126	5090
PG1337 F(ab') ₂	G	4216	4715	4630	4816	4899	4894	4980	5027	5065	5209	4926	5185
PB11247 F(ab') ₂	H	9167	8825	8759	8902	8626	7561	6858	5987	5332	5345	5230	5197

Первичное окрашивание, планшет 2													
Концентрация антитела/фрагмента (мкг/мл)													
		10	3,33	1,11	0,37	0,12	0,041	0,014	0,0046	0,0015	0,00051	0,00017	0
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PB11247 IgG	A	7945	7397	7704	6819	5709	5574	5039	4863	4768	4824	5044	5010
PB4248 IgG	B	4458	4637	4874	4735	5055	4941	4940	4893	4745	4723	4845	4781
PB4248 F(ab') ₂	C	4489	4799	5005	4699	4928	5065	5004	4783	4803	5057	4965	5059
PG3004 Fab	D	6706	7180	7500	6967	6218	5722	5160	5092	4855	4925	4973	5041
PG6058 Fab	E	6370	6749	6873	5985	6422	5910	5309	4840	4789	4872	4719	4895
PG1337 Fab	F	4157	4470	4649	4793	4613	4662	4588	4668	4745	4694	4975	5005
PB11247 Fab	G	7043	7447	7459	6870	6333	5859	5251	5151	5047	4826	4883	4886
PB4248 Fab	H	4182	4751	4605	4759	4813	4753	4784	4832	4747	4854	4748	4948

Как видно из таблицы 5, полученные фрагменты Fab и F(ab')₂ сохраняют свои свойства связывания, и IgG и соответствующие фрагменты F(ab')₂ связываются со схожей аффинностью. Фрагменты Fab также связываются, хотя и с более низкой аффинностью, как и ожидалось. Это показывает, что как плечо HER2, так и плечо HER3 во фрагменте F(ab')₂, полученном с использованием PB11247 (MF6058 (HER3)xMF3004 (HER2)) Biclomics®, доступны и функциональны.

- Способность фрагментов F(ab')₂, полученных из IgG или биклонических соединений, сохранять функциональную активность определяли с помощью анализа гепарин-зависимой (Heregulin) пролиферации клеток MCF-7. Антитела PG3004 (Her2), PG6058 (Her3), PG1337 (TT), MF6058 (HER3)xMF3004 (HER2) Biclomics® Fc WT DEKK (US 2017/0058035) и MF1337xMF1337 (TT x TT) и фрагменты F(ab')₂, полученные при воздействии на вышеуказанные антитела ферментом, способным к расщеплению ниже шарнира (как неочищенных реакционных смесей 500 мкг/мл, так и очищенных фрагментов F(ab')₂) исследовали в серии из 9 полулогарифмических титрований, идя вниз от 10 мкг/мл (по результатам измерения в системе Octet) в качестве контроля 100%-го блокирования, используя в качестве 100%-го контроля блокирования стауроспорин (1 : 200). В каждом планшете делали две лунки без херегулина, две лунки с херегулином, но без ингибитора, и две лунки со стауроспорином 1 : 200 (максимальное ингибирование). Как показано на Фиг. 3, фрагменты F(ab')₂ PB11247 в анализе пролиферации являются такими же функциональными, как их соответствующие Biclomics®, и между активностью очищенных или неочищенных F(ab')₂ отсутствует четкое различие.

Пример 2. Продукция F(ab')₃ из трехвалентных молекул IgG

Также анализировали способность к созданию фрагментов F(ab')_n (включая фрагменты F(ab')₃, 2 Fab' и Fab) из поливалентных мультимеров. Как показано на Фиг. 4, можно получать

5 фрагменты F(ab')₃, 2Fab' или Fab в зависимости от выбранной протеазы (например, FabRICATOR или GingisKHAN). Анализировали следующие трехвалентные мультимеры, обладающие различными антигенсвязывающими свойствами и содержащие общую легкую цепь: PT23103p09 (имеющий последовательность тяжелой цепи VH2-линкер-CH1-VH3 с SEQ ID NO: 72 и 73); PT23103p15 (имеющий последовательность тяжелой цепи VH2-линкер-CH1-VH3 с SEQ ID NO: 74

10 и 75); PT23103p04 (имеющий последовательность тяжелой цепи VH2-линкер-CH1-VH3 с SEQ ID NO: 76 и 77); PT23103p08 (имеющий последовательность тяжелой цепи VH2-линкер-CH1-VH3 с SEQ ID NO: 78 и 79); PT23103p03 (имеющий последовательность тяжелой цепи VH2-линкер-CH1-VH3 с SEQ ID NO: 80 и 81); PT23103p11 (имеющий последовательность тяжелой цепи VH2-линкер-CH1-VH3 с SEQ ID NO: 82 и 83); и PT23103p12 (имеющий последовательность тяжелой

15 цепи VH2-линкер-CH1-VH3 с SEQ ID NO: 84 и 85), причем каждый PT кодирует следующий триспецифический мультимер, содержащий MF1337 (столбнячный анатоксин) SEQ ID NO: 70 и 71 в положении VH3 (верхнее длинное плечо), MF1122 (фибриноген) SEQ ID NO: 86 и 87 в положении VH2 (внутреннее длинное плечо) и MF1025 (тироглобулин) SEQ ID NO: 88 и 89 в положении VH1 (короткое плечо), причем каждый домен VH соединен cLC. См. Фиг. 4.

20 Последовательности трехвалентных мультимеров представлены в таблице 6.

Таблица 6

SEQ ID		Композиция	Последовательность
72	PT23103p09	ДНК, кодирующая MF1337-CH1-IgG1 G4S линкер-MF1122	ggccagccggccatggccgaggtgcagctggaggagactggggctgaggtg aagaagccggggcctcagtgaaaggtcctcgaaggtctgactacatctca ccaaatatgacatcaactgggtgcgccaggccctggacaaggcctgaatgga tgggatggatgagcgtaacactggaacacgggctatgcacagaagttccag ggcagagtcacatgaccaggggacacgtccataaacacagcctacatggagct gagcagcctgacatctggtgacacggccgtttattctgtgcgaggagtagtcttt caagacagagacggcgccctactatcacttcgctctggacgtctggggccaagg gaccacgggtcaccgtcctcagtgctagcaccaggggccatcggtctccccct ggcaccctcctcaagtcacgtctgggggcacagcggccctgggtgcctgg tcaaggactactccccgaaccgggtgacgggtgctggaactcagcgccctga ccagcggcgtgcacacctcccggtgctctacagtcctcaggactactccct cagcagcgtcgtgaccgtgccctccagcagcttgggacccagacactacatctg caacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagccc aagagctgcgacggcgggtggcggcagcggcggcggaggcagcaggtgca gctggtggagtctggggaggcgtggtccagcctgggaggtccctgagactct cctgtgcagcctctggattcacctcagtagtatggcatgcactgggtccgccag gctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatatcatatgatggagtaat aaatactatgcagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattcca agaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagctgaggacacggccgtg attactgtgaagagccctctcacgaccatcccatggactattggggccaagg tacctgtcaccgtctcgagt

73	PT23103p09	MF1337-CH1-IgG1 G4S линкер-MF1122	<u>AQPAMAEVQLVETGAEVKKPGASVKVSCKASDYI</u> <u>FTKYDINWVRQAPGQGLEWMGWMSANTGNTGYA</u> <u>QKFQGRVTMTDRDTSINTAYMELSSLTSGDTAVYFC</u> <u>ARSSLFKTETAPYYHFALDVWGQGTITVTVSSASTK</u> GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDGGGSSG GGGSEVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSS YGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSV KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARA LFTTIAMDYWGQGTITVTVSS
74	PT23103p15	ДНК, кодирующая MF1377-CH1-IgG1 H линкер-MF1122	ggccagccggccatggccgaggtgcagctggaggactggggctgaggtg aagaagccgggggcctcagtgaaggtctcctgcaaggcttctgactacatctca ccaaatatgacatcaactgggtgcgccaggccctggacaaggcttgaatgga tgggatggatgagcgtaacactggaacacgggctatgcacagaagtccag ggcagagtcaccatgaccagggacacgtccataaacacagcctacatggagct gagcagcctgacatctggtagacacggcgtttatttctgtgcgaggagtagctttt caagacagagacggcgccctactatcacttcgctctggagctctggggccaagg gaccacggtcaccgtctcagtgctagcaccaggcccatcggctctccccct ggcaccctcctccaagtccacgtctgggggcacagcgccctgggctgcctgg tcaaggactactccccgaaccggtgacggtgtgtggaactcagcgccctga ccagcggcgtgcacacctccccggtgtctacagtcctcaggacttactccct cagcagcgtcgtgaccgtgccctccagcagctgggcaccaagactacatctg caacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagccc aagagctgcgacaagaccacaccagccccccagccccgctcccagctgc tggcgggcaggtgcagctgtgagctgtggggaggcgtgtccagcctgg gaggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtagctatggca tgcactgggtccgccaggctccaggaaggggctggagtggtggcagttata tcatatgatggaagtaataataactatgcagactccgtgaaggggcgttaccat ctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagct gaggacacggcgtgtattactgtgcaagagccctcttcacgaccatcgccatg gactattggggccaaggtacccttgtcaccgtctcgagt
75	PT23103p15	MF1377-CH1-IgG1 H линкер-MF1122	<u>AQPAMAEVQLVETGAEVKKPGASVKVSCKASDYI</u> <u>FTKYDINWVRQAPGQGLEWMGWMSANTGNTGYA</u> <u>QKFQGRVTMTDRDTSINTAYMELSSLTSGDTAVYFC</u> <u>ARSSLFKTETAPYYHFALDVWGQGTITVTVSSASTK</u> GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTSPP SPAPELLGGEVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASG FTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CARALFTTIAMDYWGQGTITVTVSS
76	PT23103p04	ДНК, кодирующая MF1377-CH1-IgG2A MH линкер-MF1122	ggccagccggccatggccgaggtgcagctggaggactggggctgaggtg aagaagccgggggcctcagtgaaggtctcctgcaaggcttctgactacatctca ccaaatatgacatcaactgggtgcgccaggccctggacaaggcttgaatgga tgggatggatgagcgtaacactggaacacgggctatgcacagaagtccag ggcagagtcaccatgaccagggacacgtccataaacacagcctacatggagct gagcagcctgacatctggtagacacggcgtttatttctgtgcgaggagtagctttt caagacagagacggcgccctactatcacttcgctctggagctctggggccaagg gaccacggtcaccgtctcagtgctagcaccaggcccatcggctgtccccct ggccccctgcagccggagcaccagcagagcaccggccgctgggctgcct ggtgaagactactccccgagcccgtagcgtgagctggaacagcggcggcc tgaccagcggcgtgcacacctccccgccgtgtgcagagcagcggcctgtac agcctgagcagcgtgtgacgggtgccagcagcaacttcggcaccagaccta cacctgaacgtggaccacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaccgtg gagcggagagcagcgtggagagccccccagccccgaggtgcagctgggtg

			gagctctggggaggcgtgggtccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgc agcctctggattcaccttcagtagctatggcatgactgggtccgccaggctcca ggcaaggggcgtgagtggtggcagttatatcatatgatggaagtaataaact atgcagactccgtgaaggccgattcaccatctccagagacaattccaagaaca cgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagctgaggacacggcgtgtattactg tgcaagagccctcttcacgaccatcgccatggactattggggccaaggtaccctt gtcaccgtctcgagt
77	PT23103p04	MF1377-CH1-IgG2A МН линкер-MF1122	<u>AQPAMAEVQLVETGAEVKKPGASVKVSCKASDYI</u> <u>FTKYDINWVRQAPGQGLEWMGWMSANTGNTGYA</u> <u>QKFQGRVTMTDRDTSINTAYMELSSLTSGDTAVYFC</u> <u>ARSSLFKTETAPYYHFALDVWGQGTITVTVSSASTK</u> <u>GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS</u> <u>WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNF</u> <u>GTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVRKSSVESPPSPE</u> <u>VQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH</u> <u>WVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKKYYADSVKGRFT</u> <u>ISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARALFTTI</u> <u>AMDYWGQGTITVTVSS</u>
78	PT23103p08	ДНК, кодирующая MF1377-CH1-IgG1 МН линкер-MF1122	ggcccagccggccatggccgaggtgcagctgggtggagactggggctgaggtg aagaagccggggcctcagtgaggtctcctgcaaggcttctgactacatctca ccaaatatgacatcaactgggtgcgccaggccctggacaaggcctgaatgga tgggatggatgagcgtaacactggaacacgggctatgcacagaagtccag ggcagagtcaccatgaccaggacacgtccataaacacagcctacatggagct gagcagcctgacatctgggtgacacggcgtttattctgtgcgaggagtatgcttt caagacagagacggcgccctactatcacttcgctctggacgtctggggccaagg gaccacggtcaccgtctcagtgctagcaccaaggggccatcggctctccccct ggcaccctcctccaagtcacgtctggggcacagcggcctgggctgcctgg tcaaggactactccccgaaccgggtgacgggtcgtggaactcagcgccctga ccagcggcgtgcacacctcccggtgctctacagtcctcaggactactccct cagcagcgtcgtgaccgtgccctccagcagctgggcaccaacacacatctg caacgtgaatcacaagcccagcaacaccaagtggaagaagaggtgagccc aagagctgcgacaagaccacaccagccccccagccccgaggtgcagctgg tggagtctgggggaggcgtgtccagcctgggaggtccctgagactctcctgtg cagcctctggattcaccttcagtagctatggcatgactgggtccgccaggctcc aggcaaggggcgtggagtgggtggcagttatatcatatgatggaagtaataaac tatgcagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattccaagaaca cgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagctgaggacacggcgtgtattactg tgcaagagccctcttcacgaccatcgccatggactattggggccaaggtaccctt gtcaccgtctcgagt
79	PT23103p08	MF1377-CH1-IgG1 МН линкер-MF1122	<u>AQPAMAEVQLVETGAEVKKPGASVKVSCKASDYI</u> <u>FTKYDINWVRQAPGQGLEWMGWMSANTGNTGYA</u> <u>QKFQGRVTMTDRDTSINTAYMELSSLTSGDTAVYFC</u> <u>ARSSLFKTETAPYYHFALDVWGQGTITVTVSSASTK</u> <u>GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS</u> <u>WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSL</u> <u>GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTSPP</u> <u>SPEVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYG</u> <u>MHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKKYYADSVKG</u> <u>RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARALF</u> <u>TTIAMDYWGQGTITVTVSS</u>
80	PT23103p03	ДНК, кодирующая MF1377-CH1-IgG1 УН линкер-MF1122	ggcccagccggccatggccgaggtgcagctgggtggagactggggctgaggtg aagaagccggggcctcagtgaggtctcctgcaaggcttctgactacatctca ccaaatatgacatcaactgggtgcgccaggccctggacaaggcctgaatgga

			tgggatggatgagcgctaactggaacacgggctatgcacagaagttccag ggcaagatcaccatgaccaggacacgtccataaacacagcctacatggagct gagcagcctgacatctggtgacacggccgtttatttctgtgcgaggagtagctttt caagacagagacggcgccctactatcacttcgctctggacgtctggggccaagg gaccacggtcaccgtctccagtctagcaccaggcccatcggcttccccct ggaccctctccaagtcacgtctggggcacagcggccctgggctgcctgg tcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgctggaactcagcggccctga ccagcggcgtgcacacctccccggctgtcctacagtcctcaggactctactccct cagcagcgtcgtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctg caacgtgaatcacaaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagccc aagagctgcgacaagaccacaccagggtgcagctgggtgagctctgggggag gcgtggtccagcctgggaggtccctgagactctctgtgcagcctctggattcac ctfcagtagctatggcatgactgggtccgccaggtccaggcaaggggctgga gtgggtggcagttatatacatatgatggaagtaataaatactatgcagactccgtga agggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgcttatctgcaaat gaacagcctgagagctgaggacacggcgtgtattactgtcaagagccctctt cagcaccatcgccatggactattggggccaaggtaccctgtcaccgtctcgagt
81	PT23103p03	MF1377-CH1-IgG1 УН линкер-MF1122	<u>AQPAMAEVQLVETGAEVKKPGASVKVSC</u> <u>KASDYI</u> <u>FTKYDINWVRQAPGQGLEWMGWMSANTGNTGYA</u> <u>QKFQGRVTMTRDTSINTAYMELSSLTSGD</u> <u>TA</u> <u>VYFC</u> <u>ARSSLFKTETAPYYHFALDVWGQGT</u> <u>TVT</u> <u>VSSASTK</u> GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT <u>EVQ</u> <u>L</u> <u>VESGGGVVQPGRSLRLS</u> <u>CAASGFTFSSYGMHWV</u> <u>ROAPGKGLEWVA</u> <u>VISYDGSNKYYADSVKGRFTISR</u> <u>DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARALFTTIAM</u> <u>DYWGQGLTVTVSS</u>
82	PT23103p11	ДНК, кодирующая MF1377-CH1-IgG2 Н линкер-MF1122	Ggcccagccggccatggccgaggtgcagctgggtggagactggggctgaggt gaagaagccgggggctcagtgaaaggtctcctgcaagccttgactacatcttc accaaatgatcatcaactgggtgcgccaggcccttgacaaggcgtgaatgg atgggatggatgagcgctaactggaacacgggctatgcacagaagtcca gggcagagtcaccatgaccaggacacgtccataaacacagcctacatggagc tgagcagcctgacatctggtgacacggccgtttatttctgtgcgaggagtagctttt tcaagacagagacggcgccctactatcacttcgctctggacgtctggggccaag ggaccacggtcaccgtctccagtctagcaccaggcccccagcgtgtcccc ctggccccctgcagccggagcaccagcgagagcaccgccgccctgggctgcc tggagaaggactacttccccgagcccgtgaccgtgagctggaacagcggcgcc ctgaccagcggcgtgcacaccttccccgccgtgctgcagagcagcggcctgta cagcctgagcagcgtggtgacggtgccagcagcaacttcggcacccaagacct acacctgcaacgtggaccacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaccgt ggagcggagagcagcgtggagagccccccagccccccccccccctggc cggcgaggtgcagctggtggagtctgggggagcgtggtccagcctgggagg tccctgagactctctgtgcagcctctgattcaccttcagtagctatggcatcac tgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatatacatat gatggaagtaataaatactatgcagactccgtgaaggccgattcaccatctcca gagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagctgagg acacggccgtgtattactgtgcaagagccctcttcagcaccatcgccatggactat tggggccaaggtaccctgtcaccgtctcgagt
83	PT23103p11	MF1377-CH1-IgG2 Н линкер-MF1122	<u>AQPAMAEVQLVETGAEVKKPGASVKVSC</u> <u>KASDYI</u> <u>FTKYDINWVRQAPGQGLEWMGWMSANTGNTGYA</u> <u>QKFQGRVTMTRDTSINTAYMELSSLTSGD</u> <u>TA</u> <u>VYFC</u> <u>ARSSLFKTETAPYYHFALDVWGQGT</u> <u>TVT</u> <u>VSSASTK</u> GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVRKSSVESPPSPA <u>PPVAGEVQLVESGGGVVQPGRSLRLS</u> <u>CAASGFTFSS</u>

			<u>YGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSV</u> <u>KGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARA</u> <u>LFTTIAMDYWGQGLTVTVSS</u>
84	PT23103p12	ДНК, кодирующая MF1377-CH1-IgG2B Н линкер-MF1122	ggcccgagccggccatggccgaggtgcagctggaggagactggggctgaggtg aagaagccgggggcctcagtgaggtctcctgcaaggcttctgactacatctca ccaaatatgacatcaactgggtgcgccaggccctggacaagggttgatgga tgggatggatgagcgctaacactggaacacgggctatgcacagaagtccag ggcagagtcacatgaccagggacacgtccataaacacagcctacatggagct gagcagcctgacatctggtagacggccgtttattctgtgcgaggagtagtcttt caagacagagacggcgccctactatcacttcgctctggagctctggggccaagg gaccacggtcaccgtcctcagtgtagcaccaggggcccgagcgtgtccccct ggccccctctagccggagcaccagcgagagcaccggcgccctgggctgcctg gtgaaggactactccccgagcccgtagcgtggaacacggcgccct gaccagcggcgtgcacacctccccgctgctgcagagcagcggcctgtaca gcctgagcagcgtggtagcgggtgccagcagcaacttcggcaccagacctac acctgcaacgtggaccacaagcccagcaacaccaagggtggacaagaccgtgg agcggaagtgcagcgtggagagccccccagccccgccccccctgtggccg gcgaggtgcagctggtagctgggggagcgtgtccagcctgggaggtc cctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtagctatgcatgcactg ggtccgccaggctccaggaaggggctggagtggtggcagttatcatatga tggaaagtaataatactatgcagactccgtgaaggccgattcacctctccaga gacaattccaagaacacgctgtatctgcaatgaacagcctgagagctgaggac acggccgtgtattactgtgcaagagccctcttcacgaccatcgccatggactattg gggccaaggtaccctgtcaccgtctcagat
85	PT23103p12	MF1377-CH1-IgG2B Н линкер-MF1122	<u>AQPAMAEVOLVETGAEVKKPGASVKVSC</u> <u>KASDIYFTKYDINWVRQAPGQGLEWMGWMSANT</u> <u>GNTGYAQKFQGRVTMTRDTSINTAYMELSSLT</u> <u>SGDTAVYFCARSSLFKTETAPYYHFDLVWGO</u> <u>GTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCL</u> <u>VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY</u> <u>SLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV</u> <u>ERKCSVESPPSPAPPVAGEVOLVESGGGVVQGRSL</u> <u>RLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIS</u> <u>YDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLR</u> <u>AEDTAVYYCARALFTTIAMDYWGQGLTVTVSS</u>
86		MF1122 ДНК	gaggtgcagc tggtaggagtc tgggggaggc gtgtccagc ctgggaggtc cctgagactc tctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagtaa taaatactat gcagactccg tgaaggccg attcacatc tccagagaca attccaagaa cacgtgtat ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagagccctc ttcacacca tcgcatgga ctattggggc caaggtacc tggtcacc
87		MF1122 AA	EVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWV AVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN NSLRAEDTAVYYCARALFTTIAMDYWGQGLTVT
88		MF1025 ДНК	gaggtgcagc tggtaggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc tctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtgtag cacatactac gcagactccg tgaaggccg gttcacatc tccagagaca attccaagaa cacgtgtat ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc aagggccgat tggggggcga ctttgacta ctggggccaa ggtaccctgg tcacc
89		MF1025 AA	EVQLVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYAMS WVRQAPGKGLEWV

			SAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARADWWATFDYWGQGLVT
--	--	--	---

Для каждой ферментативной реакции 200 мкг/мл IgG в конечном объеме реакционной смеси 400 мкл инкубировали с 80 единицами FabRICATOR LE или 80 единицами GingisKHAN в 10-кратно разведенном восстанавливающем буфере, инкубировали при 37 °С в течение 2 часов.

- 5 Для PT23103p09; PT23103p015; PT23103p04 использовали 250 мкл реакционной смеси для очистки F(ab')₃ с использованием колонок CaptureSelect CH1. Собирали фильтрат, содержащий Fc и фермент, а также элюированные фракции. Концентрации белка во всех полученных препаратах F(ab')₃ измеряли на A280 нм. В таблице 7 показаны концентрации белка для каждого расщепления.

10

Таблица 7. Концентрация белка для усеченного поливалентного мультимера (F(ab')₃) и фрагментов Fab

Образец	Линкер	Фермент	Образец	Молекул в смеси	Погл. (280 нм)	Конц. (мг/мл)	Конц. (мкМ)	Выход (%)
PT23103p09	IgG1 G4S	Без фермента	Нерасщепленный IgG	IgG	0,065	0,188	0,96	100
		Fabricator	Неочищенная смесь после расщепления	F(ab') ₃ + 2х полу-Fc + фермент	0,06	0,177	0,91	94
			Элюирование	F(ab') ₃	0,055	0,081	0,56	58
		Gingiskhan	Неочищенная смесь после расщепления	Fab + 2Fab' + Fc + фермент	0,069	0,207	1,06	110
			Элюирование	Fab + 2Fab'	0,052	0,066	0,46	47
PT23103p15	IgG1 H	Без фермента	Нерасщепленный IgG	IgG	0,066	0,201	1,03	100
		Fabricator	Неочищенная смесь после расщепления	F(ab') ₃ + 2х полу-Fc + фермент	0,07	0,226	1,16	112
			Элюирование	F(ab') ₃	0,055	0,093	0,64	55
		Gingiskhan	Неочищенная смесь после расщепления	Fab + 2Fab' + Fc + фермент	0,071	0,218	1,12	108
			Элюирование	Fab + 2Fab'	0,067	0,163	1,12	101
PT23103p04	IgG2A MH	Без фермента	Нерасщепленный IgG	IgG	0,061	0,189	0,97	100
		Fabricator	Неочищенная смесь после расщепления	F(ab') ₃ + 2х полу-Fc + фермент	0,059	0,189	0,97	100
			Элюирование	F(ab') ₃	0,069	0,104	0,72	74
		Gingiskhan	Неочищенная смесь после расщепления	Fab + 2Fab' + Fc + фермент	0,068	0,208	1,07	110
			Элюирование	Fab + 2Fab'	0,053	0,094	0,65	61
PT23103p08	IgG1 MH	Без фермента	Нерасщепленный IgG	IgG	0,065	0,203	1,04	100
		Fabricator	Неочищенная смесь после расщепления	F(ab') ₃ + 2х полу-Fc + фермент	0,064	0,219	1,12	107

		Gingiskhan	Неочищенная смесь после расщепления	Fab + 2Fab' + Fc + фермент	0,063	0,204	1,04	100
PT23103p03	IgG1 UH	Без фермента	Нерасщепленный IgG	Трехвалентный	0,062	0,198	1,02	100
		Fabricator	Неочищенная смесь после расщепления	F(ab') ₃ + 2х полу-Fc + фермент	0,074	0,203	1,04	102
		Gingiskhan	Неочищенная смесь после расщепления	Fab + 2Fab' + Fc + фермент	0,07	0,223	1,14	112
PT23103p011	IgG2A H	Без фермента	Нерасщепленный IgG	Трехвалентный	0,059	0,186	0,95	100
		Fabricator	Неочищенная смесь после расщепления	F(ab') ₃ + 2х полу-Fc + фермент	0,06	0,173	0,88	93
		Gingiskhan	Неочищенная смесь после расщепления	Fab + 2Fab' + Fc + фермент	0,062	0,202	1,03	108
PT23103p012	IgG2B H	Без фермента	Нерасщепленный IgG	Трехвалентный	0,061	0,15	0,77	100
		Fabricator	Неочищенная смесь после расщепления	F(ab') ₃ + 2х полу-Fc + фермент	0,061	0,196	1,00	130
		Gingiskhan	Неочищенная смесь после расщепления	Fab + 2Fab' + Fc + фермент	0,07	0,22	1,12	146

Процентное содержание F(ab')₃, полученного в неочищенном экстракте, находилось в диапазоне 55–74% для PT23103p09, PT23103p15 и PT23103p04. Для неочищенных экстрактов расщепления анализировали полную концентрацию белка по сравнению с исходным материалом поливалентного мультимера, в результате учитывали 100% белков для всех поливалентных мультимеров. Выходы в процентах рассчитывали путем анализа концентрации (мг/мл) с учетом молекулярной массы (Да) и сравнения с исходным материалом поливалентного мультимера, где молекулярная масса поливалентного мультимера, усеченного поливалентного мультимера и отщепленного Fc имеют значения, приведенные в таблице 8.

10

Таблица 8. Молекулярная масса мультимеров и фрагментов

	Молекулярная масса (кДа)
Трехвалентный	195
IgG/гомодимеры	146
F(ab') ₃	145
полу-Fc	25
Fc	51

15

Для подтверждения специфического связывания фрагментов антитела проводили реакции ИФА для определения специфического связывания с антигенами столбняка, фибриногена и тироглобулина. Полученные усеченные поливалентные мультимеры, Fab и нерасщепленные IgG тестировали на связывание в диапазоне титрования со столбнячным анатоксином, нанесенным в концентрации 2 мкг/мл; фибриногеном, нанесенным в концентрации 10 мкг/мл; или тироглобулином, нанесенным в концентрации 10 мкг/мл. Использовали отрицательный контроль

EGFR-Fc человека, нанесенным в концентрации 2,5 мкг/мл. Анализировали белок в концентрации 7,5 мкг/мл для каждого очищенного фрагмента: F(ab')₃, Fab и 2Fab' и в качестве отрицательного и положительного контролей включали PG1337p324. Детекцию связанного F(ab')_n проводили с помощью детектирующего антитела к CH-1 в разведении 1/2000.

5

Как показано в таблице 9, все образцы (нерасщепленные, неочищенные и очищенные Fab) сохраняли связывание со столбнячным анатоксином в положении VH3 или в верхнем положении на «длинном плече» F(ab')₃ (см. Фиг. 4). Сигнал связывания (погл. на 450 нм) очень схож для нерасщепленных и расщепленных образцов.

10

Таблица 9. ИФА анализ связывания столбнячного анатоксина

Столбняч ный анатоксин	PT23103p09					PT23103p15							Конц. очищенный образец (мкг/мл)
	Fabricator			Gingiskhan		Fabricator			Gingiskhan				
	Нерасщеп- ленная	Неочи- щенная смесь	Элюиро- вание	Неочи- щенная смесь	Элюиро- вание	Нерасщеп- ленная	Неочи- щенная смесь	Элюиро- вание	Неочи- щенная смесь	Элюиро- вание	PG1337p3 24	Контроль (-)	
Конц. IgG (мкг/мл)													
10	1,031	0,922	0,959	1,025	0,987	0,986	1,029	1,022	0,941	0,961	0,979	0,04	7,5
5	0,974	0,913	0,909	0,929	0,899	0,958	0,933	0,87	0,873	0,807	0,914	0,043	3,75
2,5	0,837	0,956	0,918	0,896	0,923	0,936	0,949	0,922	0,826	0,852	0,897	0,042	1,875
1,25	0,785	0,886	0,863	0,903	0,887	0,908	0,941	0,913	0,844	0,737	0,909	0,04	0,9375
0,625	0,786	0,748	0,732	0,769	0,775	0,777	0,815	0,761	0,69	0,614	0,827	0,04	0,46875
0,3125	0,743	0,797	0,729	0,717	0,724	0,802	0,853	0,764	0,66	0,501	0,886	0,042	0,234375
0,15625	0,563	0,625	0,59	0,543	0,614	0,69	0,722	0,643	0,487	0,363	0,831	0,032	0,1171875
0,078125	0,413	0,512	0,437	0,346	0,451	0,519	0,573	0,485	0,337	0,252	0,765	0,03	0,05859375

Столбняч ный анатоксин	PT23103p04					PT23103p8			PT23103p3				Конц. очищенный образец (мкг/мл)
	Fabricator			Gingiskhan		Fabricator		Gingiskhan	Fabricator		Gingiskhan		
	Нерасщеп- ленная	Неочи- щенная смесь	Элюиро- вание	Неочи- щенная смесь	Элюиро- вание	Нерасщеп- ленная	Неочи- щенная смесь	Неочи- щенная смесь	Нерасщеп- ленная	Неочи- щенная смесь	Неочи- щенная смесь	Контроль (-)	
Конц. IgG (мкг/мл)													
10	0,831	0,874	0,872	0,859	0,886	0,908	0,912	0,829	0,965	0,887	0,851	0,038	7,5
5	0,91	0,935	0,923	0,925	0,925	0,981	0,958	0,904	1,014	0,963	0,915	0,031	3,75
2,5	0,927	0,971	0,944	0,914	0,864	0,922	0,977	0,874	1,005	0,982	0,931	0,03	1,875
1,25	0,869	0,951	0,899	0,882	0,863	0,912	0,991	0,804	0,954	0,895	0,836	0,031	0,9375
0,625	0,919	0,959	0,938	0,91	0,877	0,956	0,973	0,812	0,973	0,959	0,889	0,037	0,46875
0,3125	0,712	0,845	0,864	0,823	0,783	0,871	0,861	0,724	0,873	0,878	0,736	0,041	0,234375
0,15625	0,684	0,694	0,698	0,671	0,668	0,756	0,802	0,567	0,761	0,756	0,561	0,041	0,1171875
0,078125	0,512	0,432	0,514	0,466	0,457	0,545	0,576	0,384	0,549	0,57	0,377	0,029	0

Столбняч ный анатоксин	PT23103p11			PT23103p12				Конц. очищенный образец (мкг/мл)
	Fabricator		Gingiskhan	Fabricator		Gingiskhan		
	Нерасщеп- ленная	Неочи- щенная смесь	Неочи- щенная смесь	Нерасщеп- ленная	Неочи- щенная смесь	Неочи- щенная смесь	Контроль (-)	
Конц. IgG (мкг/мл)								
10	0,785	0,897	0,862	0,874	0,883	0,888	0,035	7,5
5	0,861	0,888	0,857	0,829	0,834	0,88	0,038	3,75
2,5	0,947	0,939	0,934	0,919	0,979	0,996	0,04	1,875
1,25	0,913	0,902	0,884	0,944	0,941	0,933	0,041	0,9375
0,625	0,861	0,926	0,91	0,862	0,916	0,924	0,04	0,46875
0,3125	0,644	0,813	0,709	0,706	0,83	0,808	0,036	0,234375
0,15625	0,627	0,686	0,604	0,559	0,815	0,643	0,032	0,1171875
0,078125	0,412	0,573	0,398	0,364	0,477	0,438	0,029	0

Затем трехвалентные усеченные мультимеры анализировали на связывание фибриногена, которое локализовано в положении VH2, представляющем собой внутреннее положение длинного плеча F(ab')₃ (см. Фиг. 4). Все образцы F(ab')₃ после расщепления набором Fabricator (нерасщепленные, неочищенные и очищенные Fab) сохраняли свое связывание с фибриногеном (таблица 10). Сигнал связывания (погл. на 450 нм) был очень схож для нерасщепленных и расщепленных образцов. В случае 2Fab', полученных расщеплением GingisKHAN (см. Фиг. 4), связывание сохранялось, но было снижено в случае линкеров IgG1G4S, IgG 2AMH, IgG 2AH и

15

IgG 2BH. Поэтому IgG с линкерами IgG1 H, IgG1-MH и IgG1-UH все теряли свое связывание с фибриногеном.

Таблица 10. ИФА анализ связывания фибриногена

Фибриноген		PT23103p09					PT23103p15					PG1337p3 24		Контроль (-)		Конц. очищенный образец (мкг/мл)
		Fabricator			Gingiskhan		Fabricator			Gingiskhan						
Конц. IgG (мкг/мл)		Нерасщеп- ленная	Неочи- щенная смесь	Элюиро- вание	Неочи- щенная смесь	Элюиро- вание	Нерасщеп- ленная	Неочи- щенная смесь	Элюиро- вание	Неочи- щенная смесь	Элюиро- вание					
10		0,793	0,803	0,779	0,624	0,628	0,801	0,779	0,733	0,08	0,057	0,030	0,030	7,5		
5		0,738	0,77	0,728	0,552	0,561	0,748	0,781	0,66	0,065	0,055	0,04	0,04	3,75		
2,5		0,587	0,644	0,612	0,367	0,413	0,709	0,685	0,599	0,054	0,049	0,041	0,030	1,875		
1,25		0,382	0,443	0,367	0,217	0,26	0,506	0,442	0,388	0,047	0,045	0,046	0,041	0,9375		
0,625		0,262	0,305	0,252	0,15	0,171	0,392	0,338	0,283	0,045	0,045	0,030	0,041	0,46875		
0,3125		0,161	0,175	0,16	0,089	0,11	0,25	0,235	0,181	0,044	0,043	0,041	0,042	0,234375		
0,15625		0,105	0,111	0,087	0,073	0,075	0,147	0,131	0,106	0,033	0,041	0,043	0,041	0,1171875		
0		0,075	0,083	0,067	0,047	0,056	0,097	0,086	0,068	0,037	0,038	0,04	0,04	0		

Фибриноген		PT23103p04					PT23103p8			PT23103p11			Контроль (-)		Конц. очищенный образец (мкг/мл)
		Fabricator			Gingiskhan		Fabricator			Gingiskhan					
Конц. IgG (мкг/мл)		Нерасщеп- ленная	Неочи- щенная смесь	Элюиро- вание	Неочи- щенная смесь	Элюиро- вание	Нерасщеп- ленная	Неочи- щенная смесь	Неочи- щенная смесь	Нерасщеп- ленная	Неочи- щенная смесь	Неочи- щенная смесь			
10		0,797	0,779	0,718	0,436	0,429	0,839	0,82	0,129	0,755	0,83	0,130	0,03	7,5	
5		0,776	0,781	0,699	0,316	0,338	0,834	0,891	0,097	0,839	0,847	0,080	0,030	3,75	
2,5		0,6	0,629	0,546	0,21	0,205	0,78	0,757	0,073	0,68	0,728	0,080	0,041	1,875	
1,25		0,437	0,433	0,349	0,12	0,128	0,668	0,636	0,053	0,481	0,522	0,052	0,04	0,9375	
0,625		0,273	0,288	0,231	0,086	0,087	0,482	0,521	0,065	0,358	0,365	0,040	0,041	0,46875	
0,3125		0,166	0,174	0,137	0,069	0,064	0,291	0,298	0,045	0,207	0,22	0,040	0,030	0,234375	
0,15625		0,108	0,112	0,093	0,056	0,061	0,188	0,188	0,044	0,133	0,137	0,043	0,04	0,1171875	
0		0,073	0,083	0,066	0,05	0,046	0,117	0,115	0,033	0,084	0,088	0,030	0,041	0	

Фибриноген		PT23103p11			PT23103p12			Контроль (-)	Конц. очищенный образец (мкг/мл)
		Fabricator		Gingiskhan	Fabricator		Gingiskhan		
Конц. IgG (мкг/мл)		Нерасщеп- ленная	Неочи- щенная смесь	Неочи- щенная смесь	Нерасщеп- ленная	Неочи- щенная смесь	Неочи- щенная смесь		
10		0,775	0,807	0,334	0,548	0,707	0,435	0,04	7,5
5		0,703	0,686	0,237	0,443	0,613	0,311	0,042	3,75
2,5		0,53	0,525	0,151	0,305	0,479	0,207	0,042	1,875
1,25		0,33	0,34	0,093	0,221	0,374	0,162	0,041	0,9375
0,625		0,23	0,22	0,068	0,132	0,247	0,109	0,04	0,46875
0,3125		0,128	0,126	0,054	0,078	0,117	0,063	0,043	0,234375
0,15625		0,092	0,086	0,05	0,064	0,085	0,054	0,044	0,1171875
0		0,062	0,067	0,043	0,049	0,06	0,046	0,038	0

5

Трехвалентные мультимеры также анализировали на связывание тироглобулина, которое локализовано в области VH1, т. е. в положении короткого плеча F(ab')₃ (см. Фиг. 4). Все образцы F(ab')₃ после расщепления FabRICATOR (нерасщепленные, неочищенные и очищенные Fab) сохраняли свое связывание с тироглобулином (таблица 11). Сигнал связывания (погл. на 450 нм) был очень схож для нерасщепленных и расщепленных образцов. Этот Fab в трехвалентном усеченном мультимере находится в положении VH1, коротком плече, и не подвергается ферментативному расщеплению. В случае расщепления GingisKHAN все образцы (нерасщепленные, неочищенные и очищенные Fab) сохраняли свое связывание с тироглобулином. Сигнал связывания (погл. на 450 нм) был очень схож для нерасщепленных и расщепленных образцов.

15

Таблица 11. ИФА анализ связывания тироглобулина

Тироглобулин	PT23103p09					PT23103p15							Конц. очищенный образец (мкг/мл)
	Fabricator			Gingiskhan		Fabricator			Gingiskhan				
	Нерасщепленная	Неочищенная смесь	Элюирование	Неочищенная смесь	Элюирование	Нерасщепленная	Неочищенная смесь	Элюирование	Неочищенная смесь	Элюирование	PG1337p3 24	Контроль (-)	
Конц. IgG (мкг/мл)													
10	0,911	0,931	0,905	0,842	0,824	0,932	0,95	0,924	0,855	0,831	0,041	0,04	7,5
5	0,879	0,921	0,889	0,764	0,813	0,903	0,958	0,879	0,798	0,77	0,044	0,049	3,75
2,5	0,93	0,976	0,933	0,873	0,866	0,998	0,993	0,986	0,881	0,815	0,045	0,039	1,875
1,25	0,865	0,913	0,905	0,743	0,814	0,817	0,882	0,879	0,777	0,689	0,047	0,044	0,9375
0,625	0,854	0,904	0,886	0,691	0,711	0,873	0,852	0,849	0,677	0,577	0,051	0,042	0,46875
0,3125	0,74	0,835	0,76	0,525	0,609	0,786	0,813	0,786	0,529	0,392	0,04	0,041	0,234375
0,15625	0,587	0,616	0,582	0,344	0,419	0,619	0,634	0,604	0,387	0,238	0,043	0,039	0,1171875
0	0,43	0,515	0,404	0,243	0,288	0,469	0,512	0,467	0,244	0,169	0,038	0,039	0

Тироглобулин	PT23103p04					PT23103p8			PT23103p3					Конц. очищенный образец (мкг/мл)
	Fabricator		Gingiskhan			Fabricator		Gingiskhan	Fabricator		Gingiskhan			
	Нерасщепленная	Неочищенная смесь	Элюирование	Неочищенная смесь	Элюирование	Нерасщепленная	Неочищенная смесь	Неочищенная смесь	Нерасщепленная	Неочищенная смесь	Неочищенная смесь	Контроль (-)		
Конц. IgG (мкг/мл)														
10	0,916	0,939	0,909	0,833	0,829	0,928	0,958	0,849	0,945	0,943	0,854	0,038	7,5	
5	0,892	0,943	0,889	0,806	0,791	0,85	0,909	0,774	0,898	0,886	0,835	0,04	3,75	
2,5	0,88	0,904	0,866	0,793	0,774	0,873	0,92	0,787	0,897	0,86	0,826	0,038	1,875	
1,25	0,844	0,813	0,836	0,746	0,741	0,847	0,87	0,715	0,868	0,841	0,78	0,039	0,9375	
0,625	0,79	0,868	0,833	0,658	0,671	0,847	0,891	0,676	0,867	0,878	0,683	0,037	0,46875	
0,3125	0,704	0,806	0,714	0,523	0,501	0,751	0,798	0,548	0,739	0,763	0,621	0,037	0,234375	
0,15625	0,558	0,582	0,55	0,356	0,344	0,581	0,669	0,36	0,59	0,618	0,373	0,037	0,1171875	
0	0,397	0,474	0,382	0,234	0,223	0,456	0,512	0,239	0,423	0,472	0,252	0,035	0	

Тироглобулин	PT23103p11			PT23103p12				Конц. очищенный образец (мкг/мл)
	Fabricator		Gingiskhan	Fabricator		Gingiskhan		
	Нерасщепленная	Неочищенная смесь	Неочищенная смесь	Нерасщепленная	Неочищенная смесь	Неочищенная смесь	Контроль (-)	
Конц. IgG (мкг/мл)								
10	0,637	0,904	0,873	0,866	0,866	0,796	0,045	7,5
5	0,876	0,904	0,841	0,886	0,863	0,82	0,045	3,75
2,5	0,891	0,917	0,838	0,863	0,887	0,854	0,043	1,875
1,25	0,874	0,879	0,767	0,832	0,888	0,801	0,045	0,9375
0,625	0,822	0,866	0,7	0,753	0,801	0,698	0,045	0,46875
0,3125	0,717	0,751	0,538	0,652	0,691	0,542	0,042	0,234375
0,15625	0,597	0,586	0,389	0,477	0,598	0,401	0,049	0,1171875
0	0,419	0,501	0,273	0,34	0,445	0,273	0,04	0

Продукцию фрагментов также подтверждали методом SDS-PAGE-электрофореза. Как показано на Фиг. 5 (a–d), Fabricator сработал хорошо для создания фрагментов (Fab')₃ для каждого трехвалентного усеченного поливалентного мультимера. В случае PT23103p09 необработанные IgG (невосстановленные (NR) и восстановленные (R)) демонстрировали соответствующие полосы белков. Как в восстанавливающих, так и в невосстанавливающих условиях Fc в реакционных смесях для FabRICATOR не наблюдался. Вместо этого наблюдается полоса «полу-Fc», поскольку этот фермент разрезает ниже шарнирного цистеина, соединяющего две тяжелые цепи, с получением двух полипептидов CH₂-CH₃. Как неочищенные реакционные смеси для GingisKHAN, так и его пропущенные через колонку образцы (Fc) оказались восстановленными в невосстанавливающих гелях. Вероятно, это было вызвано мягким восстанавливающим агентом (2 ммоль цистеина), который присутствует в буфере для расщепления, что приводит к восстановлению дисульфидных связей при приготовлении образца для SDS-PAGE. В очищенных реакционных смесях для набора GingisKHAN присутствуют ожидаемые фрагменты (Фиг. 5a).

В случае PT23103p15 необработанный IgG (NR и R) также оказался пригодным. В образцах, полученных расщеплением FabRICATOR, присутствовали соответствующие полосы белков. Как в восстанавливающих, так и в невосстанавливающих условиях Fc в реакционных смесях для FabRICATOR не наблюдался. Вместо этого наблюдается полоса «полу-Fc», поскольку

этот фермент разрезает ниже шарнирного цистеина, соединяющего две тяжелые цепи, с
 получением двух полипептидов CH2-CH3. Как неочищенные реакционные смеси для
 GingisKHAN, так и его пропущенные через колонку образцы (Fc) оказались восстановленными в
 невосстанавливающих гелях. Вероятно, это было вызвано мягким восстанавливающим агентом
 5 (2 ммоль цистеина) в буфере для расщепления, что приводило к восстановлению дисульфидных
 связей при приготовлении образца для SDS-PAGE. В очищенной реакционной смеси для
 GingisKHAN, проанализированной в невосстанавливающем SDS-PAGE, наблюдалось 3 полосы в
 районе 50 кДа. Эти 3 полосы представляют три одиночных Fab из F(ab')₃ и проходят на разную
 высоту из-за частей линкера между двумя Fab из длинного плеча и частей шарниров, соединенных
 10 с этими Fab. В восстановительных условиях все белки прошли при ≈ 25 кДа на высоте
 полипептида VL-CL или VH-CH1. Способность к связыванию с фибриногеном в ИФА-анализе
 была утрачена как в неочищенной, так и в очищенной реакционной смеси, хотя способность к
 связыванию со столбнячным анатоксином и тироглобулином в твердофазном ИФА по-прежнему
 была интактной (Фиг. 5b).

15 В случае PT23103p04 пригодным оказался необработанный IgG (NR и R). Во всех
 образцах, полученных расщеплением FabRICATOR, присутствовали соответствующие полосы
 белков. В невосстанавливающих условиях Fc в реакционных смесях для FabRICATOR не
 наблюдался. Вместо этого появилась полоса «полу-Fc», поскольку этот фермент разрезает ниже
 шарнирного цистеина, соединяющего две тяжелые цепи, с получением двух полипептидов CH2-
 20 CH3. Как неочищенные реакционные смеси для GingisKHAN, так и его пропущенные через
 колонку образцы (Fc) оказались восстановленными в невосстанавливающих гелях. Вероятно, это
 было вызвано мягким восстанавливающим агентом (2 ммоль цистеина) в буфере для расщепления,
 что приводило к восстановлению дисульфидных связей при приготовлении образца для SDS-
 PAGE. В очищенных реакционных смесях для GingisKHAN присутствовали ожидаемые
 25 фрагменты (Фиг. 5c).

В случае PT23103p08, PT23103p03, PT23103p11 и PT23103p12 пригодным оказался
 необработанный IgG (NR и R). Во всех образцах, полученных расщеплением FabRICATOR,
 присутствовали соответствующие полосы белков. В невосстанавливающих условиях Fc в
 реакционных смесях для FabRICATOR не наблюдался. Вместо этого наблюдается полоса «полу-
 30 Fc», поскольку этот фермент разрезает ниже шарнирного цистеина, соединяющего две тяжелые
 цепи, что приводит к восстановлению дисульфидных связей при приготовлении образца для SDS-
 PAGE. Неочищенные реакционные смеси для GingisKHAN оказались восстановленными в
 невосстанавливающих гелях. Вероятно, это было вызвано мягким восстанавливающим агентом
 (2 ммоль цистеина) в буфере для расщепления, что приводило к восстановлению дисульфидных
 35 связей при приготовлении образца для SDS-PAGE. Для образцов PT23103p08 и PT23103p03 в
 реакционных смесях для FabRICATOR наблюдаются фрагменты F(ab')₃, как и ожидалось; при
 этом в реакционных смесях для GingisKHAN фрагмента 2Fab' не наблюдалось, вместо этого были
 идентифицированы полосы меньшей массы, примерно соответствующие одному фрагменту Fab.
 Для PT23103p11 и PT23103p12, расщепленных FabRICATOR, создается фрагмент F(ab')₃. Для

PT23103p11 и PT23103p12, расщепленных GingisKHAN, создается фрагмент 2Fab', как и ожидалось, хотя определенные компоненты при расщеплении GingisKHAN восстанавливаются (Фиг. 5d). Следует понимать, что восстановление можно легко уменьшить путем корректировки продолжительности реакции или используемых реагентов.

5

Таким образом, для реакционных смесей, расщепленных FabRICATOR, все образцы дали ожидаемые полосы белков. В невосстанавливающих условиях Fc в реакционных смесях, расщепленных FabRICATOR, не наблюдается. Вместо этого появилась полоса «полу-Fc» или «CH2-CH3», поскольку этот фермент разрезает ниже цистеинового мостика, соединяющего две

10

тяжелые цепи, с получением двух полипептидов CH2-CH3. Для расщепленных GingisKHAN реакционных смесей, в которых образуются фрагменты 2Fab', последовательность (KSCDK / THTCPPC) (SEQ ID NO: 92), присутствующая в некоторых линкерах, распознается GingisKHAN, и для следующих трехвалентных молекул линкерная последовательность аналогична.

15

PT23103p15 (линкер IgG1 H) KSCDK / THTSPPS (SEQ ID NO: 93)

PT23103p08 (линкер IgG1 MH) KSCDK / THTSPPS (SEQ ID NO: 93)

PT23103p03 (линкер IgG1 UH) KSCDK / THTSPPS (SEQ ID NO: 93)

20

Таким образом, вероятно, что 2Fab' в этих образцах были разрезаны на 2 отдельных Fab, что коррелирует с профилями SDS-PAGE. В данных образцах свободный линкер может препятствовать сайтам связывания, что может объяснить потерю связывания с фибриногеном.

25

Таким образом, FabRICATOR сработал хорошо, и способы, описанные в настоящем документе, позволяют получать усеченные трехвалентные мультимеры (F(ab')₃) в высокой концентрации, с сохранением специфического связывания, и установлено, что в усеченный мультиспецифический мультимер (F(ab')_n), имеющий общую легкую цепь в каждом Fab и соединенный посредством гетеродимеризации, такой как DEKK, может легко генерироваться

30

высоких концентрациях. В то время как генерация фрагментов 2Fab' посредством применения фермента GingisKHAN работала для линкеров, не имеющих модифицированной шарнирной последовательности IgG1 KSCDK / THTSPPS (SEQ ID NO: 93). Таким образом, используя идеи, описанные в настоящем документе, специалист в данной области техники может получить по существу чистый усеченный, поливалентный (и мультиспецифический) мультимер, в том числе с применением фермента FabRICATOR. В альтернативном варианте осуществления использование поливалентного мультимера, в котором дополнительные связывающие домены соединены с указанным мультимером посредством

35

линкера, в котором отсутствует мотив, распознаваемый GingisKHAN, согласно идеям, описанным в настоящем документе, позволяет специалисту в данной области техники получать смесь nFab' и Fab, где n равно двум или более, а nFab' состоит из тяжелой цепи, содержащей переменный домен, соединенный с одним или более дополнительными переменными доменами посредством линкера, описанного в настоящем документе, или соединенный с легкой цепью, которая соединена

с одним или более дополнительными переменными доменами посредством линкера, описанного в настоящем документе.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Поливалентный мультимер, содержащий три или более связывающих домена и
5 содержащий две или более областей тяжелой цепи, имеющих N-конец и С-конец, причем мультимер содержит шарнирную область, соединяющую две из указанных областей тяжелой цепи на С-конце.
2. Поливалентный мультимер по п. 1, содержащий три или более переменных областей
10 тяжелой цепи человека, причем две области соединены в указанной шарнирной области, причем указанное соединение содержит один или более дисульфидных мостиков.
3. Поливалентный мультимер по п. 1 или 2, в котором каждая область тяжелой цепи
15 содержит домен CH1.
4. Поливалентный мультимер по любому из пп. 1–3, в котором две или более областей тяжелой цепи содержат общую переменную область.
5. Поливалентный мультимер по любому из пп. 1–3, в котором указанные две или более
20 областей тяжелой цепи соединены с областью легкой цепи человека, причем указанная область легкой цепи представляет собой общую легкую цепь.
6. Поливалентный мультимер по п. 5, в котором общая легкая цепь содержит домен CL.
- 25 7. Поливалентный мультимер по п. 5 или 6, в котором общая легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 1.
8. Поливалентный мультимер по любому из пп. 1–7, в котором указанный мультимер
30 содержит три домена Fab (Fab1, Fab2, Fab3), каждый из которых содержит тяжелую цепь, содержащую переменную область (VH) и константную область (CH1), соединенную с легкой цепью, содержащей переменную область (VL) и константную область (CL), причем Fab2 и Fab3 соединены посредством линкера в переменной области тяжелой цепи Fab2 и домене CH1 Fab3, и при этом Fab1 и Fab3 соединены посредством шарнира, содержащего по меньшей мере две дисульфидные связи, присутствующие на С-конце тяжелой цепи Fab1 и тяжелой цепи Fab3.
35
9. Поливалентный мультимер по п. 8, в котором линкер, соединяющий Fab2 и Fab3, содержит последовательность SEQ ID NO: 2–25 или полипептид, имеющий идентичность по меньшей мере примерно 85% с указанными последовательностями SEQ ID NO: 2–25.

10. Поливалентный мультимер по любому из пп. 8–9, в котором аминокислотная последовательность линкера содержит последовательность природного происхождения или содержит последовательность, полученную из последовательности природного происхождения.
- 5 11. Поливалентный мультимер по п. 10, в котором линкер содержит последовательность средней шарнирной области.
12. Поливалентный мультимер по п. 10, в котором линкер содержит последовательности верхней и нижней шарнирной области.
- 10 13. Поливалентный мультимер по п. 10, в котором линкер содержит образующую спираль последовательность.
14. Поливалентный мультимер по любому из пп. 1–13, в котором вариабельная область двух или более областей тяжелой цепи специфически связывается с разными эпитопами.
- 15 15. Поливалентный мультимер по любому из пп. 1–14, в котором мультимер связывается с по меньшей мере двумя разными антигенами.
- 20 16. Способ получения поливалентного мультимера, включающий:
 - иммунизацию трансгенного животного, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую общую вариабельную область легкой цепи и перестроенную вариабельную область тяжелой цепи, двумя или более антигенами;
 - получение панели антител, содержащих указанную общую вариабельную область легкой цепи и перестроенные цепи тяжелой цепи антител, которые специфически связываются с указанными двумя или более антигенами;
 - интеграцию в клетку-хозяина нуклеиновой кислоты, кодирующей общую вариабельную область легкой цепи и две или более перестроенные тяжелые цепи, которые специфически связываются с указанными двумя или более антигенами, причем две из указанных перестроенных тяжелых цепей содержат константную область, содержащую домен СН1, СН2 и/или СН3, способный образовывать комплексы посредством образования дисульфидного мостика;
 - культивирование клетки-хозяина в условиях, обеспечивающих экспрессию интактного поливалентного мультимера, содержащего общую легкую цепь и две или более перестроенных тяжелых цепей, причем две из указанных перестроенных тяжелых цепей соединены посредством дисульфидного мостика между доменом СН1 и СН2 каждой из указанных двух перестроенных тяжелых цепей; и
 - обработку интактного поливалентного мультимера ферментом, который отщепляет область СН2 и/или СН3 от каждой из двух указанных перестроенных тяжелых цепей, сохраняя соединение

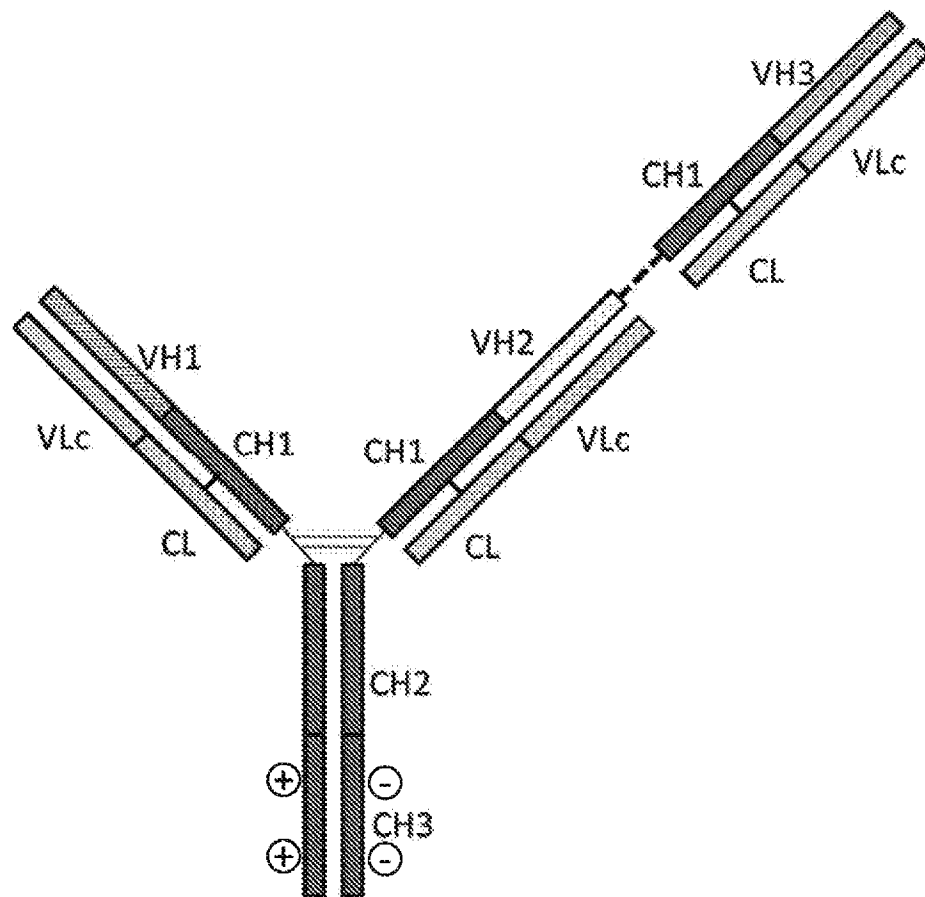
двух указанных перестроенных тяжелых цепей посредством дисульфидного мостика, с образованием поливалентного мультимера.

17. Способ по п. 16, в котором указанные две тяжелые цепи, содержащие константную область, содержащую домен СН1, СН2 и/или СН3, содержат комплементарные модификации для стимулирования гетеродимеризации.
18. Способ по п. 17, в котором модификации находятся в областях СН2 или СН3 иммуноглобулина.
19. Способ по п. 17 или 18, в котором комплементарные модификации содержат модификации типа выступ-во-впадину, электростатические модификации или модификации DEKK.
20. Способ по п. 19, в котором первая из указанных двух тяжелых цепей содержит первый домен СН3, который димеризуется со вторым доменом СН3 второй из указанных двух тяжелых цепей, причем первый СН3 из них содержит аминокислотный остаток лизина в положениях 351 и 366 или в соответствующих им положениях, а второй СН3 из них содержит аминокислотные остатки аспарагиновой кислоты в положении 351 и глутаминовой кислоты в положении 368 или в соответствующих им положениях.
21. Способ по любому из пп. 16–20, в котором общие переменные области кодируются нуклеиновой кислотой, полученной из, являющейся производной от или основанной на нуклеиновой кислоте, кодируемой трансгенным грызуном, содержащим нуклеотидную последовательность перестроенной переменной цепи в своей зародышевой линии.
22. Способ по любому из пп. 16–21, дополнительно включающий выделение поливалентного мультимера путем мечения фермента и удаления фермента с помощью аффинной колонки с антиметкой.
23. Поливалентный мультимер, который может быть произведен или получен способом по любому из пп. 16–22.
24. Клетка, которая содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих полипептиды, которые способны собираться в поливалентный мультимер по любому из пп. 1–15.
25. Фармацевтическая композиция, которая содержит поливалентный мультимер по любому из пп. 1–15 и фармацевтически приемлемый носитель и/или разбавитель.

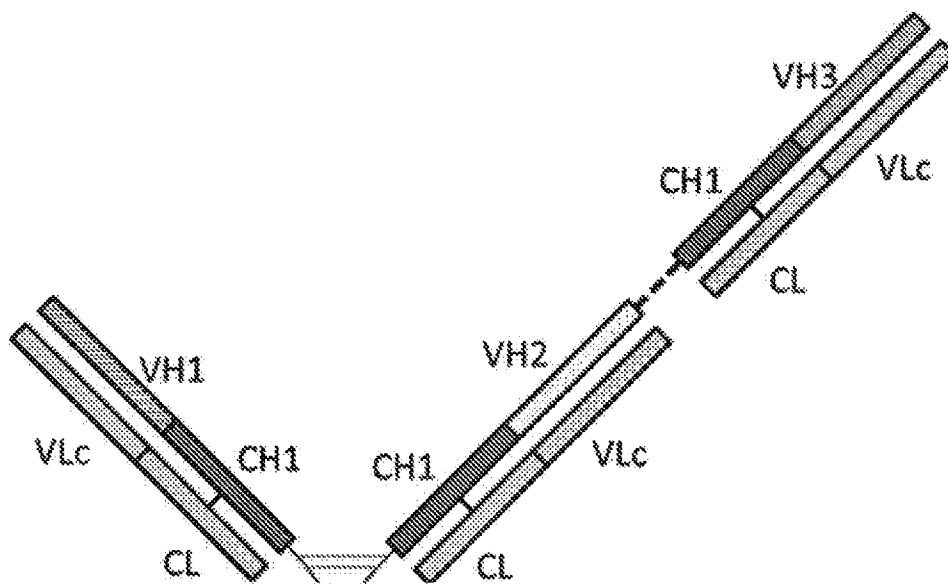
26. Способ лечения субъекта, страдающего от медицинского состояния, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества поливалентного мультимера по любому из пп. 1–15.

5

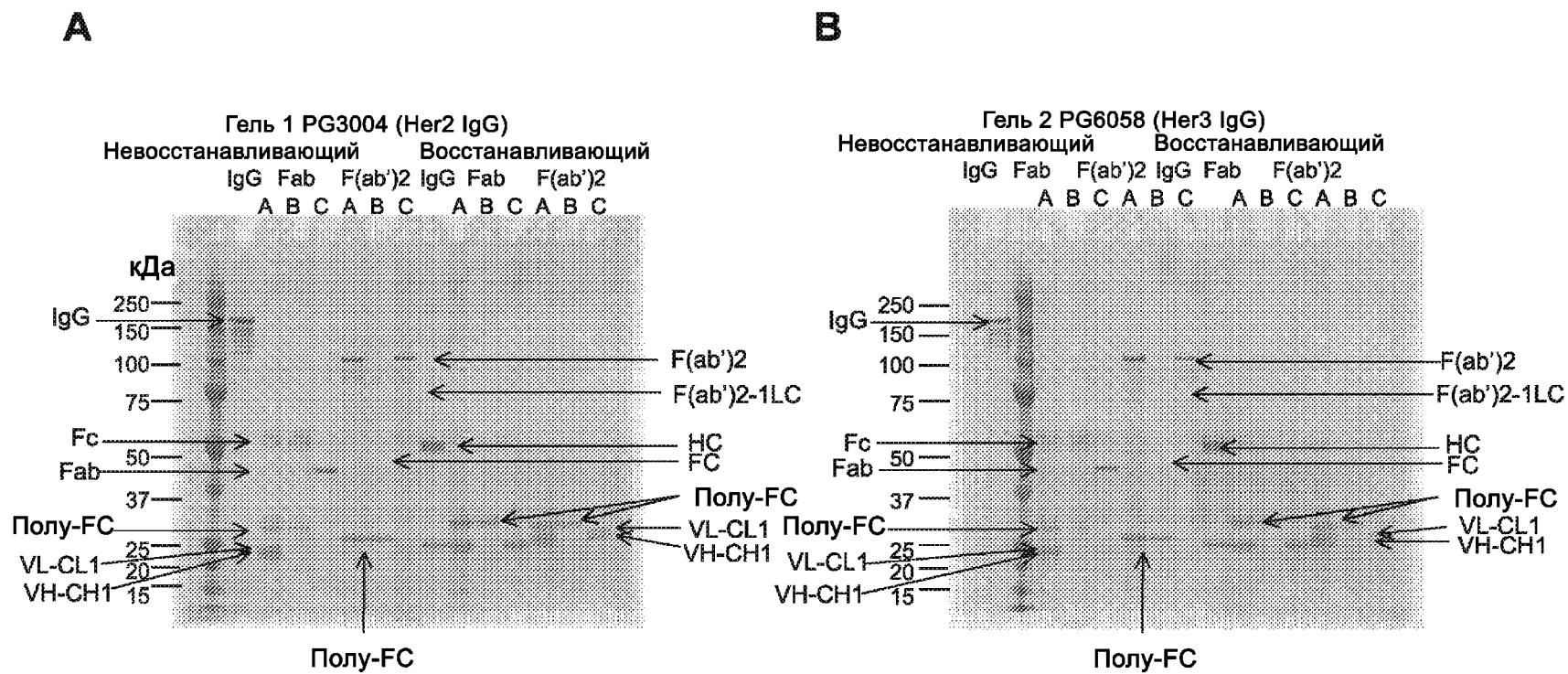
27. Поливалентный мультимер по любому из пп. 1–15 для применения в терапии.



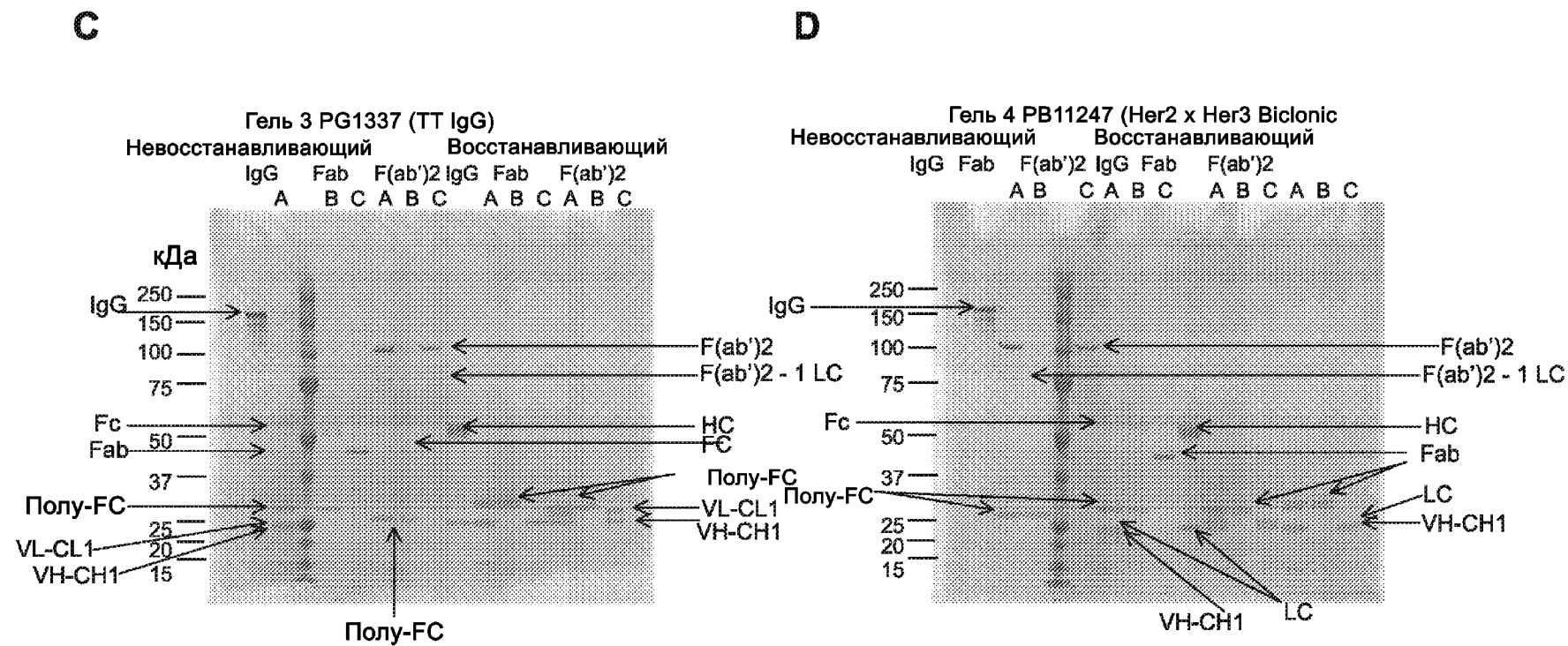
ФИГ. 1А



ФИГ. 1В

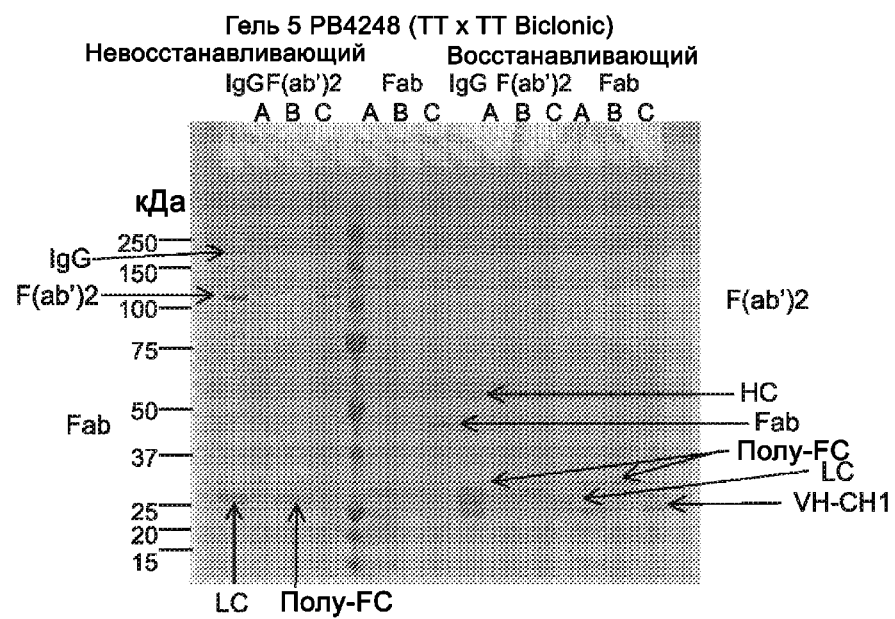


ФИГ. 2



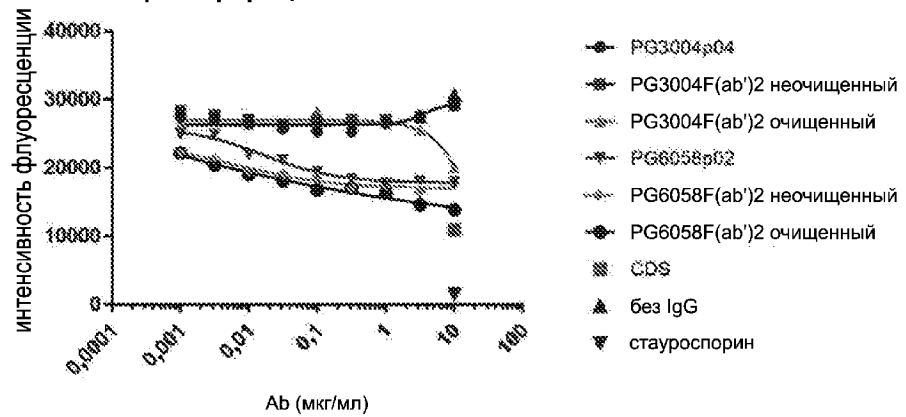
ФИГ. 2

E

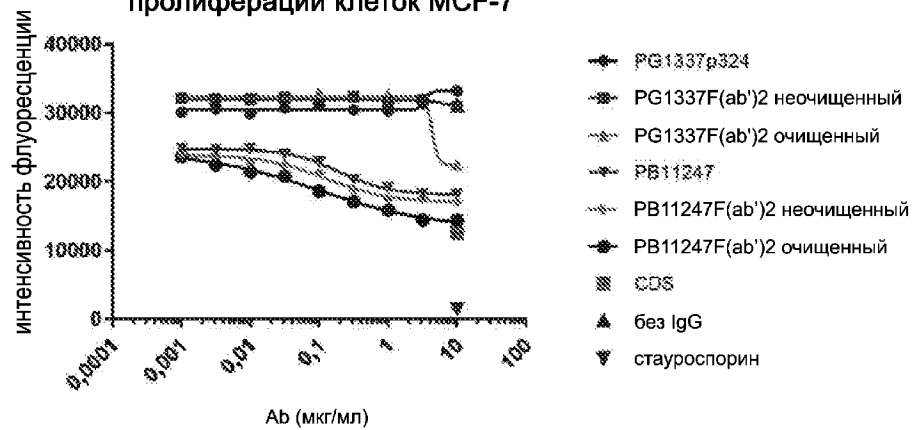


ФИГ. 2

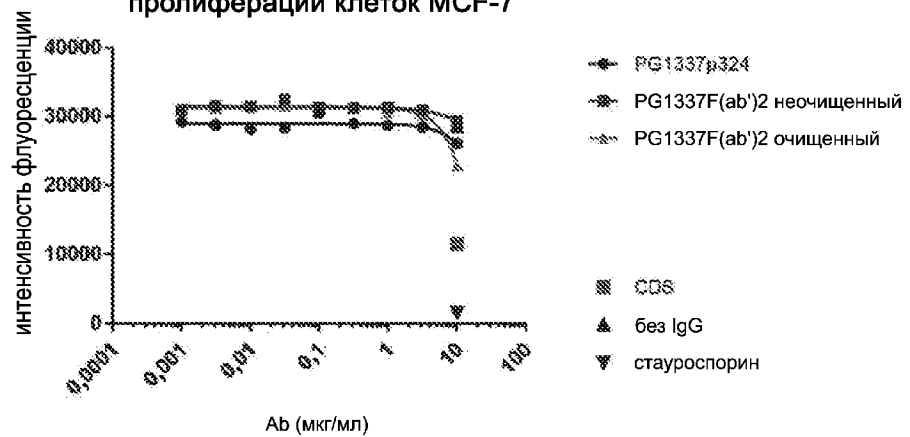
Ингибирование индуцированной херегулином пролиферации клеток MCF-7



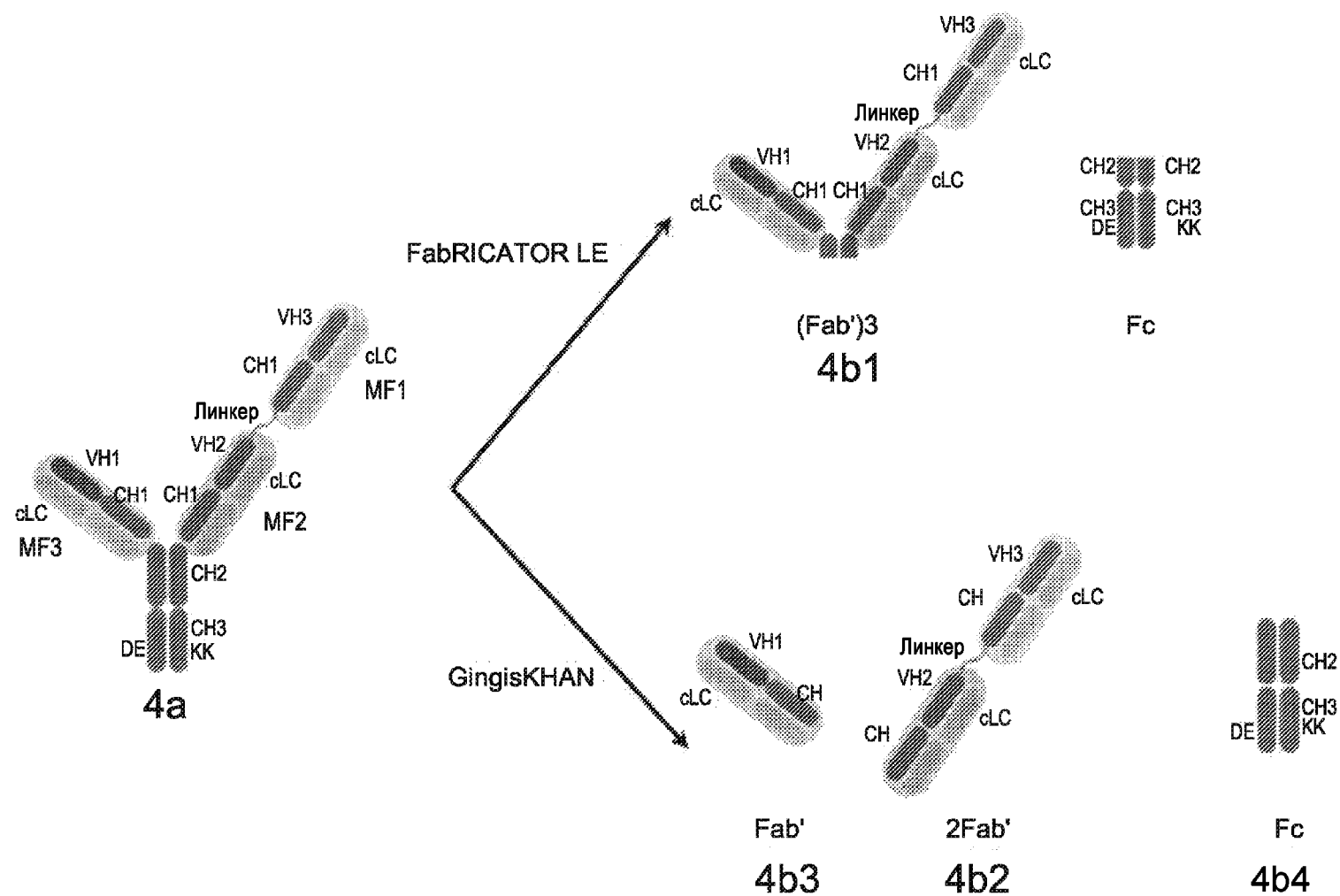
Ингибирование индуцированной херегулином пролиферации клеток MCF-7



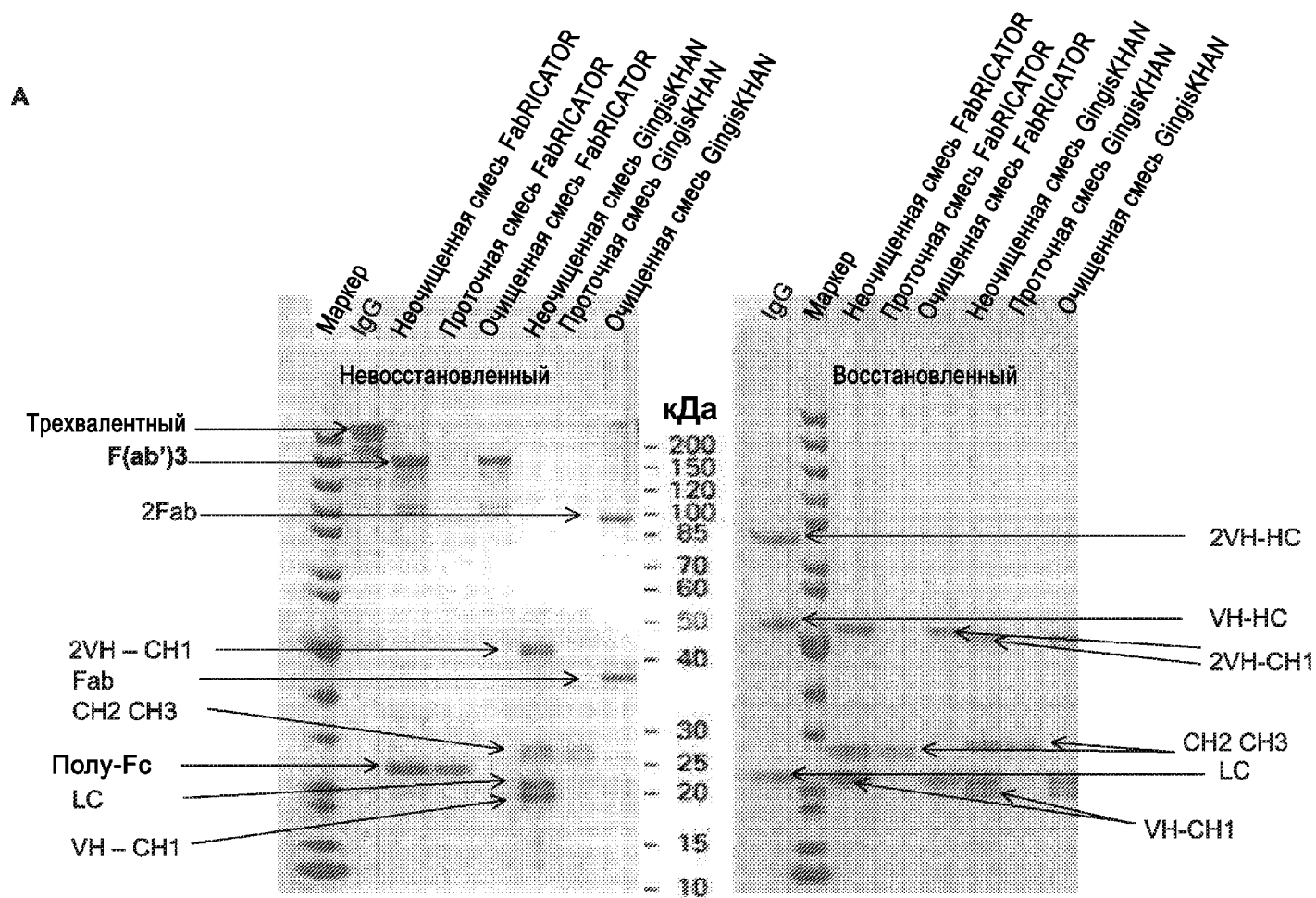
Ингибирование индуцированной херегулином пролиферации клеток MCF-7



ФИГ. 3

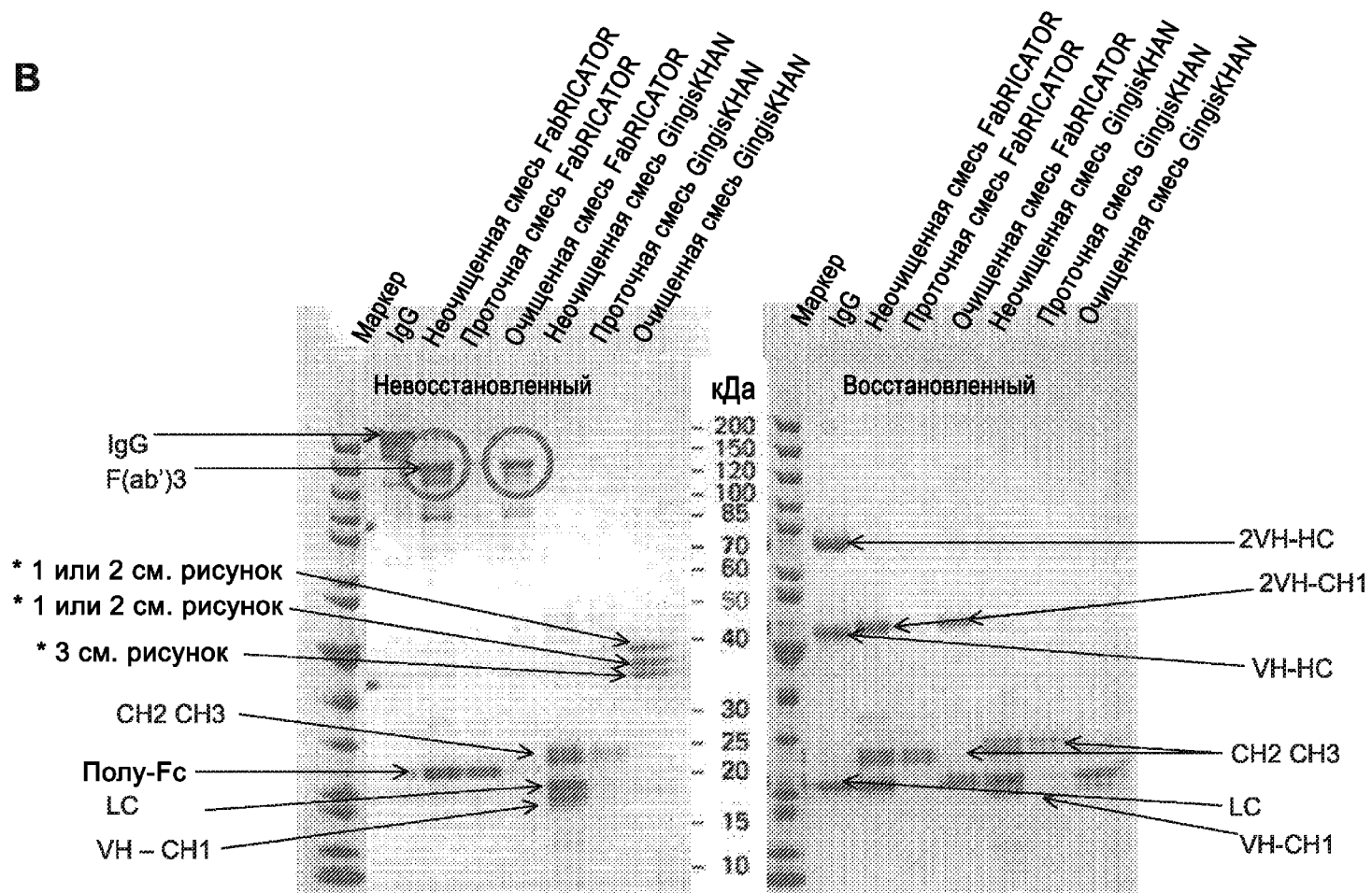


ФИГ. 4



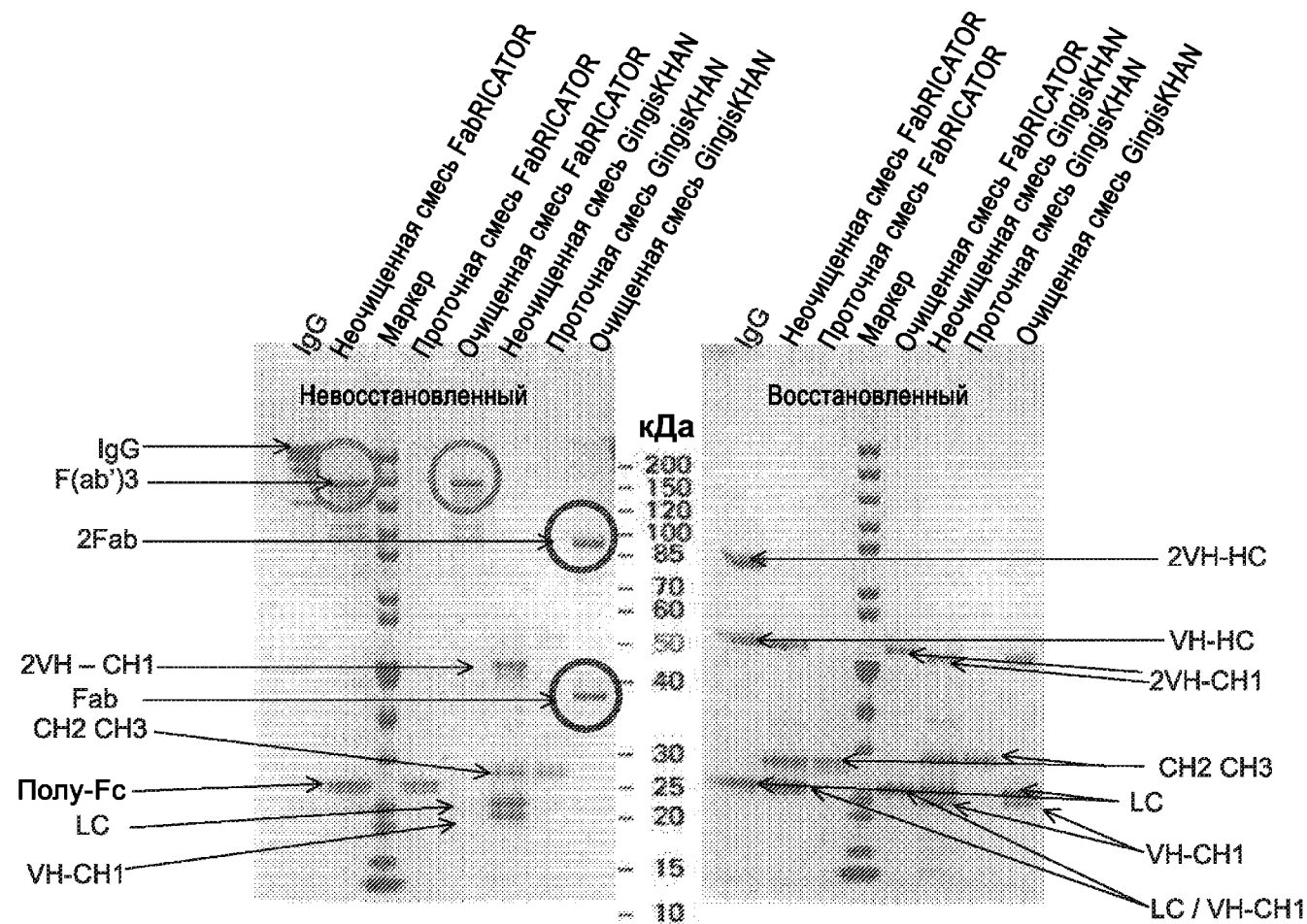
ФИГ. 5

B

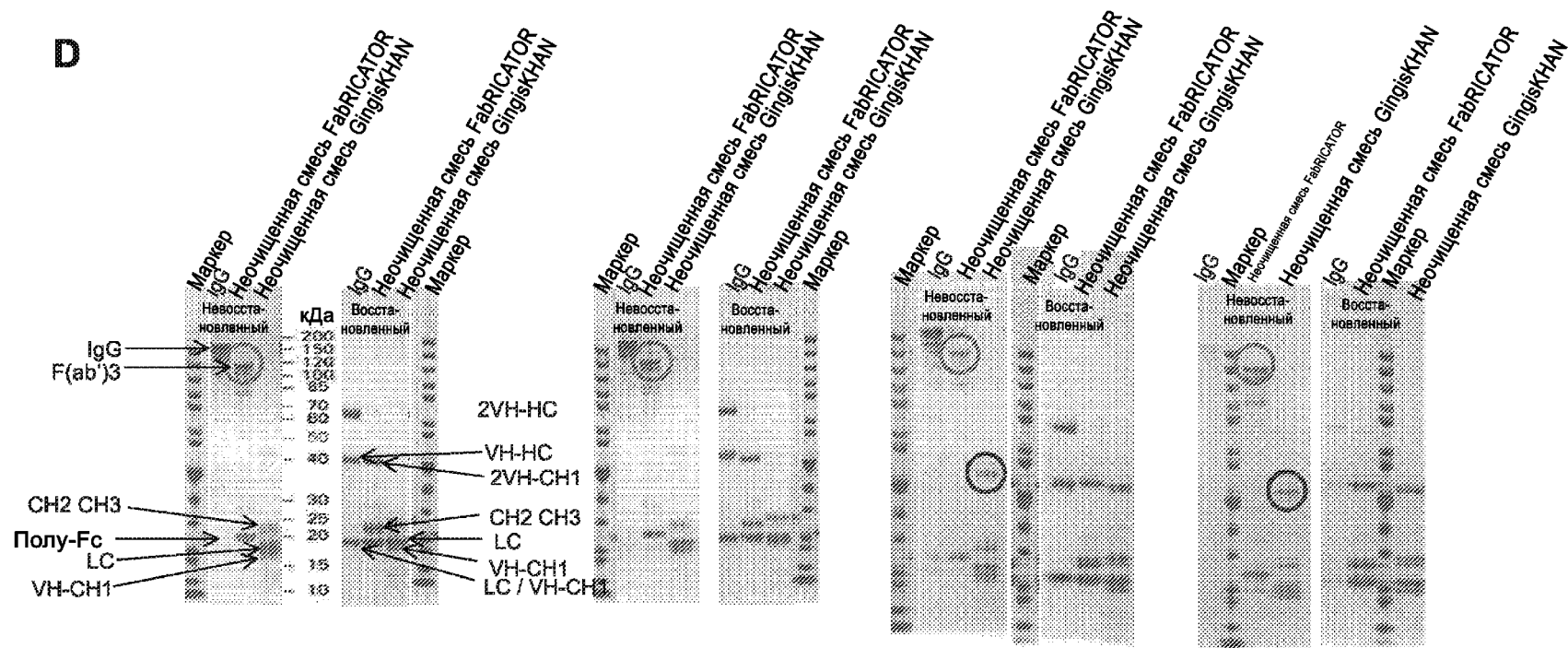


ФИГ. 5

С



ФИГ. 5



ФИГ. 5