

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039594**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.02.15

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

(21) Номер заявки
201891755

(22) Дата подачи заявки
2017.02.02

(54) **БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ КОНСТРУКЦИИ АНТИТЕЛ К ВСМА И CD3, ВОВЛЕКАЮЩИЕ Т-КЛЕТКИ**

(31) **62/290,831**

(32) **2016.02.03**

(33) **US**

(43) **2019.02.28**

(86) **PCT/EP2017/052202**

(87) **WO 2017/134134 2017.08.10**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЭМДЖЕН РИСЕРЧ (МЮНИК) ГМБХ
(DE); ЭМДЖЕН ИНК. (US)**

(56) **WO-A1-2013072406**

WO-A1-2014138449

WO-A1-2014122143

WO-A2-2012088461

S. HIPPE ET AL.: "A novel BCMA/CD3 bispecific T-cell engager for the treatment of multiple myeloma induces selective lysis in vitro and in vivo", LEUKEMIA, 13 January 2017 (2017-01-13), XP055338781, US, ISSN: 0887-6924, DOI: 10.1038/leu.2016.388, the whole document

(72) Изобретатель:

**Раум Тобиас, Мюнц Маркус, Броз
Йоханнес, Куфер Петер, Хоффманн
Патрик, Фридрих Маттиас, Раттель
Бенно, Богнер Памела, Вольф
Андреас, Помпе Корнелиус (DE)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В изобретении предложены биспецифические конструкции антител со специфической модальностью Fc, характеризующиеся содержанием первого домена, связывающегося с ВСМА, второго домена, связывающегося с внеклеточным эпитопом цепи CD3ε человека и/или Масаса (макака), и третьего домена, который является специфической модальностью Fc. Кроме того, в изобретении предложен полинуклеотид, кодирующий конструкцию антитела, вектор, содержащий этот полинуклеотид, клетки-хозяева, экспрессирующие указанную конструкцию, и содержащая вышеуказанное фармацевтическая композиция.

B1**039594****039594****B1**

Уровень техники

Полученные из биспецифических антител молекулы, такие как конструкции антител BiTE® (биспецифические антитела, вовлекающие Т-клетки), представляют собой рекомбинантные белковые конструкции, состоящие из двух гибко связанных полученных из антител связывающих доменов. Один связывающий домен конструкций антител BiTE® является специфическим в отношении выбранного опухолеассоциированного поверхностного антигена на клетках-мишенях; второй связывающий домен является специфическим в отношении CD3 - субъединицы комплекса Т-клеточного рецептора на Т-клетках. По своей конкретной структуре конструкции антител BiTE® исключительно подходят для временного соединения Т-клеток с клетками-мишенями и в то же время для того, чтобы эффективно активировать характерный для Т-клеток цитолитический потенциал против клеток-мишеней. Важной дополнительной разработкой первого поколения конструкций антител BiTE® (см. WO 99/54440 и WO 2005/040220), вошедших в клиническую практику в виде AMG 103 и AMG 110, было предоставление биспецифических конструкций антител, связывающихся с независимым от окружения эпитопом в N-конце цепи CD3ε (WO 2008/119567). Конструкции антител BiTE®, связывающиеся с этим выбранным эпитопом, не только демонстрируют межвидовую специфичность в отношении цепи CD3ε человека и *Callithrix jacchus*, *Saguinus oedipus* или *Saimiri sciureus*, но также благодаря распознаванию этого конкретного эпитопа (вместо ранее описанных эпитопов связывающих CD3 компонентов в биспецифических, вовлекающих Т-клетки, молекулах), не активируют Т-клетки неспецифическим образом в той же степени, которая наблюдается для предыдущих поколений вовлекающих Т-клетки антител. Это снижение активации Т-клеток было связано и коррелирует с меньшим или сниженным перераспределением Т-клеток у пациентов, причем последнее было связано с риском возникновения побочных явлений.

Описанные в WO 2008/119567 конструкции антител, вероятно, подвержены быстрому выведению из организма; следовательно, хотя они способны быстро достигать большинства частей тела, быстро производятся и легки в обращении, их *in vivo* применения могут быть ограничены их кратковременным присутствием *in vivo*. Вследствие короткого *in vivo* времени полужизни этой небольшой одноцепочечной молекулы для достижения терапевтического действия использовали длительное введение путем продолжительной внутривенной инфузии. Однако такие продолжительные внутривенные инфузии считаются неудобными для пациентов и, следовательно, в случае более удобных альтернативных лечебных подходов препятствуют выбору соединения, которое продемонстрировало большую эффективность в лечении соответствующего заболевания. Следовательно, в данной области техники существует потребность в биспецифических терапевтических средствах, которые сохраняют аналогичную терапевтическую эффективность, которые имеют формат, обеспечивающий простое производство, и которые имеют благоприятные фармакокинетические свойства, включая большее время полужизни.

Повышенное время полужизни в целом полезно в *in vivo* применениях иммуноглобулинов, в особенности антител, и конкретно фрагментов антител небольшого размера. Описанные в данной области техники подходы для достижения такого эффекта включают слияние небольшой биспецифической конструкции антитела с более крупными белками, которые предпочтительно не препятствуют терапевтическому действию BiTE®. Примеры таких дополнительных разработок биспецифических, вовлекающих Т-клетки, молекул включают биспецифические Fc-молекулы, например, описанные в US 2014/0302037, US 2014/0308285, WO 2014/144722, WO 2014/151910 и WO 2015/048272. Альтернативной стратегией является применение ЧСА, слитого с биспецифической молекулой или простое слияние связывающих пептидов человеческого альбумина (см., например, WO 2013/128027, WO 2014/140358).

BCMA (антиген созревания В-клеток, TNFRSF17, CD269) представляет собой трансмембранный белок, принадлежащий к суперсемейству рецепторов TNF. Установлено, что он является В-клеточным маркером, существенным для В-клеточного развития и гомеостаза (Schliemann et al., (2001) *Science* 293 (5537):2111-2114), благодаря своему предположительно существенному взаимодействию с его лигандами BAFF (фактор, активирующий В-клетки, также обозначаемый TALL-1 или TNFSF13B) и APRIL (индуцирующий пролиферацию лиганд).

Экспрессия BCMA ограничена В-клеточной линией дифференцировки и происходит, главным образом, на плазматических клетках и плазмабластах и, в некоторой степени, на В-клетках памяти, но практически отсутствует на периферических и наивных В-клетках. BCMA также экспрессируется на клетках множественной миеломы (ММ) и связан с лейкозом и лимфомами. Вместе с представителями своего семейства TACI (трансмембранный активатор и партнер лиганда циклофилина) и BAFF-R (рецептор фактора активации В-клеток, также известный как представитель суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей 13C) BCMA регулирует разные аспекты гуморального иммунитета, развитие и гомеостаз В-клеток. Экспрессия BCMA проявляется скорее на поздних стадиях дифференцировки В-клеток и способствует долгосрочной выживаемости плазмбластов и плазматических клеток в костном мозге. Направленное удаление гена BCMA у мышей приводит к существенному снижению числа долгоживущих плазматических клеток в костном мозге, что указывает на значимость BCMA для их выживаемости.

Наряду с этим открытием BCMA также поддерживает рост и выживаемость клеток множественной миеломы (ММ). Novak et al. Обнаружили, что линии клеток ММ и свежeweделенные клетки ММ экс-

прессируют BCMA и белок TACI на клеточной поверхности и имеют вариабельную экспрессию белка BAFF-R на клеточной поверхности (Novak et al., (2004) Blood 103(2): 689-694).

Множественная миелома (ММ) является вторым по счету наиболее распространенным гематологическим злокачественным образованием и составляет 2% от всех смертей вследствие рака. ММ является гетерогенным заболеванием, а его причиной являются, главным образом, хромосомные транслокации, помимо прочего t(11;14), t(4;14), t(8;14), del(13) и del(17). Пораженные ММ пациенты могут испытывать множество связанных с заболеванием симптомов вследствие инфильтрации костного мозга, разрушения костей, почечной недостаточности, иммунодефицита и психологической нагрузки, связанной с диагнозом рака.

Миелома является неизлечимым заболеванием, которое, как правило, отличается рецидивирующим течением, причем многим пациентам (пцт) необходимо несколько линий терапии. Результат лечения при РРММ остается неблагоприятным, в частности, после неудачного применения варианта лечения на основании ингибитора протеасом (PI)- и/или иммуномодулирующего препарата (IMiD).

ММ все еще является трудным для лечения заболеванием и остается неизлечимой. Как правило, она отличается рецидивирующим течением, причем многим пациентам необходимо несколько линий терапии. Становятся доступными такие варианты терапии, как химиотерапия и подходы на основании трансплантации стволовых клеток, которые имеют улучшенный уровень выживаемости, но часто несут нежелательные побочные явления. На данный момент двумя наиболее часто применяемыми вариантами лечения для пациентов с множественной миеломой являются комбинации стероидов, талидомида, леналидомида, бортезомиба или различных цитотоксических агентов и, для более молодых пациентов, высокодозные химиотерапевтические подходы с трансплантацией аутологичных стволовых клеток.

Большинство трансплантатов имеют аутологичный тип, т.е. используют собственные клетки пациентов. Было показано, что такие трансплантаты, хотя не обеспечивают полное излечение, продлевают жизнь отдельных пациентов. Их можно применять в качестве начального варианта терапии для впервые диагностированных пациентов или во время рецидива. Иногда, в случае отдельных пациентов, может рекомендоваться применение более одного трансплантата для нормального регулирования заболевания. Трансплантация стволовых клеток может не быть вариантом для многих пациентов из-за пожилого возраста, наличия серьезной болезни или других физических ограничений. Химиотерапия только частично регулирует множественную миелому и редко приводит к полной ремиссии. Результат лечения при рецидивной рефрактерной ММ остается неблагоприятным, в частности, после неудачного применения варианта лечения на основании ингибитора протеасом (PI)- и/или иммуномодулирующего препарата (IMiD). Таким образом, существует острая необходимость в новых, инновационных вариантах лечения.

Bellucci et al. (Blood, 2005 May 15;105(10)) определили BCMA-специфические антитела у пациентов с множественной миеломой после получения ими инфузии донорских лимфоцитов. Сыворотка этих пациентов была способна опосредовать BCMA-специфический клеточный лизис посредством АЗКЦ и КЗЦ, что было выявлено исключительно у пациентов с противоопухолевыми ответами (4/9), но не у пациентов без ответа (0/6). Авторы предполагают, что индукция BCMA-специфических антител способствует элиминации клеток миеломы и долгосрочной ремиссии пациентов. Ryan et al. (Mol. Cancer Ther. 2007 Nov; 6(11): 3009-18) сообщили о создании антагонистического специфического к BCMA антитела, которое предотвращает активацию NF-κB, которая связана с эффективным способствующим выживанию сигнальным путем в нормальных и злокачественных В-клетках.

Несмотря на факт, что BCMA; BAFF-R и TACI, т.е. рецепторы В-клеток, принадлежащие суперсемейству рецепторов TNF, и их лиганды BAFF и APRIL являются целью вариантов терапии в борьбе против рака и/или аутоиммунных нарушений, все еще существует необходимость в доступных дополнительных вариантах для лечения таких патологических состояний. Одним из таких подходов является вовлекающая Т-клетки молекула, полученная из биспецифического антитела.

Краткое описание сущности изобретения

Описанные в данной области техники продлевающие время полужизни форматы (HLE-форматы (от англ. "half-life extending")) биспецифических, вовлекающих Т-клетки, молекул, которые включают гетеро-Fc (также обозначаемый как гетеродимерный Fc, hetFc или hFc) формат и слияние человеческого сывороточного альбумина (также обозначаемого HSA или hALB), имеют индивидуальные недостатки, такие как неспецифическая активация Т-клеток, активация комплемента, нестабильность или фармакокинетический профиль, который не соответствует необходимому продлению времени полужизни молекул. Следовательно, целью данного изобретения является обеспечение продлевающего время полужизни формата BCMAxCD3 биспецифических, вовлекающих Т-клетки, молекул, в котором устранен по меньшей мере один и, конечно, предпочтительно более одного этих индивидуальных недостатков, наблюдаемых для молекул существующего уровня техники. Соответственно, в данном изобретении предложены конструкции антител со специфической модальностью Fc, характеризующейся содержанием первого домена, связывающегося с BCMA, второго домена, связывающегося с внеклеточным эпитопом цепи CD3ε человека и/или Масаса (макака), и третьего домена, что соответствует специфической модальности Fc. Кроме того, в изобретении предложены полинуклеотид, кодирующий конструкцию антитела, вектор,

содержащий этот полинуклеотид, клетки-хозяева, экспрессирующие конструкцию, и содержащая выше-указанное фармацевтическая композиция.

Описание фигур

Фиг. 1 - на фиг. 1a изображена диаграмма одного варианта реализации конструкции антитела согласно изобретению. На фиг. 1b изображена конструкция антитела с гетеродимерным Fc, а на фиг. 1c изображена конструкция X-тела, описанная в данной области техники. Указанные заряженные пары внесены для усиления гетеродимеризации. На фиг. 1d изображен продукт слияния конструкции антитела с человеческим сывороточным альбумином (HSA/hALB);

фиг. 2 - оценка мишень-независимой активации Т-клеток конструкциями антител мишень А HLE BiTE®. 2(a) конструкция антитела согласно изобретению в 48 ч анализе активации человеческими МПКК (3×); серийные разведения HLE BiTE® (начиная с 20 нМ; 1:5, 7×+контроль); без или с блокированием FcR [10 мг/мл huIgG (Kiovog, Baxter)]; FACS-измерение экспрессии CD69 и CD25 [не показано] на Т-клетках CD4⁺, CD8⁺. 2(b) гетеро-Fc конструкция антитела в 48 ч анализе активации человеческими МПКК и МПКК с отсутствием клеток CD14⁺/CD33⁺ (3×); серийные разведения HLE BiTE® (начиная с 20 нМ; 1:5, 7×+контроль); FACS-измерение экспрессии CD69 и CD25 [не показано] на Т-клетках CD4⁺, CD8⁺;

фиг. 3 - оценка мишень-независимой активации Т-клеток конструкциями антител HLE BiTE®. 3(a) конструкция антитела к мишени В согласно изобретению в 48 ч анализе активации человеческими МПКК (3); серийные разведения HLE BiTE® (начиная с 20 нМ; 1:5, 7×+контроль); без или с блокированием FcR [10 мг/мл huIgG (Kiovog, Baxter)]; FACS-измерение экспрессии CD69 и CD25 [не показано] на Т-клетках CD4⁺, CD8⁺. 3(b) конструкция антитела мишень В гетеро-Fc в 48 ч анализе активации человеческими МПКК и МПКК с отсутствием клеток CD14⁺/CD33⁺ (3×); серийные разведения HLE BiTE® (начиная с 20 нМ; 1:5, 7×+контроль); FACS-измерение экспрессии CD69 и CD25 [не показано] на Т-клетках CD4⁺, CD8⁺. 3(c) конструкция мишень В X-тело в 48 ч анализе активации человеческими МПКК и МПКК с отсутствием клеток CD14⁺/CD33⁺ (3×); серийные разведения HLE BiTE® (начиная с 20 нМ; 1:5, 7×+контроль); FACS-измерение экспрессии CD69 и CD25 [не показано] на Т-клетках CD4⁺, CD8⁺. 3(d)-3(f) выделенные МПКК от трех разных здоровых доноров-людей в течение 48 ч культивировали с возрастающими концентрациями биспецифических HLE-конструкций антител, специфических в отношении мишени В. Экспрессию маркера активации CD69 на Т-клетках CD4⁺ и CD8⁺ определяли методом анализа проточной цитометрии, используя конъюгированное с PE-Cy7 mAb, специфическое в отношении CD69;

фиг. 4 - связывание комплемента C1q Fc-слитыми конструкциями антител BiTE®. Fc-слитые конструкции антител BiTE® (одноцепочечный Fc BiTE® (треугольники), гетеро-Fc BiTE® (квадраты), каноническое BiTE® (круги)) наносили на планшет Maxisorp (в серийных разведениях) перед инкубацией с объединенной человеческой сывороткой и инкубацией с поликлональным мышинным антителом против человеческого C1q, визуализируемым козым антимышинным Fc-AP конъюгатом;

фиг. 5 - средние ФК-профили двух разных нацеленных на ВСМА конструкций антител BiTE® после введения одной дозы яванским макакам. В целях сравнения сывороточные концентрации нормализованы в отношении дозы к 15 мкг/кг и указаны в нмолях;

фиг. 6 - средние ФК-профили девяти разных конструкций антител BiTE®, каждая из которых слита с продлевающим время полужизни компонентом scFc. В целях сравнения сывороточные концентрации нормализованы в отношении дозы к 15 мкг/кг и указаны в нмолях;

фиг. 7 - биспецифические scFc-варианты D9F (SEQ ID NO: 105), T2G (SEQ ID NO: 106), D3L (SEQ ID NO: 107), T7I (SEQ ID NO: 108) и K6C (SEQ ID NO: 109). Предпочтительный третий домен конструкции антитела согласно данному изобретению представляет собой домен, описанный SEQ ID NO: 105;

фиг. 8 - определение методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) связывания с человеческим FcRn. Каждую из конструкций D9F, T2G, D3L, T7I и K6C исследовали в отношении их способности к связыванию с человеческим FcRn в ППР (Biacore) экспериментах. Максимальное связывание во время фазы инъекции измеряли для всех конструкций в соответствующих единицах ответа (ЕО), эквивалентных увеличению молекулярной массы на покрытом FcRn чипе CM5 вследствие наличия связанной конструкции. Все конструкции измеряли в дубликатах. Средние значения двойного определения приведены на фиг. 8А и 8В;

фиг. 9 - каждую из конструкций D9F, T2G, D3L, T7I и K6C и человеческое IgG1-к антитело MT201 исследовали в отношении их способности к связыванию с человеческим FcRn в ППР (Biacore) экспериментах. Максимальное связывание во время инъекционной фазы измеряли для всех конструкций в соответствующих единицах ответа (ЕО), эквивалентных увеличению молекулярной массы на покрытом FcRn чипе CM5 вследствие наличия связанной конструкции. Все конструкции измеряли в дубликатах. Приведены средние значения двойного определения, включая планки погрешностей, указывающие стандартное отклонение.

Подробное описание изобретения

Кроме существенного продления времени полужизни биспецифических конструкций антител согласно изобретению, слияние специфической модальности Fc также отвечает за неожиданное существенное воздействие на первый и второй связывающий домен конструкции антитела согласно изобретению. Таким образом, тогда как другие продлевающие время полужизни модальности вовлекающих Т-клетки конструкций антител демонстрируют индивидуальные предпочтительные черты, выбор представленной специфической модальности Fc позволяет обеспечивать биспецифические молекулы, которые, как правило, демонстрируют широкий спектр предпочтительных характеристик функционального молекулярного формата и, следовательно, делают возможной разработку перспективных фармацевтических композиций.

Таким образом, в данном изобретении предложена конструкция антитела, содержащая первый домен, который связывается с ВСМА; второй домен, который связывается с внеклеточным эпитопом цепи CD3ε человека и/или Масаса; и третий домен, который содержит два полипептидных мономера, каждый из которых содержит шарнирную область, домен CH2 и домен CH3, причем указанные два полипептидных мономера слиты друг с другом посредством пептидного линкера.

Термин "конструкция антитела" относится к молекуле, чья структура и/или функция основаны на структуре и/или функции антитела, например полноразмерной или цельной молекулы иммуноглобулина, и/или получены из переменных доменов тяжелой цепи (VH) и/или переменных доменов легкой цепи (VL) антитела или его фрагмента. Следовательно, конструкция антитела способна связываться со своей специфической мишенью или антигеном. Кроме того, связывающий домен конструкции антитела в соответствии с изобретением содержит минимальные структурные требования антитела, которые обеспечивают связывание мишени. Это минимальное требование может, например, определяться наличием по меньшей мере трех CDR легкой цепи (т.е. CDR1, CDR2 и CDR3 VL-области) и/или трех CDR тяжелой цепи (т.е. CDR1, CDR2 и CDR3 VH-области), предпочтительно всех шести CDR. Альтернативным подходом для определения минимальных структурных требований антитела является определение эпитопа антитела в пределах структуры специфической мишени, соответственно, белкового домена белка-мишени, составляющего область эпитопа (кластер эпитопа), или путем указания специфического антитела, конкурирующего за эпитоп определенного антитела. Антитела, на которых основаны конструкции в соответствии с изобретением, включают, например, моноклональные, рекомбинантные, химерные, деиммунизированные, гуманизированные и человеческие антитела.

Связывающий домен конструкции антитела в соответствии с изобретением может, например, содержать вышеуказанные группы CDR. Предпочтительно CDR находятся в каркасной области переменной области легкой цепи (VL) антитела и переменной области тяжелой цепи (VH) антитела; однако оно не обязано содержать их обе. Fd-фрагменты, например, имеют две VH-области и часто сохраняют в некоторой мере антигенсвязывающую функцию интактного антигенсвязывающего домена. Дополнительные примеры формата фрагментов антител, вариантов антител или связывающих доменов включают: (1) фрагмент Fab, моновалентный фрагмент, содержащий домены VL, VH, CL и CH1; (2) фрагмент F(ab')₂, бивалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанные дисульфидным мостиком в шарнирной области; (3) фрагмент Fd, содержащий два домена VH и домен CH1; (4) фрагмент Fv, содержащий домены VL и VH одного плеча антитела; (5) фрагмент dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), который содержит домен VH; (6) выделенную определяющую комплементарность область (CDR) и (7) одноцепочечный Fv (scFv), причем последний является предпочтительным (например, полученным из scFV-библиотеки). Примеры вариантов реализации конструкций антител в соответствии с изобретением описаны, например, в WO 00/006605, WO 2005/040220, WO 2008/119567, WO 2010/037838, WO 2013/026837, WO 2013/026833, US 2014/0308285, US 2014/0302037, WO 2014/144722, WO 2014/151910 и WO 2015/048272.

Также в рамках определения "связывающий домен" или "домен, который связывает" находятся фрагменты полноразмерных антител, такие как VH, VHH, VL, (s)dAb, Fv, Fd, Fab, Fab', F(ab')₂ или "r IgG" ("полуантитело"). Конструкции антител в соответствии с изобретением также могут содержать модифицированные фрагменты антител, также называемые вариантами антител, такие как scFv, di-scFv или bi(s)-scFv, scFv-Fc, scFv-молния, scFab, Fab₂, Fab₃, диатела, одноцепочечные диатела, tandemные диатела (Tandab's), tandemные di-scFv, tandemные tri-scFv, "мультидела", такие как триатела или тетрадела, и однодоменные антитела, такие как нанотела или антитела с одним переменным доменом, содержащие только один переменный домен, который может быть VHH, VH или VL, которые специфически связывают антиген или эпитоп независимо от других V-областей или доменов.

В контексте данного документа термины "одноцепочечный Fv", "одноцепочечные антитела" или "scFv" относятся к содержащим одну полипептидную цепь фрагментам антител, которые содержат переменные области как из тяжелой, так и из легкой цепей, но в которых отсутствуют константные области. В общем случае одноцепочечное антитело дополнительно содержит полипептидный линкер между VH- и VL-доменами, который обеспечивает возможность образования необходимой структуры, которая позволяет связывать антиген. Одноцепочечные антитела подробно обсуждаются Pluckthun в The

Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994). Известны различные способы создания одноцепочечных антител, включая описанные в патентах США № 4694778 и 5260203; публикации заявки на международный патент № WO 88/01649; Bird (1988) Science 242:423-442; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Ward et al. (1989) Nature 334:54454; Skerra et al. (1988) Science 242:1038-1041. В конкретных вариантах реализации одноцепочечные антитела также могут быть биспецифическими, мультиспецифическими, человеческими и/или гуманизированными и/или синтетическими.

Кроме того, определение термина "конструкция антитела" включает моновалентные, бивалентные и поливалентные/мультивалентные конструкции и, следовательно, биспецифические конструкции, специфически связывающиеся только с двумя антигенными структурами, а также полиспецифические/мультиспецифические конструкции, которые специфически связывают более двух антигенных структур, например, три, четыре или более, посредством разных связывающих доменов. Более того, определение термина "конструкция антитела" включает молекулы, состоящие из только одной полипептидной цепи, а также молекулы, состоящие из более чем одной полипептидной цепи, причем цепи могут быть идентичными (гомодимеры, гомотримеры или гомоолигомеры) или разными (гетеродимеры, гетеротримеры или гетероолигомеры). Примеры определенных выше антител и их вариантов или производных описаны, помимо прочего, в Harlow and Lane, Antibodies a laboratory manual, CSHL Press (1988) and Using Antibodies: a laboratory manual, CSHL Press (1999), Kontermann and Dübел, Antibody Engineering, Springer, 2nd ed. 2010 и Little, Recombinant Antibodies for Immunotherapy, Cambridge University Press 2009.

В контексте данного документа термин "биспецифический" относится к конструкции антитела, которая является "по меньшей мере, биспецифической", т.е. содержит по меньшей мере первый связывающий домен и второй связывающий домен, причем первый связывающий домен связывается с одним антигеном или мишенью (в данном случае: BCMA), второй связывающий домен связывается с другим антигеном или мишенью (в данном случае: CD3). Соответственно, конструкции антител в соответствии с изобретением имеют специфичность в отношении по меньшей мере двух разных антигенов или мишеней. Например, первый домен предпочтительно не связывается с внеклеточным эпитопом CD3ε одного или более видов, описанных в данном документе. Термин "антиген-мишень клеточной поверхности" относится к антигенной структуре, экспрессируемой клеткой, которая находится на клеточной поверхности, т.е. доступна для описанной в данном документе конструкции антитела. Он может являться белком, предпочтительно внеклеточной частью белка, или углеводной структурой, предпочтительно углеводной структурой белка, такой как гликопротеин. Предпочтительно он является опухолевым антигеном. Термин "биспецифическая конструкция антитела" согласно изобретению также включает мультиспецифические конструкции антител, такие как триспецифические конструкции антител, содержащие три связывающих домена, или конструкции, имеющие более трех (например, четыре, пять, ...) специфичностей.

Учитывая, что конструкции антител в соответствии с изобретением являются (по меньшей мере) биспецифическими, они не присутствуют в природе и заметно отличаются от продуктов природного происхождения. Следовательно, "биспецифическая" конструкция антитела или иммуноглобулина представляет собой искусственное гибридное антитело или иммуноглобулин, имеющее по меньшей мере два разных связывающих участка с разной специфичностью. Биспецифические конструкции антител можно получать различными способами, включая слияние гибридом или связывание фрагментов Fab'. См., например, Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990).

По меньшей мере два связывающих домена и переменные домены (VH/VL) конструкции антитела согласно данному изобретению могут содержать или не содержать пептидные линкеры (спейсерные пептиды). Термин "пептидный линкер" в соответствии с настоящим изобретением включает аминокислотную последовательность, посредством которой связаны между собой аминокислотные последовательности одного (переменного и/или связывающего) домена и другого (переменного и/или связывающего) домена конструкции антитела. Пептидные линкеры также можно использовать для слияния третьего домена с другими доменами конструкции антитела согласно изобретению. Важной технической характеристикой такого пептидного линкера является то, что у него отсутствует полимеризационная активность. К подходящим пептидным линкерам относятся описанные в патентах США 4751180 и 4935233 или WO 88/09344. Пептидные линкеры также можно использовать для присоединения других доменов или модулей или областей (таких как продлевающие время полужизни домены) к конструкции антитела согласно изобретению.

Конструкции антител согласно изобретению предпочтительно являются "in vitro созданными конструкциями антител". Этот термин относится к конструкции антитела в соответствии с вышеприведенным определением, в которой вся или часть переменной области (например, по меньшей мере одна CDR) создана посредством отбора неиммунной клетки, например in vitro фагового дисплея, белкового чипа или любого другого способа, в котором кандидатные последовательности можно исследовать в отношении их способности связываться с антигеном.

Предпочтительно этот термин исключает последовательности, созданные исключительно путем генетической перестройки в иммунной клетке животного. "Рекомбинантное антитело" представляет собой антитело, созданное посредством применения технологии рекомбинантных ДНК или генетической инженерии.

В контексте данного документа термин "моноклональное антитело" (mAb) или моноклональная конструкция антитела относится к антителу, полученному из популяции, по существу, гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными за исключением возможных природных мутаций и/или посттрансляционных модификаций (например, изомеризации, амидирования), которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифическими, будучи направленными против одного антигенного участка или детерминанты на антигене, в противоположность препаратам традиционных (поликлональных) антител, которые, как правило, содержат разные антитела, направленные против разных детерминант (или эпитопов). Кроме своей специфичности, преимуществом моноклональных антител является то, что их синтезируют с помощью гибридомной культуры, следовательно, они не содержат примесей других иммуноглобулинов. Обстоятельство "моноклональное" указывает на характер антитела, как полученного из, по существу, гомогенной популяции антител, и его не следует воспринимать как требующее получения антитела каким-либо конкретным способом.

Для получения препарата моноклональных антител можно использовать любой способ, обеспечивающий получение антител с помощью стабильных культур клеточных линий. Например, предназначенные для применения моноклональные антитела можно создавать методом гибридомы, впервые описанным Koehler et al., *Nature*, 256: 495 (1975), или можно создавать методами рекомбинантных ДНК (см., например, патент США № 4816567). Примеры дополнительных методик для получения человеческих моноклональных антител включают методику триомы, методику человеческой В-клеточной гибридомы (Kozbor, *Immunology Today* 4 (1983), 72) и методику ВЭБ-гибридомы (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. (1985), 77-96).

После этого можно проводить скрининг гибридом стандартными методами, таким как иммуноферментный анализ (ИФА) и анализ методом поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore™), для выявления одной или более гибридом, которые вырабатывают антитело, которое специфически связывается с конкретным антигеном. В качестве иммуногена можно использовать любую форму соответствующего антигена, например рекомбинантный антиген, природные формы, любые их варианты или фрагменты, а также их антигенные пептиды. Поверхностный плазмонный резонанс, применяемый в системе BIAcore, можно использовать для повышения активности фаговых антител, которые связываются с эпитопом антигена-мишени клеточной поверхности (Schier, *Human Antibodies Hybridomas* 7 (1996), 97-105; Malmberg, *J. Immunol. Methods* 183 (1995), 7-13).

Другой типовой метод получения моноклональных антител включает скрининг библиотек белковой экспрессии, например библиотек фагового дисплея или рибосомного дисплея. Фаговый дисплей описан, например, в Ladner et al., патенте США № 5223409; Smith (1985) *Science* 228:1315-1317, Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991) и Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991).

Кроме применения дисплейных библиотек соответствующий антиген можно использовать для иммунизации отличного от человека животного, например грызуна (такого как мышь, хомяк, кролик или крыса). В одном варианте реализации изобретения отличное от человека животное содержит по меньшей мере часть гена человеческого иммуноглобулина. Например, можно сконструировать мышинные штаммы с дефицитом выработки мышинного антитела с крупными фрагментами локусов человеческого Ig (иммуноглобулина). Используя технологию гибридомы, можно получать и проводить отбор антиген-специфических моноклональных антител, полученных из генов с необходимой специфичностью. Смотрите, например, XENOMOUSE™, Green et al. (1994) *Nature Genetics* 7:13-21, US 20030070185, WO 96/34096 и WO 96/33735.

Моноклональное антитело также можно получить от отличного от человека животного, а затем модифицировать, например гуманизировать, деиммунизировать, сделать химерными и т.д., используя известную в данной области техники технологию рекомбинантных ДНК. Примеры модифицированных конструкций антител включают гуманизированные варианты нечеловеческих антител, антитела "с созревшей аффинностью" (см., например, Hawkins et al. *J. Mol. Biol.* 254, 889-896 (1992) и Lowman et al., *Biochemistry* 30, 10832-10837 (1991)) и мутантные антитела с измененной(ыми) эффекторной(ыми) функцией(ями) (см., например, патент США 5648260, Kontermann and Dübel (2010), loc. cit. и Little (2009), loc. cit.).

В иммунологии созревание аффинности - это процесс, посредством которого В-клетки вырабатывают антитела с повышенной аффинностью в отношении антигена во время иммунного ответа. При повторном воздействии такого же антигена организм-хозяин будет вырабатывать антитела со все большей аффинностью. Как и природный прототип, *in vitro* созревание аффинности основано на принципах мутации и отбора. *In vitro* созревание аффинности успешно применяли для оптимизации антител, конструкций антител и фрагментов антител. Случайные мутации внутри CDR вводят, используя облучение, химические мутагены или ПЦР с внесением ошибок. Кроме того, генетическое разнообразие можно повышать путем перестановки цепей. Два или три цикла мутации и отбора с применением дисплейных методов, таких как фаговый дисплей, обычно приводят к получению фрагментов антител с аффинностью в узком наномолярном диапазоне.

Предпочтительный тип вариации конструкций антител с аминокислотными заменами включает за-

мещение одного или более остатков гипервариабельной области родительского антитела (например, гуманизированного или человеческого антитела). В общем случае полученные в результате варианты, отобранные для дополнительной разработки, должны иметь улучшенные биологические свойства относительно родительского антитела, из которого они получены. Удобный путь создания таких замещающих вариантов включает созревание аффинности с применением фагового дисплея. Вкратце, мутируют несколько участков гипервариабельной области (например, 6-7 участков) для создания всех возможных аминокислотных замен в каждом участке. Созданные таким образом варианты антител отображаются моновалентным образом из частиц нитевидного фага в виде продуктов слияния с продуктом гена M13 , упакованных в каждой частице. Затем проводят скрининг отображенных фагом вариантов в отношении их биологической активности (например, аффинности связывания), как описано в данном документе. Чтобы определить кандидатные участки гипервариабельной области для проведения модификации, можно проводить аланин-сканирующий мутагенез для определения остатков гипервариабельной области, которые вносят существенный вклад в связывание антигена. В альтернативном или дополнительном варианте может быть полезно проанализировать кристаллическую структуру комплекса антиген-антитело для определения точек контакта между связывающим доменом и, например, человеческим ВСМА. Такие контактные остатки и соседние остатки являются кандидатами для проведения замен в соответствии с применяемыми в данном документе методиками. После создания таких вариантов панель вариантов подвергают описанному в данном документе скринингу, а антитела с превосходящими свойствами в одном или более релевантном анализе отбирают для дополнительной разработки.

Моноклональные антитела и конструкции антител согласно данному изобретению включают, в частности, "химерные" антитела (иммуноглобулины), в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична с соответствующими последовательностями в антителах, полученных от конкретного вида или принадлежащих конкретному классу или подклассу антител, тогда как остаток цепи(ей) идентичен или гомологичен соответствующим последовательностям в антителах, полученных от другого вида или принадлежащих другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител, в том случае, если они проявляют необходимую биологическую активность (патент США № 4816567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)). Представляющие в данном случае интерес химерные антитела включают "приматизированные" антитела, содержащие антигенсвязывающие последовательности вариабельного домена, полученные от отличного от человека примата (например, мартишки Старого Света, обезьяны и т.д.), и человеческие последовательности константной области. Было описано множество подходов для создания химерных антител. См., например, Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851, 1985; Takeda et al., Nature 314:452, 1985; Cabilly et al., U.S. Patent № 4816567; Boss et al., патент США № 4816397; Tanaguchi et al., EP 0171496; EP 0173494; и GB 2177096.

Антитело, конструкцию антитела, фрагмент антитела или вариант антитела также можно модифицировать путем специального удаления человеческих Т-клеточных эпитопов (метод, называемый "деиммунизацией") способами, описанными, например, в WO 98/52976 или WO 00/34317. Вкратце, вариабельные домены тяжелой и легкой цепи антитела можно проанализировать в отношении наличия пептидов, которые связываются с ГКГС класса II; эти пептиды представляют потенциальные Т-клеточные эпитопы (по определению в WO 98/52976 и WO 00/34317). Для выявления потенциальных Т-клеточных эпитопов можно применять подход компьютерного моделирования, называемый "пептидным протягиванием", и, дополнительно, можно проводить поиск по базе данных пептидов, связывающих человеческий ГКГС класса II, в отношении мотивов, присутствующих в последовательностях VH и VL, как описано в WO 98/52976 и WO 00/34317. Эти мотивы связываются с любым из 18 основных DR-аллотипов ГКГС класса II и, таким образом, составляют потенциальные Т-клеточные эпитопы. Выявленные потенциальные Т-клеточные эпитопы можно устранить посредством замены небольшого количества аминокислотных остатков в вариабельных доменах или, предпочтительно, посредством одиночных аминокислотных замен. Как правило, осуществляют консервативные замены. Часто, но не исключительно, может использоваться аминокислота, обычно присутствующая в данной позиции в последовательностях антител человеческой зародышевой линии. Последовательности человеческой зародышевой линии описаны, например, в Tomlinson et al. (1992) J. Mol. Biol. 227:776-798; Cook G.P. et al. (1995) Immunol. Today Vol. 16 (5): 237-242; и Tomlinson et al. (1995) EMBO J. 14: 14:4628-4638. Директория V BASE представляет исчерпывающую директорию последовательностей вариабельных областей человеческого иммуноглобулина (составлена Tomlinson L.A. et al. MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK). Эти последовательности можно использовать в качестве источника человеческих последовательностей, например каркасных областей или CDR. Также можно использовать консенсусные человеческие каркасные области, например, описанные в патенте США № 6300064.

"Гуманизированные" антитела, конструкции антител, их варианты или фрагменты (такие как Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ или другие антигенсвязывающие подпоследовательности антител) представляют собой антитела или иммуноглобулины большей частью человеческих последовательностей, которые содержат(а) минимальную(ые) последовательность(и), полученную(ые) из нечеловеческого иммуноглобулина. Большой частью гуманизированные антитела являются человеческими иммуноглобулинами (реципиентное антитело), в которых остатки из гипервариабельной области (также CDR) реципиента замещены ос-

татами из гипервариабельной области нечеловеческого (например, грызуна) вида (донорское антитело), такого как мышь, крыса, хомяк или кролик, имеющими необходимую специфичность, аффинность и емкость. В некоторых случаях остатки Fv каркасной области (FR) человеческого иммуноглобулина замещены соответствующими нечеловеческими остатками. Кроме того, в контексте данного документа "гуманизированные антитела" также могут содержать остатки, не присущие ни реципиентному антителу, ни донорскому антителу. Эти модификации проводят для дополнительного улучшения и оптимизации характеристик антитела. Гуманизированное антитело также может содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, из человеческого иммуноглобулина. Дополнительные подробности смотрите в Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Reichmann et al., *Nature*, 332: 323-329 (1988); и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992).

Гуманизированные антитела или их фрагменты можно создавать, замещая последовательности вариабельного домена Fv, которые не принимают прямого участия в связывании антигена, эквивалентными последовательностями из человеческих вариабельных доменов Fv. Типовые способы создания гуманизированных антител или их фрагментов предложены в Morrison (1985) *Science* 229:1202-1207; в Oi et al. (1986) *BioTechniques* 4:214; и в US 5585089; US 5693761; US 5693762; US 5859205; и US 6407213. Эти способы включают выделение, обработку и экспрессию нуклеотидных последовательностей, которые кодируют все или часть вариабельных доменов Fv иммуноглобулина по меньшей мере из одной из тяжелой или легкой цепи. Такие нуклеиновые кислоты можно получить из гибридомы, вырабатывающей антитело против заданной мишени, как описано выше, а также из других источников. Затем рекомбинантную ДНК, кодирующую молекулу гуманизированного антитела, можно клонировать в соответствующий экспрессионный вектор.

Гуманизированные антитела также можно получать, используя трансгенных животных, таких как мыши, которые экспрессируют гены человеческой тяжелой и легкой цепи, но не способны экспрессировать эндогенные гены тяжелой и легкой цепи мышинового иммуноглобулина. Winter описывает типовой способ прививания CDR, который можно использовать для получения описанных в данном документе гуманизированных антител (патент США № 5225539). Все CDR конкретного человеческого антитела могут быть замещены по меньшей мере частью нечеловеческой CDR или только некоторые CDR могут быть замещены нечеловеческими CDR. Необходимо лишь заменить то количество CDR, которое требуется для связывания гуманизированного антитела с заданным антигеном.

Гуманизированное антитело можно оптимизировать путем внесения консервативных замен, замен консенсусной последовательности, замен зародышевой линии и/или обратных мутаций. Такие измененные молекулы иммуноглобулина можно создавать с помощью любой из нескольких методик, известных в данной области техники (например, Teng et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80: 7308-7312, 1983; Kozbor et al., *Immunology Today*, 4: 7279, 1983; Olsson et al., *Meth. Enzymol.*, 92: 3-16, 1982, и EP 239 400).

Термин "человеческое антитело", "человеческая конструкция антитела" и "человеческий связывающий домен" включает антитела, конструкции антител и связывающие домены, имеющие области антитела, такие как вариабельные и константные области или домены, которые, по существу, соответствуют известным в данной области техники последовательностям иммуноглобулина человеческой зародышевой линии, включая, например, описанные в Kabat et al. (1991) (*loc. cit.*). Человеческие антитела, конструкции антител или связывающие домены согласно изобретению могут содержать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина человеческой зародышевой линии (например, мутации, внесенные посредством случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или посредством соматической мутации *in vivo*), например, в CDR, и, в частности, в CDR3. Человеческие антитела, конструкции антител или связывающие домены могут содержать по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять или более позиций, замещенных аминокислотным остатком, не кодируемым последовательностью иммуноглобулина человеческой зародышевой линии. При этом в контексте данного документа определение человеческих антител, конструкций антител и связывающих доменов также подразумевает "полностью человеческие антитела", которые содержат только искусственно и/или генетически не измененные человеческие последовательности антител, такие как те, которые можно получить, используя технологии или системы, такие как Xenomouse. Предпочтительно "полностью человеческое антитело" не содержит аминокислотных остатков, не кодируемых последовательностями иммуноглобулина человеческой зародышевой линии.

В некоторых вариантах реализации конструкции антител согласно изобретению являются "выделенными" или "по существу чистыми" конструкциями антител. При употреблении для описания представленных в данном документе конструкций антител "выделенная" или "по существу чистая" обозначает конструкцию антитела, которая была определена, отделена и/или изолирована от компонента среды, в которой она вырабатывается. Предпочтительно конструкция антитела не связана или по существу не связана со всеми другими компонентами из среды, в которой она вырабатывается. Примесные компоненты среды, в которой происходит выработка, такие как остаются от рекомбинантных трансфицированных клеток, представляют собой материалы, которые, как правило, мешают диагностическому или терапевтическому применению полипептида, и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. Конструкции антител могут, например, составлять по меньшей мере

около 5% или по меньшей мере около 50 мас.% от общего белка в данном образце. Понятно, что выделенный белок может составлять от 5 до 99,9 мас.% от общего содержания белка в зависимости от обстоятельств. Полипептид можно получать в существенно большей концентрации посредством применения индуцибельного промотора или промотора высокой экспрессии так, чтобы он производился на повышенном концентрационном уровне. Данное определение включает получение конструкции антитела в широком ряде организмов и/или клеток-хозяев, которые известны в данной области техники. В предпочтительных вариантах реализации изобретения конструкцию антитела очищают (1) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности, используя секвенатор с вращающимся стаканом, или (2) до гомогенности по ДСН-ПААГ в невосстановительных или восстановительных условиях с применением окрашивания голубым кумасси или, предпочтительно, серебром. При этом обычно конструкцию антитела получают с помощью по меньшей мере одного этапа очистки.

Термин "связывающий домен" в связи с настоящим изобретением характеризует домен, который (специфически) связывает/взаимодействует с/распознает данный эпитоп-мишень или данный участок-мишень на молекулах-мишенях (антигенах), в данном случае: ВСМА и CD3 соответственно. Структура и функция первого связывающего домена (распознающего ВСМА) и предпочтительно также структура и/или функция второго связывающего домена (распознающего CD3) основаны на структуре и/или функции антитела, например, полноразмерной или цельной молекулы иммуноглобулина, и/или получены из переменных доменов тяжелой цепи (VH) и/или переменных доменов легкой цепи (VL) антитела или его фрагмента. Предпочтительно первый связывающий домен характеризуется наличием трех CDR легкой цепи (т.е. CDR1, CDR2 и CDR3 VL-области) и/или трех CDR тяжелой цепи (т.е. CDR1, CDR2 и CDR3 VH-области). Второй связывающий домен предпочтительно также содержит минимальные структурные требования антитела, которые обеспечивают связывание мишени. Более предпочтительно второй связывающий домен содержит по меньшей мере три CDR легкой цепи (т.е. CDR1, CDR2 и CDR3 VL-области) и/или три CDR тяжелой цепи (т.е. CDR1, CDR2 и CDR3 VH-области). Подразумевается, что первый и/или второй связывающий домен производят или получают методами фагового дисплея или скрининга библиотек, а не путем прививания последовательностей CDR из предсуществующего (моноклонального) антитела в каркас.

В соответствии с настоящим изобретением связывающие домены имеют форму одного или более полипептидов. Такие полипептиды могут содержать белковые части и небелковые части (например, химические линкеры или химические перекрестно-сшивающие агенты, такие как глutarальдегид). Белки (включая их фрагменты, предпочтительно биологически активные фрагменты, и пептиды, обычно имеющие менее 30 аминокислот) содержат две или более аминокислоты, соединенные друг с другом ковалентной пептидной связью (что приводит к получению цепи из аминокислот).

В контексте данного документа термин "полипептид" описывает группу молекул, которая обычно состоит из более чем 30 аминокислот. Полипептиды могут дополнительно образовывать мультимеры, такие как димеры, тримеры и высшие олигомеры, т.е. состоящие из более чем одной полипептидной молекулы. Полипептидные молекулы, образующие такие димеры, тримеры и т.д., могут быть идентичными или неидентичными. Соответствующие структуры высшего порядка таких мультимеров, соответственно, называются гомо- или гетеродимерами, гомо- или гетеротримерами и т.д. Примером гетеромультимера является молекула антитела, которая в своей природной форме состоит из двух идентичных легких полипептидных цепей и двух идентичных тяжелых полипептидных цепей. Термины "пептид", "полипептид" и "белок" также относятся к модифицированным естественным образом пептидам/полипептидам/белкам, в которых модификация обусловлена, например, посттрансляционными модификациями, такими как гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование и тому подобное. В контексте данного документа "пептид", "полипептид" или "белок" также могут быть химически модифицированными, например пэгиллированными. Такие модификации хорошо известны в данной области техники и описаны ниже в данном документе.

Предпочтительно связывающий домен, который связывается с ВСМА, и/или связывающий домен, который связывается с CD3ε, является/являются человеческими связывающими доменами. Антитела и конструкции антител, содержащие по меньшей мере один человеческий связывающий домен, позволяют избежать некоторых проблем, связанных с антителами или конструкциями антител, которые обладают нечеловеческими, например принадлежащими грызуну (например, мыши, крысы, хомяку или кролику), переменными и/или константными областями. Присутствие таких белков из организма грызуна может приводить к быстрому выведению антител или конструкций антител или может приводить к генерации иммунного ответа против антитела или конструкции антитела у пациента. Чтобы избежать применения полученных от грызунов антител или конструкций антител, можно создавать человеческие или полностью человеческие антитела/конструкции антител путем внесения в организм грызуна функции человеческого антитела так, чтобы у грызуна вырабатывались полностью человеческие антитела.

Возможность клонировать и восстанавливать человеческие локусы размером порядка миллиона пар оснований в YAC и вносить их в мышиную зародышевую линию обеспечивает эффективный подход для изучения функциональных компонентов очень больших или грубо картированных локусов, а также для

создания полезных моделей человеческих заболеваний. Кроме того, применение такой технологии для замещения мышиных локусов их человеческими эквивалентами может обеспечить уникальную информацию об экспрессии и регулировании человеческих генных продуктов во время развития, их взаимодействии с другими системами и их роли в индукции и прогрессировании заболеваний.

Важным практическим применением такой стратегии является "гуманизация" мышинной гуморальной иммунной системы. Внесение локусов человеческого иммуноглобулина (Ig) в организм мышей, у которых были инактивированы эндогенные гены Ig, обеспечивает возможность для изучения механизмов, лежащих в основе программируемой экспрессии и сборки антител, а также их роли в развитии В-клеток. Кроме того, такая стратегия может обеспечить идеальный источник для получения полностью человеческих моноклональных антител (mAb) - ключевой точки в направлении выполнения обещания создания терапии на основе антител для человеческих заболеваний. Ожидается, что полностью человеческие антитела или конструкции антител сведут к минимуму иммуногенные и аллергические ответы, свойственные мышинным или полученным от мышей mAb, и, следовательно, повысят эффективность и безопасность вводимых антител/конструкций антител. Можно ожидать, что применение полностью человеческих антител или конструкций антител обеспечит существенное преимущество в лечении хронических и рецидивных человеческих заболеваний, таких как воспаление, аутоиммунность и рак, при которых требуются повторные введения соединений.

Один подход в направлении этой цели состоял в конструировании мышинных штаммов с дефицитом выработки мышинных антител с большими фрагментами локусов человеческого Ig в ожидании, что такие мыши будут вырабатывать широкий репертуар человеческих антител в отсутствие мышинных антител. Большие фрагменты человеческого Ig должны сохранять широкое разнообразие вариабельных генов, а также надлежащее регулирование выработки и экспрессии антитела. При применении мышинного аппарата для расширения разнообразия и отбора антител и отсутствии иммунологической толерантности к человеческим белкам, воспроизведенный репертуар человеческих антител в этих мышинных штаммах должен привести к получению высокоаффинных антител против представляющего интерес антигена, включая человеческие антигены. Используя технологию гибридомы, можно легко получать и проводить отбор антиген-специфических человеческих mAb с необходимой специфичностью. Эта общая стратегия была продемонстрирована в связи с созданием первых мышинных штаммов XenoMouse (см. Green et al. *Nature Genetics* 7:13-21 (1994)). Были сконструированы штаммы XenoMouse с дрожжевыми искусственными хромосомами (YAC), содержащими фрагменты размером 245 т.п.о. и 190 т.п.о. конфигурации зародышевой линии человеческого локуса тяжелой цепи и локуса к легкой цепи соответственно, которые содержали внутренние последовательности вариабельной и константной области. Содержащие человеческий Ig YAC, оказались совместимыми с мышинной системой в отношении как перестройки, так и экспрессии антител, и были способны замещать инактивированные гены мышинного Ig. Это было продемонстрировано их способностью индуцировать развитие В-клеток, вырабатывать человеческий репертуар взрослого типа полностью человеческих антител и генерировать антиген-специфические человеческие mAb. Эти результаты также позволяют предположить, что внесение больших частей локусов человеческого Ig, содержащих большее количество V-генов, дополнительных регуляторных элементов и константных областей человеческого Ig, может воспроизводить, по существу, полный репертуар, характерный для человеческого гуморального ответа на инфекцию и иммунизацию. Работа Green et al. Была недавно расширена до внесения более чем приблизительно 80% человеческого репертуара антител путем внесения фрагментов YAC размером порядка миллиона пар оснований конфигурации зародышевой линии человеческого локуса тяжелой цепи и локуса к легкой цепи соответственно. См. Mendez et al. *Nature Genetics* 15:146-156 (1997) и заявку на патент США, серийный № 08/759620.

Получение мышей XenoMouse дополнительно обсуждается и описывается в заявках на патент США, серийный № 07/466008, серийный № 07/610515, серийный № 07/919297, серийный № 07/922649, серийный № 08/031801, серийный № 08/112848, серийный № 08/234145, серийный № 08/376279, серийный № 08/430938, серийный № 08/464584, серийный № 08/464582, серийный № 08/463191, серийный № 08/462837, серийный № 08/486853, серийный № 08/486857, серийный № 08/486859, серийный № 08/462513, серийный № 08/724752 и серийный № 08/759620; и патентах США № 6162963; 6150584; 6114598; 6075181; 5939598, и патентах Японии № 3068180 B2, 3068506 B2 и 3068507 B2. См. также Mendez et al. *Nature Genetics* 15:146-156 (1997) и Green and Jakobovits J. *Exp. Med.* 188:483-495 (1998), EP 0463151 B1, WO 94/02602, WO 96/34096, WO 98/24893, WO 00/76310 и WO 03/47336.

В альтернативном подходе другие, включая GenPharm International, Inc., использовали подход "минилокуса". В подходе минилокуса локус экзогенного Ig имитируют путем включения кусочков (отдельных генов) из локуса Ig. Таким образом, один или более генов VH, один или более генов DH, один или более генов JH, мю константная область и вторая константная область (предпочтительно гамма константная область) образуют конструкцию для вставки в организм животного. Этот подход описан в патенте США № 5545807 авторства Surani et al. и патентах США № 5545806; 5625825; 5625126; 5633425; 5661016; 5770429; 5789650; 5814318; 5877397; 5874299; и 6255458, каждый авторства Lonberg и Kay, патентах США № 5591669 и 6023010 авторства Krimpenfort и Berns, патентах США № 5612205; 5721367; и

5789215 авторства Berns et al., и патенте США № 5643763 авторства Choi и Dunn, и заявке на патент США от GenPharm International, серийный № 07/574748, серийный № 07/575962, серийный № 07/810279, серийный № 07/853408, серийный № 07/904068, серийный № 07/990860, серийный № 08/053131, серийный № 08/096762, серийный № 08/155301, серийный № 08/161739, серийный № 08/165699, серийный № 08/209741. Также см. EP 0546073 B1, WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852 и WO 98/24884 и патент США № 5981175. См. также Taylor et al. (1992), Chen et al. (1993), Tuaillon et al. (1993), Choi et al. (1993), Lonberg et al. (1994), Taylor et al. (1994) и Tuaillon et al. (1995), Fishwild et al. (1996).

Kirin также продемонстрировал создание человеческих антител с применением мышей, которым были внесены большие куски хромосом или целые хромосомы посредством микроклеточной инфузии. См. заявки на Европейский патент № 773288 и 843961. Xenex Biosciences разрабатывают технологию для потенциального создания человеческих антител. В этой технологии мышей ТКИД восстанавливают с помощью человеческих лимфатических клеток, например В- и/или Т-клеток. Затем мышей иммунизируют антигеном, и они могут генерировать иммунный ответ против этого антигена. См. патенты США № 5476996; 5698767; и 5958765.

Ответы человеческого антимышиного антитела (НАМА) привели данную отрасль к созданию химерных или иным образом гуманизированных антител. При этом ожидается, что будут наблюдаться ответы некоторых человеческих антихимерных антител (НАСА), в частности при постоянном или многодозовом применении антитела. Таким образом, было бы желательно предоставить конструкции антител, содержащие человеческий связывающий домен против ВСМА и человеческий связывающий домен против CD3ε, чтобы опровергнуть сомнения относительно и/или результаты ответов НАМА или НАСА.

Термины "(специфически) связывается с", "(специфически) распознает", "(специфически) направлен на" и "(специфически) реагирует с" означают в соответствии с этим изобретением, что связывающий домен взаимодействует или специфически взаимодействует с данным эпитопом или данным участком-мишенью на молекулах-мишенях (антигенах), в данном случае ВСМА и CD3ε соответственно.

Термин "эпитоп" относится к участку на антигене, с которым специфически связывается связывающий домен, такой как антитело или иммуноглобулин, или производное, фрагмент или вариант антитела или иммуноглобулина. "Эпитоп" является антигенным и, следовательно, в данном документе термин эпитоп иногда называется "антигенной структурой" или "антигенной детерминантой". Таким образом, связывающий домен является "участком взаимодействия с антигеном". Также подразумевается, что указанное связывание/взаимодействие определяет "специфическое распознавание".

"Эпитопы" могут быть образованы как смежными аминокислотами, так и не смежными аминокислотами, расположенными рядом в результате сворачивания белка в третичную структуру. "Линейный эпитоп" представляет собой эпитоп, в котором первичная аминокислотная последовательность содержит распознаваемый эпитоп. Линейный эпитоп, как правило, содержит по меньшей мере 3 или по меньшей мере 4, и чаще по меньшей мере 5 или по меньшей мере 6, или по меньшей мере 7, например от около 8 до около 10 аминокислот в уникальной последовательности.

"Конформационный эпитоп", в противоположность линейному эпитопу, представляет собой эпитоп, в котором первичная последовательность аминокислот, составляющих эпитоп, не является единственным определяющим компонентом распознаваемого эпитопа (например, эпитоп, в котором первичная последовательность аминокислот не обязательно распознается связывающим доменом). Как правило, конформационный эпитоп содержит большее количество аминокислот по сравнению с линейным эпитопом. В отношении распознавания конформационных эпитопов связывающий домен распознает трехмерную структуру антигена, предпочтительно пептид или белок или его фрагмент (в контексте данного изобретения антигенная структура для одного из связывающих доменов содержится в рамках целевого белка антигена клеточной поверхности). Например, когда молекула белка сворачивается с образованием трехмерной структуры, определенные аминокислоты и/или полипептидный скелет, образующие конформационный эпитоп, оказываются расположены рядом, что делает возможным распознавание эпитопа антителом. Способы определения конформации эпитопов включают, но не ограничиваются этим, рентгеноструктурную кристаллографию, спектроскопию на основе двухмерного ядерного магнитного резонанса (2D-ЯМР) и спектроскопию на основе сайт-направленных спиновых меток и электронного парамагнитного резонанса (ЭПР).

Способ картирования эпитопов описан следующим образом. Когда область (непрерывный участок аминокислот) в человеческом белке ВСМА заменяют/замещают соответствующей областью ВСМА, не принадлежащего человеку и примату (например, мышинного ВСМА, хотя допускаются также и другие, такие как куриные, крысиные, хомячьи, кроличьи и т.д.), ожидается, что произойдет снижение в связывании связывающего домена, если связывающий домен не является перекрестно реагирующим в отношении применяемого ВСМА, не принадлежащего человеку и примату. Указанное снижение предпочтительно составляет по меньшей мере 10, 20, 30, 40 или 50%; более предпочтительно по меньшей мере 60, 70 или 80% и наиболее предпочтительно 90, 95 или даже 100% по сравнению со связыванием с соответствующей областью в человеческом белке ВСМА, причем связывание с соответствующим человеческим

белком ВСМА устанавливается как 100%. Подразумевается, что вышеуказанные химерные структуры человеческий ВСМА/нечеловеческий ВСМА экспрессируются в клетках СНО. Также подразумевается, что химерные структуры человеческий ВСМА/нечеловеческий ВСМА слиты с трансмембранным доменом и/или цитоплазматическим доменом отличного мембраносвязанного белка, такого как ЕpСAМ.

В альтернативном или дополнительном способе картирования эпитопов можно создавать несколько усеченных версий внеклеточного домена человеческого ВСМА, чтобы определить конкретную область, которая распознается связывающим доменом. В этих усеченных версиях поэтапно удаляют разные внеклеточные домены/субдомены или области ВСМА, начиная с N-конца.

Подразумевается, что усеченные версии ВСМА можно экспрессировать в клетках СНО. Также подразумевается, что усеченные версии ВСМА можно сливать с трансмембранным доменом и/или цитоплазматическим доменом отличного мембраносвязанного белка, такого как ЕpСAМ. Также подразумевается, что усеченные версии ВСМА могут включать домен сигнального пептида в N-конце, например сигнальный пептид, полученный из сигнального пептида тяжелой цепи мышиного IgG. Дополнительно подразумевается, что усеченные версии ВСМА могут включать домен v5 в N-конце (после сигнального пептида), который позволяет подтвердить их правильную экспрессию на клеточной поверхности. Ожидается, что снижение или прекращение связывания будет наблюдаться для тех усеченных версий ВСМА, которые больше не включают область ВСМА, распознаваемую связывающим доменом. Снижение связывания предпочтительно составляет по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50%; более предпочтительно по меньшей мере 60, 70, 80% и наиболее предпочтительно 90, 95 или даже 100%, причем связывание с полным человеческим белком ВСМА (или его внеклеточной областью или доменом) устанавливается как 100.

Дополнительным способом определения вклада конкретного остатка ВСМА в распознавание кон-струкцией антитела или связывающим доменом является аланин-сканирующий мутагенез (см., например, Morrison K.L. & Weiss G.A. *Cur. Opin. Chem. Biol.* 2001 Jun; 5(3): 302-7), в котором каждый предназначенный для анализа остаток замещают аланином, например, посредством сайт-направленного мутагенеза. Аланин используют из-за его необъемной, химически инертной, метильной функциональной группы, которая при этом имитирует вторичную структуру, которой обладают многие другие аминокислоты. Иногда можно использовать объемные аминокислоты, такие как валин или изолейцин, в случаях, когда необходимо сохранение размера мутированного остатка. Аланиновое сканирование является проверенной технологией, которую используют уже долгое время.

Взаимодействие между связывающим доменом и эпитопом или областью, содержащей эпитоп, означает, что связывающий домен демонстрирует приемлемую аффинность в отношении эпитопа/области, содержащей эпитоп, в конкретном белке или антигене (в данном случае: ВСМА и CD3 соответственно) и, в целом, не демонстрирует существенной реактивности с белками или антигенами, отличными от ВСМА или CD3. "Приемлемая аффинность" включает связывание с аффинностью около 10^{-6} М (КД) или выше. Предпочтительно связывание считается специфическим, когда аффинность связывания составляет от около 10^{-12} до 10^{-8} М, от 10^{-12} до 10^{-9} М, от 10^{-12} до 10^{-10} М, от 10^{-11} до 10^{-8} М, предпочтительно от около 10^{-11} до 10^{-9} М. Вступает ли специфически связывающий домен в реакцию или связывается ли с мишенью, можно легко проверить, помимо прочего, сравнивая реакцию указанного связывающего домена с целевым белком или антигеном с реакцией указанного связывающего домена с белками или антигенами, отличными от ВСМА или CD3. Предпочтительно связывающий домен согласно изобретению практически или по существу не связывается с белками или антигенами, отличными от ВСМА или CD3 (т.е. первый связывающий домен не способен связываться с белками, отличными от ВСМА, а второй связывающий домен не способен связываться с белками, отличными от CD3). Подразумеваемой характеристикой конструкций антител в соответствии с настоящим изобретением является то, что они имеют превосходящие характеристики аффинности по сравнению с другими HLE-форматами. Следовательно, такая превосходящая аффинность предполагает продленное время полужизни *in vivo*. Более длительное время полужизни конструкций антител в соответствии с настоящим изобретением может снизить длительность и частоту введения, что, как правило, влияет на улучшение соблюдения пациентом режима лечения. Это является исключительно важным, так как конструкции антител согласно данному изобретению являются исключительно полезными для сильно ослабленных или даже полиморбидных раковых пациентов.

Термин "практически/по существу не связывает" или "не способен связываться" означает, что связывающий домен согласно данному изобретению не связывает белок или антиген, отличный от ВСМА или CD3, т.е. не демонстрирует реактивность более 30%, предпочтительно не более 20%, предпочтительнее не более 10%, в частности предпочтительно не более 9, 8, 7, 6 или 5% с белками или антигенами, отличными от ВСМА или CD3, причем связывание с ВСМА или CD3 соответственно установлено как 100%.

Считается, что на специфическое связывание влияют конкретные мотивы в аминокислотной последовательности связывающего домена и антигена. Таким образом, связывание достигается в результате их первичной, вторичной и/или третичной структуры, а также в результате вторичных модификаций указанных структур. Специфическое взаимодействие участка взаимодействия с антигеном с его специфическим антигеном может приводить к простому связыванию указанного участка с антигеном. Более того, специфическое взаимодействие участка взаимодействия с антигеном с его специфическим антигеном

может в альтернативном или дополнительном варианте приводить к инициации сигнала, например, вследствие индукции изменения конформации антигена, олигомеризации антигена и т.д.

Термин "вариабельный" относится к частям доменов антитела или иммуноглобулина, которые демонстрируют вариабельность в последовательности и которые вовлечены в определение специфичности и аффинности связывания конкретного антитела (т.е. "вариабельный(е) домен(ы)"). Спаривание вместе вариабельной тяжелой цепи (VH) и вариабельной легкой цепи (VL) приводит к образованию одного антигенсвязывающего участка.

Вариабельность неравномерно распределена между вариабельными доменами антител; она сконцентрирована в субдоменах каждой из вариабельных областей тяжелой и легкой цепи. Эти субдомены называются "гипервариабельными областями" или "определяющими комплементарность областями" (CDR). Более консервативные (т.е. не гипервариабельные) части вариабельных доменов называются "каркасными" областями (FRM или FR) и обеспечивают каркас для шести CDR в трехмерном пространстве с образованием антигенсвязывающей поверхности. Каждый из вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей природного происхождения содержит четыре FRM-области (FR1, FR2, FR3 и FR4), принимающие большей частью β -складчатую конфигурацию, соединенные тремя гипервариабельными областями, которые образуют петли, соединяющие, и в некоторых случаях образующие часть β -складчатой структуры. Гипервариабельные области в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости FRM и вместе с гипервариабельными областями из другой цепи вносят свой вклад в образование антигенсвязывающего участка (см. Kabat et al., loc. cit.).

Термины "CDR" и множественная форма "CDR" относятся к определяющим комплементарность областям, из которых три обуславливают характер связывания вариабельной области легкой цепи (CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3) и три обуславливают характер связывания вариабельной области тяжелой цепи (CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3). CDR содержат большинство остатков, отвечающих за специфическое взаимодействие антитела с антигеном и, следовательно, вносят свой вклад в функциональную активность молекулы антитела: они являются основными детерминантами специфичности к антигену.

Точное определение границ и размеров CDR является предметом разных классификаций и систем нумерации.

Следовательно, CDR могут быть обозначены в соответствии с определениями Kabat, Chothia, контактными или любыми другими определениями границ, включая описанную в данном документе систему нумерации. Несмотря на отличающиеся границы каждая из этих систем имеет некоторую степень перекрытия в том, что составляет так называемые "гипервариабельные области" в пределах вариабельных последовательностей. Следовательно, определения CDR в соответствии с этими системами могут отличаться по длине и граничным участкам по отношению к прилегающей каркасной области. См., например, Kabat (подход на основании межвидовой вариабельности последовательностей), Chothia (подход на основании кристаллографических исследований комплексов антиген-антитело), и/или MacCallum (Kabat et al., loc. cit.; Chothia et al., J. Mol. Biol., 1987, 196: 901-917; и MacCallum et al., J. Mol. Biol., 1996, 262: 732). Еще одним стандартом для характеристики антигенсвязывающего участка является определение AbM, применяемое в программном обеспечении для моделирования антител Oxford Molecular's AbM. См., например, Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. В: Antibody Engineering Lab Manual (Ed.: Duebel, S. and Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg). В случае если две методики идентификации остатков определяют остатки перекрывающихся, но не идентичных областей, их можно комбинировать для определения гибридной CDR. При этом предпочтительной является нумерация в соответствии с так называемой системой Kabat.

Как правило, CDR образуют петлевую структуру, которая может быть классифицирована как каноническая структура. Термин "каноническая структура" относится к основной конформации цепи, которую принимают антигенсвязывающие (CDR) петли. По результатам сравнительных структурных исследований было обнаружено, что пять из шести антигенсвязывающих петель имеют только ограниченный набор доступных конформаций. Каждую каноническую структуру можно охарактеризовать по углу кручения полипептидного скелета. Следовательно, соответствующие петли среди антител могут иметь очень сходные трехмерные структуры несмотря на высокую аминокислотную вариабельность в большинстве частей петель (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 1987, 196: 901; Chothia et al., Nature, 1989, 342: 877; Martin and Thornton, J. Mol. Biol., 1996, 263: 800). Кроме того, существует взаимосвязь между принимаемой петлей структурой и окружающими ее аминокислотными последовательностями. Конформация конкретного канонического класса определяется длиной петли и аминокислотными остатками, находящимися в ключевых позициях в пределах петель, а также в пределах консервативной каркасной области (т.е. за пределами петель). Отнесение к конкретному каноническому классу, следовательно, можно проводить на основании присутствия этих ключевых аминокислотных остатков.

Термин "каноническая структура" также может включать факторы, связанные с линейной последовательностью антитела, например каталогизированные Kabat (Kabat et al., loc. cit.). Схема (система) нумерации Kabat является широко распространенным стандартом нумерации аминокислотных остатков вариабельного домена антитела последовательным образом и является предпочтительной схемой, при-

меняемой в данном изобретении, что также упоминается в другом месте данного документа. Для определения канонической структуры антитела также можно использовать дополнительные структурные факторы. Например, те отличия, которые не полностью отображены в нумерации Kabat, можно описать с помощью системы нумерации Chothia et al. и/или выявить с помощью других методик, например кристаллографии и двух- или трехмерного компьютерного моделирования.

Соответственно, заданную последовательность антитела можно отнести к каноническому классу, что позволяет, помимо прочего, идентифицировать соответствующие шасси-последовательности (например, на основании необходимости включать разнообразные канонические структуры в библиотеку). Нумерация аминокислотных последовательностей антител по Kabat и структурные факторы, описанные Chothia et al., loc. cit., и их значения для конструирования канонических аспектов структуры антитела описаны в литературе. Субъединичные структуры и трехмерные конфигурации разных классов иммуноглобулинов хорошо известны в данной области техники. Обзор структуры антител можно посмотреть в *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, eds. Harlow et al., 1988.

CDR3 легкой цепи и в особенности CDR3 тяжелой цепи могут составлять наиболее важные детерминанты в связывании антигена в пределах варибельных областей легкой и тяжелой цепи. В некоторых конструкциях антител CDR3 тяжелой цепи составляет основную площадь контакта между антигеном и антителом. In vitro схемы отбора, в которых варьируется только CDR3, можно использовать, чтобы варьировать связывающие свойства антитела или чтобы определить, какие остатки вносят вклад в связывание антигена. Следовательно, CDR3, как правило, является наибольшим источником молекулярного разнообразия в пределах связывающего участка антитела. Например, H3 может иметь длину всего в два аминокислотных остатка или более 26 аминокислот.

В классическом полноразмерном антителе или иммуноглобулине каждая легкая (L) цепь связана с тяжелой (H) одной ковалентной дисульфидной связью, тогда как две H-цепи связаны друг с другом одной или более дисульфидными связями в зависимости от изотипа H-цепи. Домен CH, расположенный наиболее близко к VH, обычно обозначается как CH1. Константные ("C") домены непосредственно не вовлечены в связывание антигена, но проявляют различные эффекторные функции, такие как антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность и активация комплемента. Fc-область антитела находится в пределах константных доменов тяжелой цепи и, например, способна взаимодействовать с расположенными на поверхности клетки Fc-рецепторами.

Последовательность генов антитела после сборки и соматической мутации сильно варьируется и по оценкам эти варьированные гены кодируют 10^{10} разных молекул антител (*Immunoglobulin Genes*, 2nd ed., eds. Jonio et al., Academic Press, San Diego, CA, 1995). Соответственно, иммунная система обеспечивает некоторый репертуар иммуноглобулинов. Термин "репертуар" относится по меньшей мере к одной нуклеотидной последовательности, целиком или частично полученной по меньшей мере из одной последовательности, кодирующей по меньшей мере один иммуноглобулин. Последовательность(и) можно получать путем перестройки in vivo V, D и J сегментов тяжелых цепей и V и J сегментов легких цепей. В альтернативном варианте последовательность(и) можно получать из клетки в ответ на которую происходит перестройка, например, in vitro стимуляция. В альтернативном варианте часть или всю (все) последовательность(и) можно получать посредством сплайсинга ДНК, синтеза нуклеотидов, мутагенеза и других способов, см., например, патент США 5565332. Репертуар может включать только одну последовательность или может включать множество последовательностей, включая находящиеся в генетически разнообразной коллекции.

В связи с этим изобретением термин "Fc-часть" или "Fc-мономер" означает полипептид, содержащий по меньшей мере один домен, имеющий функцию домена CH2, и по меньшей мере один домен, имеющий функцию домена CH3 молекулы иммуноглобулина. Как очевидно из термина "Fc-мономер", полипептид, содержащий эти домены CH, является "полипептидным мономером". Fc-мономер может представлять собой полипептид, содержащий, по меньшей мере, фрагмент константной области иммуноглобулина за исключением первого домена константной области тяжелой цепи иммуноглобулина (CH1), но сохраняющий, по меньшей мере, функциональную часть одного домена CH2 и функциональную часть одного домена CH3, причем домен CH2 является аминоконцевым по отношению к домену CH3. В предпочтительном аспекте этого определения Fc-мономер может представлять собой полипептидную константную область, содержащую часть шарнирной области Ig-Fc, область CH2 и область CH3, причем шарнирная область является аминоконцевой по отношению к домену CH2. Подразумевается, что шарнирная область согласно данному изобретению стимулирует димеризацию. Такие молекулы Fc-полипептидов можно получать, например и без ограничения, путем расщепления папаино области иммуноглобулина (конечно, приводящего к получению димера из двух Fc-полипептидов). В другом аспекте этого определения Fc-мономер может представлять собой полипептидную область, содержащую часть области CH2 и области CH3. Такие молекулы Fc-полипептидов можно получать, например и без ограничения, путем расщепления пепсином молекулы иммуноглобулина. В одном варианте реализации изобретения полипептидная последовательность Fc-мономера, по существу, аналогична последовательности Fc-полипептида: Fc-области IgG₁, Fc-области IgG₂, Fc-области IgG₃, Fc-области IgG₄, Fc-области IgM, Fc-области IgA, Fc-области IgD и Fc-области IgE.

(См., например, Padlan, *Molecular Immunology*, 31(3), 169-217 (1993)). Вследствие наличия некоторой вариации между иммуноглобулинами и исключительно для ясности Fc-мономер относится к последним двум доменам константной области тяжелой цепи иммуноглобулина IgA, IgD и IgG и последним трем доменам константной области тяжелой цепи иммуноглобулина IgE и IgM. Как упоминалось, Fc-мономер также может содержать гибкую шарнирную область, расположенную N-терминально к этим доменам. В случае IgA и IgM Fc-мономер может содержать J-цепь. В случае IgG Fc-часть содержит домены иммуноглобулина CH2 и CH3 и шарнирную область между первыми двумя доменами и CH2. Хотя границы Fc-части могут варьироваться, пример Fc-части тяжелой цепи человеческого IgG, содержащей функциональную шарнирную область, домен CH2 и CH3, может, например, по определению содержать остатки от D231 (шарнирного домена - соответствующего D234 в табл. 1, ниже) до P476 соответственно L476 (в случае IgG4) карбокси-конца домена CH3, где нумерация приведена в соответствии с Kabat. Две Fc-части или два Fc-мономера, слитые друг с другом посредством пептидного линкера, определяют третий домен конструкции антитела согласно изобретению, который также может быть определен как домен scFc.

В одном варианте реализации изобретения подразумевается, что описанный в данном документе домен scFc, соответственно Fc-мономеры, слитые друг с другом, находятся только в третьем домене конструкции антитела.

В соответствии с настоящим изобретением шарнирную область IgG можно определить по аналогии, используя нумерацию Kabat, как показано в табл. 1. В соответствии с вышесказанным подразумевается, что шарнирный домен/шарнирная область согласно данному изобретению содержит аминокислотные остатки, соответствующие участку последовательности IgG₁ от D234 до P243 в соответствии с нумерацией Kabat. Аналогично, подразумевается, что шарнирный домен/шарнирная область согласно данному изобретению содержит или состоит из шарнирной последовательности IgG₁ DRTHTCPPCP (SEQ ID NO: 99) (соответствующей участку от D234 до P243, как показано в табл. 1, ниже, - также подразумеваются вариации указанной последовательности, при условии, что шарнирная область продолжает стимулировать димеризацию). В предпочтительном варианте реализации изобретения участок гликозилирования в позиции 314 по Kabat доменов CH2 в третьем домене конструкции антитела удален посредством замены N314X, где X представляет собой любую аминокислоту за исключением Q. Указанная замена предпочтительно представляет собой замену N314G. В более предпочтительном варианте реализации изобретения указанный домен CH2 дополнительно содержит следующие замены (позиции в соответствии с Kabat): V321C и R309C (эти замены вносят внутридоменный цистеиновый дисульфидный мостик в позициях 309 и 321 по Kabat).

Также подразумевается, что третий домен конструкции антитела согласно изобретению содержит или состоит из, в порядке от amino-конца к карбокси-концу: DKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 99) (т.е. шарнирная область) -CH2-CH3-линкер- DKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 99) (т.е. шарнирная область) -CH2-CH3. Пептидный линкер в вышеуказанной конструкции антитела в предпочтительном варианте реализации характеризуется аминокислотной последовательностью Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, т.е. Gly₄Ser (SEQ ID NO: 1), или ее полимерами, т.е. (Gly₄Ser)_x, где x представляет собой целое число, равное 5 или более (например, 5, 6, 7, 8 и т.д. или более), причем предпочтительным вариантом является 6 ((Gly₄Ser)₆). Указанная конструкция может дополнительно содержать вышеуказанные замены N314X, предпочтительно N314G, и/или дополнительные замены V321C и R309C. В предпочтительном варианте реализации конструкций антител согласно изобретению, определенных ранее, подразумевается, что второй домен связывается с внеклеточным эпитопом цепи CD3ε человека и/или Масаса.

Таблица 1. Нумерация аминокислотных остатков шарнирной области по Kabat

Нумерация IMGT для шарнирной области	Аминокислотная трансляция IgG ₁	Нумерация Kabat
1	(E)	226
2	P	227
3	K	228
4	S	232
5	C	233
6	D	234
7	K	235
8	T	236
9	H	237
10	T	238
11	C	239
12	P	240
13	P	241
14	C	242
15	P	243

В дополнительных вариантах реализации изобретения шарнирный домен/шарнирная область содержит или состоит из шарнирной последовательности подтипа IgG2 ERKCCVECPSP (SEQ ID NO: 100), последовательности подтипа IgG3 ELKTPLDTTHTCPRCP (SEQ ID NO: 101) или ELKTPLGDTTHTCPRCP (SEQ ID NO: 103) и/или последовательности подтипа IgG4 ESKYGPPCPSP (SEQ ID NO: 102). Шарнирная последовательность подтипа IgG1 может быть следующей: EPKSCDKTHTCPPCP (как показано в табл. 1 и SEQ ID NO: 104). Таким образом, эти основные шарнирные области также подразумеваются в контексте данного изобретения.

Положение и последовательность домена CH2 IgG и домена CH3 IgG можно определить по аналогии, используя нумерацию Kabat, как показано в табл. 2.

Таблица 2. Нумерация аминокислотных остатков области CH2 и CH3 IgG по Kabat

Подтип IgG	ак трансляция CH2	Нумерация CH2 по Kabat	ак трансляция CH3	Нумерация CH3 по Kabat
IgG ₁	APЕ... ...KAK	244... ...360	GQP.....PGK	361... ...478
IgG ₂	APР... ...KTK	244... ...360	GQP.....PGK	361... ...478
IgG ₃	APЕ... ...KTK	244... ...360	GQP.....PGK	361... ...478
IgG ₄	APЕ... ...KAK	244... ...360	GQP.....LGK	361... ...478

В одном варианте реализации изобретения выделенные жирным аминокислотные остатки в домене CH3 первого или обоих Fc-мономеров удалены.

Пептидный линкер, посредством которого полипептидные мономеры ("Fc-часть" или "Fc-мономер") третьего домена слиты друг с другом, предпочтительно содержит по меньшей мере 25 аминокислотных остатков (25, 26, 27, 28, 29, 30 и т.д.). Более предпочтительно этот пептидный линкер содержит по меньшей мере 30 аминокислотных остатков (30, 31, 32, 33, 34, 35 и т.д.). Также предпочтительно, чтобы линкер содержал до 40 аминокислотных остатков, более предпочтительно до 35 аминокислотных остатков, наиболее предпочтительно точно 30 аминокислотных остатков. В предпочтительном варианте реализации такой пептидный линкер характеризуется аминокислотной последовательностью Gly-Gly-Gly-Ser, т.е. Gly₄Ser (SEQ ID NO: 1), или ее полимерами, т.е. (Gly₄Ser)_x, где x представляет собой целое число, равное 5 или более (например, 6, 7 или 8). Предпочтительно целое число равно 6 или 7, более предпочтительно целое число равно 6.

В случае, если линкер используется для слияния первого домена со вторым доменом или первого или второго домена с третьим доменом, этот линкер предпочтительно имеет длину и последовательность, достаточную, чтобы гарантировать, что каждый из первого и второго доменов может независимо от другого сохранять свою специфичность дифференциального связывания. В случае пептидных линкеров, которые соединяют по меньшей мере два связывающих домена (или два переменных домена) в конструкции антитела согласно изобретению, предпочтительными являются пептидные линкеры, которые содержат всего несколько аминокислотных остатков, например 12 аминокислотных остатков. Таким образом, предпочтительными являются пептидные линкеры из 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 или 5 аминокислотных остатков. Подразумеваемый пептидный линкер с менее чем 5 аминокислотами содержит 4, 3, 2 или одну аминокислоту, причем предпочтительными являются Gly-богатые линкеры. Предпочтительный вариант реализации пептидного линкера для слияния первого и второго домена приведен в SEQ ID NO:1. Предпочтительный вариант реализации пептидного линкера для слияния второго и третьего домена представляет собой (Gly)₄-линкер, также называемый G₄-линкером.

В особенности предпочтительной "единственной" аминокислотой в контексте вышеописанного "пептидного линкера" является Gly. Соответственно, указанный пептидный линкер может состоять из единственной аминокислоты Gly. В предпочтительном варианте реализации изобретения пептидный линкер характеризуется аминокислотной последовательностью Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, т.е. Gly₄Ser (SEQ ID NO: 1), или ее полимерами, т.е. (Gly₄Ser)_x, где x представляет собой целое число, равное 1 или более (например, 2 или 3). Предпочтительные линкеры приведены в SEQ ID NO: от 1 до 12. Характеристики указанного пептидного линкера, которые включают отсутствие стимуляции образования вторичных структур, известны в данной области техники и описаны, например, в Dall'Acqua et al. (Biochem. (1998) 37, 9266-9273), Cheadle et al. (Mol. Immunol. (1992) 29, 21-30) и Raag and Whitlow (FASEB (1995) 9(1), 73-80). Предпочтительными являются пептидные линкеры, которые, помимо прочего, не стимулируют образование каких-либо вторичных структур. Связь указанных доменов друг с другом можно обеспечить, например, посредством генетической инженерии, как описано в примерах. Способы получения слитых и функционально связанных биспецифических одноцепочечных конструкций и их экспрессии в клетках млекопитающих или бактериях хорошо известны в данной области техники (например, WO 99/54440 или Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001).

В предпочтительном варианте реализации конструкции антитела согласно данному изобретению первый и второй домен образуют конструкцию антитела в формате, выбранном из группы, состоящей из (scFv)₂, scFv-однодоменного mAb, диатела и олигомеров любого из этих форматов.

В соответствии с особенно предпочтительным вариантом реализации изобретения и как описано в прилагающихся примерах, первый и второй домены конструкции антитела согласно изобретению представляют собой "биспецифическую одноцепочечную конструкцию антитела", более предпочтительно биспецифический "одноцепочечный Fv" (scFv). Хотя два домена Fv-фрагмента, VL и VH, кодируются отдельными генами, их можно соединить, используя рекомбинантные способы, синтетическим линкером, - как было ранее описано в данном документе - который обеспечивает возможность их получения в виде одной белковой цепи, в которой области VL и VH спарены с образованием моновалентной молекулы; см., например, Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci USA 85:5879-5883). Эти фрагменты антител получают, используя традиционные методики, известные специалистам в данной области техники, и оценивают фрагменты в отношении функции таким же образом, что и полноразмерные антитела. Следовательно, одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv) представляет собой слитый белок варибельной области тяжелой цепи (VH) и легкой цепи (VL) иммуноглобулинов, обычно соединенных коротким линкерным пептидом длиной от около десяти до около 25 аминокислот, предпочтительно от около 15 до 20 аминокислот. Обычно линкер насыщен глицином для гибкости, а также серином или треонином для растворимости и может соединять N-конец VH с C-концом VL или наоборот. Этот белок сохраняет специфичность оригинального иммуноглобулина, несмотря на удаление константных областей и внесение линкера.

Биспецифические одноцепочечные конструкции антител известны в данной области техники и описаны в WO 99/54440, Mack, J. Immunol. (1997), 158, 3965-3970, Mack, PNAS, (1995), 92, 7021-7025, Kufer, Cancer Immunol. Immunother., (1997), 45, 193-197, Löffler, Blood, (2000), 95, 6, 2098-2103, Brühl, Immunol., (2001), 166, 2420-2426, Kipriyanov, J. Mol. Biol., (1999), 293, 41-56. Techniques described for the production of single chain antibodies (см., помимо прочего, патент США 4946778, Kontermann and Dübel (2010), loc. cit. и Little (2009), loc. cit.) можно адаптировать для получения одноцепочечных конструкций антител, специфически распознающих выбранную(ые) мишень(и).

Бивалентные (также называемые дивалентными) или биспецифические одноцепочечные варибельные фрагменты (bi-scFv или di-scFv, имеющие формат (scFv)₂ можно сконструировать путем связывания двух молекул scFv (например, линкерами, как было описано ранее). Если эти две молекулы scFv имеют одинаковую специфичность связывания, получаемая в результате молекула (scFv)₂ предпочтительно будет называться бивалентной (т.е. она имеет две валентности в отношении одного эпитопа-мишени). Если две молекулы scFv имеют разную специфичность связывания, получаемая в результате молекула (scFv)₂ предпочтительно будет называться биспецифической. Связывание можно осуществлять путем получения одной пептидной цепи с двумя областями VH и двумя областями VL, что приводит к получению tandemных scFv (см., например, Kufer P. et al., (2004) Trends in Biotechnology 22(5): 238-244). Другой возможностью является создание молекул scFv с линкерными пептидами, которые являются слишком короткими для того, чтобы удерживать вместе две варибельные области (например, около пяти аминокислот), что принуждает scFv к димеризации. Этот тип известен как диатела (см., например, Hollinger, Philipp et al., (July 1993) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90 (14): 6444-8).

В соответствии с этим изобретением любой из первого, второго или первого и второго домены могут составлять однодоменное антитело, соответственно варибельный домен или по меньшей мере часть CDR однодоменного антитела. Однодоменные антитела содержат только один (мономерный) варибельный домен антитела, который способен избирательно связываться с конкретным антигеном, независимо от других V-областей или доменов. Первые однодоменные антитела были сконструированы из содержащих только тяжелые цепи антител, обнаруживаемых у верблюжьих, и называются V_HH-фрагментами. Хрящевые рыбы также имеют содержащие только тяжелые цепи антитела (IgNAR), из которых можно получать однодоменные антитела, называемые V_{NAR}-фрагментами. Альтернативный подход состоит в разбитии димерных варибельных доменов из обычных иммуноглобулинов, например, принадлежащих человеку или грызуну, на мономеры, получая, таким образом, VH или VL в виде однодоменного Ab. Хотя на данный момент большинство исследований относительно однодоменных антител базируются на варибельных доменах тяжелой цепи, также было показано, что нанотела, полученные из легких цепей, специфически связываются с эпитопами-мишенями. Примеры однодоменных антител называются sdAb, нанотелами или антителами, содержащими один варибельный домен.

Следовательно, однодоменное (mAb)₂ представляет собой моноклональную конструкцию антитела, состоящую из (по меньшей мере) двух однодоменных моноклональных антител, которые по отдельности выбраны из группы, включающей V_H, V_L, V_HH и V_{NAR}. Линкер предпочтительно имеет форму пептидного линкера. Аналогично, "scFv-однодоменное mAb" представляет собой моноклональную конструкцию антитела, состоящую из по меньшей мере одного описанного выше однодоменного антитела и одной описанной выше молекулы scFv. Снова, линкер предпочтительно имеет форму пептидного линкера.

Конкурирует ли конструкция антитела за связывание с другой заданной конструкцией антитела, можно определить в конкурентном анализе, таком как конкурентный ИФА или клеточный конкурентный анализ. Также можно использовать покрытые авидином микрочастицы (гранулы). Аналогично с покрытием авидином планшета ИФА, при проведении реакции с биотинилированным белком каждую из этих гранул можно использовать в качестве субстрата для проведения анализа. Антиген наносят на гранулу, а

затем предварительно наносят первое антитело. Добавляют второе антитело и определяют наличие какого-либо дополнительного связывания. Возможные средства для регистрации данных включают точную цитометрию.

Т-клетки или Т-лимфоциты являются типом лимфоцитов (которые сами по себе являются типом белых кровяных телец), который играет основную роль в клеточно-опосредованном иммунитете. Существует несколько подгрупп Т-клеток, каждая из которых имеет отличную функцию. Т-клетки можно отличить от других лимфоцитов, таких как В-клетки и НК-клетки, по присутствию Т-клеточного рецептора (ТКР) на клеточной поверхности. ТКР отвечает за распознавание антигенов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости (ГКГС), и состоит из двух разных белковых цепей. В 95% Т-клеток ТКР состоит из альфа (α) и бета (β) цепи. Когда ТКР вступает в контакт с антигенным пептидом и ГКГС (комплексом пептид/ГКГС), происходит активация Т-лимфоцита посредством серии биохимических событий, опосредованных ассоциированными ферментами, ко-рецепторами, специализированными адапторными молекулами и активированными или высвобожденными транскрипционными факторами.

Комплекс CD3-рецептора представляет собой белковый комплекс и состоит из четырех цепей. У млекопитающих комплекс содержит CD3 γ (гамма) цепь, CD3 δ (дельта) цепь и две CD3 ϵ (эпсилон) цепи. Эти цепи связываются с Т-клеточным рецептором (ТРК) и так называемой ζ (дзета) цепью с образованием комплекса Т-клеточного рецептора и CD3 и генерацией сигнала активации в Т-лимфоцитах. Цепи CD3 γ (гамма), CD3 δ (дельта) и CD3 ϵ (эпсилон) являются высокородственными белками клеточной поверхности суперсемейства иммуноглобулинов, содержащие один внеклеточный домен иммуноглобулина. Внутриклеточные хвосты молекул CD3 содержат один консервативный мотив, известный как иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив или, сокращенно, ITAM, который является важным для сигнальных возможностей ТРК. Молекула CD3 эпсилон представляет собой полипептид, который у людей кодируется геном CD3E, который находится в хромосоме 11. Наиболее предпочтительный эпитоп CD3 ϵ находится в пределах аминокислотных остатков 1-27 внеклеточного домена человеческого CD3 ϵ . Предполагается, что конструкции антител в соответствии с настоящим изобретением, как правило и преимущественно, меньше демонстрируют неспецифическую активацию Т-клеток, которая является нежелательной в специфической иммунотерапии. Это приводит к снижению риска возникновения побочных явлений.

Перенаправленный лизис клеток-мишеней посредством привлечения Т-клеток мультиспецифической, по меньшей мере, биспецифической конструкцией антитела включает образование цитолитического синапса и доставку перфорина и гранзимов. Привлеченные Т-клетки способны серийно осуществлять лизис клеток-мишеней, и на них не влияют механизмы уклонения от иммунологического надзора, создающие помехи для процессинга и презентации пептидных антигенов или клональной дифференцировки Т-клеток; см., например, WO 2007/042261.

Цитотоксичность, опосредованную конструкциями антител согласно изобретению, можно определять различными путями. Эффекторными клетками могут представлять собой, например, обогащенные (человеческие) CD8-положительные Т-клетки или нестимулированные (человеческие) мононуклеарные клетки периферической крови (МПКК). Если клетки-мишени происходят от или экспрессируются у макаков или трансфицированы ВСМА макака, который связывается первым доменом, эффекторные клетки также должны происходить от макака, например, линии Т-клеток макака, например 4119LnPx. Клетки-мишени должны экспрессировать (по меньшей мере, внеклеточный домен) ВСМА, например ВСМА человека или макака. Клетки-мишени могут представлять собой линию клеток (такую как CHO), стабильно или временно трансфицированную ВСМА, например ВСМА человека или макака. В альтернативном варианте клетки-мишени могут представлять собой ВСМА-положительную линию клеток с естественной экспрессией, такую как линия клеток человеческой множественной миеломы L363 или NCI-H929. Обычно ожидается, что значения EC_{50} будут ниже в случае линий клеток-мишеней, экспрессирующих более высокие уровни ВСМА на клеточной поверхности. Соотношение между эффекторными клетками и клетками-мишенями (Э:М) обычно составляет около 10:1, но также может варьироваться. Цитотоксическую активность биспецифических конструкций антител к ВСМАхCD3 можно определить в анализе высвобождения ^{51}Cr (время инкубации - около 18 ч) или в анализе цитотоксичности на основе FACS (время инкубации - около 48 ч). Также возможны модификации времени инкубации (цитотоксической реакции) в анализе. Другие способы определения цитотоксичности хорошо известны специалистам и включают МТТ- или МТС-анализ, методы анализа на основе АТФ, включая биOLUMИнесцентный анализ, анализ с сульфородамино В (SRB), анализ WST, клоногенный анализ и технологию ECIS.

Цитотоксическую активность, опосредованную биспецифическими конструкциями антител к ВСМАхCD3 согласно данному изобретению, предпочтительно определяют в клеточном анализе цитотоксичности. Ее также можно определять в анализе высвобождения ^{51}Cr . Ее представляет значение EC_{50} , которое соответствует полумаксимальной эффективной концентрации (концентрации конструкции антитела, которая индуцирует цитотоксический ответ посередине между исходным и максимальным уровнем). Предпочтительно значение EC_{50} биспецифических конструкций антител к ВСМАхCD3 составляет ≤ 5000 пМ или ≤ 4000 пМ, более предпочтительно ≤ 3000 пМ или ≤ 2000 пМ, даже более предпочтительно

≤ 1000 пМ или ≤ 500 пМ, даже более предпочтительно ≤ 400 пМ или ≤ 300 пМ, даже более предпочтительно ≤ 200 пМ, даже более предпочтительно ≤ 100 пМ, даже более предпочтительно ≤ 50 пМ, даже более предпочтительно ≤ 20 пМ или ≤ 10 пМ и наиболее предпочтительно ≤ 5 пМ.

Вышеприведенные значения EC_{50} можно определить в разных анализах. Специалисту известно, что можно ожидать, что значение EC_{50} будет ниже, когда в качестве эффекторных клеток используют стимулированные/обогащенные Т-клетки $CD8^+$, по сравнению с нестимулированными МКПК. Кроме того, можно ожидать, что значения EC_{50} будут ниже, когда клетки-мишени экспрессируют большое количество ВСМА по сравнению с низким уровнем экспрессии мишеней. Например, когда в качестве эффекторных клеток используют стимулированные/обогащенные Т-клетки $CD8^+$ (и в качестве клеток-мишеней используют трансфицированные ВСМА клетки, такие как клетки CHO, или ВСМА-положительные человеческие клеточные линии), значение EC_{50} биспецифической конструкции антитела к ВСМАхCD3 предпочтительно составляет ≤ 1000 пМ, более предпочтительно ≤ 500 пМ, даже более предпочтительно ≤ 250 пМ, даже более предпочтительно ≤ 100 пМ, даже более предпочтительно ≤ 50 пМ, даже более предпочтительно ≤ 10 пМ и наиболее предпочтительно ≤ 5 пМ. Когда в качестве эффекторных клеток используют человеческие МКПК, значение EC_{50} биспецифической конструкции антитела к ВСМАхCD3 предпочтительно составляет ≤ 5000 пМ или ≤ 4000 пМ (в частности, когда клетками-мишенями являются ВСМА-положительные человеческие клеточные линии), более предпочтительно ≤ 2000 пМ (в частности, когда клетками-мишенями являются трансфицированные ВСМА клетки, такие как клетки CHO), более предпочтительно ≤ 1000 пМ или ≤ 500 пМ, даже более предпочтительно ≤ 200 пМ, даже более предпочтительно ≤ 150 пМ, даже более предпочтительно ≤ 100 пМ и наиболее предпочтительно ≤ 50 пМ или меньше. Когда в качестве эффекторных клеток используют линию Т-клеток макака, такую как LnPx4119, а трансфицированную ВСМА макака линию клеток, таких как клетки CHO, используют в качестве линии клеток-мишеней, значение EC_{50} биспецифической конструкции антитела к ВСМАхCD3 предпочтительно составляет ≤ 2000 пМ или ≤ 1500 пМ, более предпочтительно ≤ 1000 пМ или ≤ 500 пМ, даже более предпочтительно ≤ 300 пМ или ≤ 250 пМ, даже более предпочтительно ≤ 100 пМ и наиболее предпочтительно ≤ 50 пМ.

Предпочтительно биспецифические конструкции антител к ВСМАхCD3 согласно данному изобретению не индуцируют/не опосредуют лизис или практически не индуцируют/не опосредуют лизис ВСМА-отрицательных клеток, таких как клетки CHO или клетки HL60, MES-SA или SNU-16. Термин "не индуцирует лизис", "практически не индуцирует лизис", "не опосредует лизис" или "практически не опосредует лизис" означает, что конструкция антитела согласно данному изобретению не индуцирует или не опосредует лизис более чем 30%, предпочтительно не более 20%, предпочтительнее не более 10%, в особенности предпочтительно не более 9, 8, 7, 6 или 5% ВСМА-отрицательных клеток, при этом лизис ВСМА-положительной человеческой клеточной линии установлен как 100%. Это обычно соответствует концентрациям конструкции антитела до 500 нМ. Специалисту известно, как определить клеточный лизис без лишних усилий. Кроме того, в данном описании приведены конкретные инструкции для определения клеточного лизиса.

Разница между цитотоксической активностью мономерной и димерной изоформы отдельных биспецифических конструкций антител к ВСМАхCD3 называется "разностью в активности". Эту разность в активности можно рассчитать, например, как отношение между значениями EC_{50} мономерной и димерной формы молекулы. Разность в активности биспецифических конструкций антител к ВСМАхCD3 согласно данному изобретению предпочтительно составляет ≤ 5 , более предпочтительно ≤ 4 , даже более предпочтительно ≤ 3 , даже более предпочтительно ≤ 2 и наиболее предпочтительно ≤ 1 .

Первый и/или второй (или любой дополнительный) связывающий домен конструкции антитела согласно изобретению предпочтительно отличается межвидовой специфичностью для представителей приматов их класса млекопитающих. Отличающиеся межвидовой специфичностью CD3-связывающие домены описаны, например, в WO 2008/119567. В соответствии с одним вариантом реализации изобретения первый и/или второй связывающий домен, помимо связывания с человеческим ВСМА и человеческим CD3 соответственно, также связывается с ВСМА/CD3 приматов, включая (но не ограничиваясь этим) приматов Нового Света (таких как *Callithrix jacchus*, *Saguinus Oedipus* или *Saimiri sciureus*), приматов Старого Света (таких как бабуины и макаки), гиббонов и отличных от человека *homininae*.

В одном варианте реализации конструкции антитела в соответствии с изобретением первый домен связывается с ВСМА человека и дополнительно связывается с ВСМА макака, таким как ВСМА *Masaca fascicularis*, и более предпочтительно с ВСМА макака, экспрессируемым на поверхности клеток макака. Аффинность первого домена в отношении ВСМА, предпочтительно в отношении ВСМА человека, предпочтительно составляет ≤ 100 нМ или ≤ 50 нМ, более предпочтительно ≤ 25 нМ или ≤ 20 нМ, более предпочтительно ≤ 15 нМ или ≤ 10 нМ, даже более предпочтительно ≤ 5 нМ, даже более предпочтительно $\leq 2,5$ нМ или ≤ 2 нМ, даже более предпочтительно ≤ 1 нМ, даже более предпочтительно $\leq 0,6$ нМ, даже более предпочтительно $\leq 0,5$ нМ и наиболее предпочтительно $\leq 0,4$ нМ. Аффинность можно определить, например, в анализе ВІАсоге или в анализе Скэтчарда. Специалистам также хорошо известны другие способы

определения аффинности. Аффинность первого домена в отношении ВСМА макака предпочтительно составляет ≤ 15 нМ, более предпочтительно ≤ 10 нМ, даже более предпочтительно ≤ 5 нМ, даже более предпочтительно ≤ 1 нМ, даже более предпочтительно $\leq 0,5$ нМ, даже более предпочтительно $\leq 0,1$ нМ и наиболее предпочтительно $\leq 0,05$ нМ или даже $\leq 0,01$ нМ.

Предпочтительно разность в аффинности конструкций антител в соответствии с изобретением в отношении связывания ВСМА макака по сравнению с ВСМА человека [та ВСМА: hu ВСМА] (определяемая, например, в анализе BiaCore или анализе Скэтчарда) составляет < 100 , предпочтительно < 20 , более предпочтительно < 15 , предпочтительнее < 10 , даже более предпочтительно < 8 , более предпочтительно < 6 и наиболее предпочтительно < 2 . Предпочтительные диапазоны разности в аффинности конструкций антител в соответствии с изобретением в отношении связывания ВСМА макака по сравнению с ВСМА человека составляют от 0,1 до 20, более предпочтительно от 0,2 до 10, даже более предпочтительно от 0,3 до 6, даже более предпочтительно от 0,5 до 3 или от 0,5 до 2,5 и наиболее предпочтительно от 0,5 до 2 или от 0,6 до 2.

Второй домен конструкции антитела согласно изобретению связывается с CD3 эпислон человека и/или CD3 эпислон Масаса. В предпочтительном варианте реализации изобретения второй домен дополнительно связывается с CD3 эпислон *Callithrix jacchus*, *Saguinus Oedipus* или *Saimiri sciureus*. *Callithrix jacchus* и *Saguinus oedipus* являются приматами нового Света, принадлежащими к семейству *Callitrichidae*, тогда как *Saimiri sciureus* является приматом Нового Света, принадлежащим семейству *Cebidae*.

Для конструкции антитела согласно данному изобретению предпочтительно, чтобы второй домен, который связывается с внеклеточным эпитопом цепи CD3 эпислон человека и/или Масаса, содержал VL-область, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, выбранные из:

(a) CDR-L1, приведенной в SEQ ID NO: 27 в WO 2008/119567, CDR-L2, приведенной в SEQ ID NO: 28 в WO 2008/119567, и CDR-L3, приведенной в SEQ ID NO: 29 в WO 2008/119567;

(b) CDR-L1, приведенной в SEQ ID NO: 117 в WO 2008/119567, CDR-L2, приведенной в SEQ ID NO: 118 в WO 2008/119567, и CDR-L3, приведенной в SEQ ID NO: 119 в WO 2008/119567; и

(c) CDR-L1, приведенной в SEQ ID NO: 153 в WO 2008/119567, CDR-L2, приведенной в SEQ ID NO: 154 в WO 2008/119567, и CDR-L3, приведенной в SEQ ID NO: 155 в WO 2008/119567.

В дополнительном предпочтительном варианте реализации конструкции антитела согласно данному изобретению второй домен, который связывается с внеклеточным эпитопом цепи CD3 эпислон человека и/или Масаса, содержит VH-область, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, выбранные из:

(a) CDR-H1, приведенной в SEQ ID NO: 12 в WO 2008/119567, CDR-H2, приведенной в SEQ ID NO: 13 в WO 2008/119567, и CDR-H3, приведенной в SEQ ID NO: 14 в WO 2008/119567;

(b) CDR-H1, приведенной в SEQ ID NO: 30 в WO 2008/119567, CDR-H2, приведенной в SEQ ID NO: 31 в WO 2008/119567, и CDR-H3, приведенной в SEQ ID NO: 32 в WO 2008/119567;

(c) CDR-H1, приведенной в SEQ ID NO: 48 в WO 2008/119567, CDR-H2, приведенной в SEQ ID NO: 49 в WO 2008/119567, и CDR-H3, приведенной в SEQ ID NO: 50 в WO 2008/119567;

(d) CDR-H1, приведенной в SEQ ID NO: 66 в WO 2008/119567, CDR-H2, приведенной в SEQ ID NO: 67 в WO 2008/119567, и CDR-H3, приведенной в SEQ ID NO: 68 в WO 2008/119567;

(e) CDR-H1, приведенной в SEQ ID NO: 84 в WO 2008/119567, CDR-H2, приведенной в SEQ ID NO: 85 в WO 2008/119567, и CDR-H3, приведенной в SEQ ID NO: 86 в WO 2008/119567;

(f) CDR-H1, приведенной в SEQ ID NO: 102 в WO 2008/119567, CDR-H2, приведенной в SEQ ID NO: 103 в WO 2008/119567, и CDR-H3, приведенной в SEQ ID NO: 104 в WO 2008/119567;

(g) CDR-H1, приведенной в SEQ ID NO: 120 в WO 2008/119567, CDR-H2, приведенной в SEQ ID NO: 121 в WO 2008/119567, и CDR-H3, приведенной в SEQ ID NO: 122 в WO 2008/119567;

(h) CDR-H1, приведенной в SEQ ID NO: 138 в WO 2008/119567, CDR-H2, приведенной в SEQ ID NO: 139 в WO 2008/119567, и CDR-H3, приведенной в SEQ ID NO: 140 в WO 2008/119567;

(i) CDR-H1, приведенной в SEQ ID NO: 156 в WO 2008/119567, CDR-H2, приведенной в SEQ ID NO: 157 в WO 2008/119567, и CDR-H3, приведенной в SEQ ID NO: 158 в WO 2008/119567; и

(j) CDR-H1, приведенной в SEQ ID NO: 174 в WO 2008/119567, CDR-H2, приведенной в SEQ ID NO: 175 в WO 2008/119567, и CDR-H3, приведенной в SEQ ID NO: 176 в WO 2008/119567.

В предпочтительном варианте реализации конструкции антитела согласно изобретению описанные выше три группы VL CDR комбинируют с описанными выше десятью группами VH CDR в рамках второго связывающего домена для получения (30) групп, каждая из которых содержит CDR-L 1-3 и CDR-H 1-3.

Для конструкции антитела согласно данному изобретению предпочтительно, чтобы второй домен, который связывается с CD3, содержал VL-область, выбранную из группы, состоящей из приведенных в SEQ ID NO: 17, 21, 35, 39, 53, 57, 71, 75, 89, 93, 107, 111, 125, 129, 143, 147, 161, 165, 179 или 183 в WO 2008/119567, или приведенной в SEQ ID NO: 13.

Также предпочтительно, чтобы второй домен, который связывается с CD3, содержал VH-область, выбранную из группы, состоящей из приведенных в SEQ ID NO: 15, 19, 33, 37, 51, 55, 69, 73, 87, 91, 105, 109, 123, 127, 141, 145, 159, 163, 177 или 181 в WO 2008/119567, или приведенной в SEQ ID NO: 14.

Более предпочтительно конструкция антитела согласно данному изобретению характеризуется вторым доменом, который связывается с CD3, содержащим VL-область и VH-область, выбранные из группы, состоящей из:

- (a) VL-области, приведенной в SEQ ID NO: 17 или 21 в WO 2008/119567, и VH-области, приведенной в SEQ ID NO: 15 или 19 в WO 2008/119567;
- (b) VL-области, приведенной в SEQ ID NO: 35 или 39 в WO 2008/119567, и VH-области, приведенной в SEQ ID NO: 33 или 37 в WO 2008/119567;
- (c) VL-области, приведенной в SEQ ID NO: 53 или 57 в WO 2008/119567, и VH-области, приведенной в SEQ ID NO: 51 или 55 в WO 2008/119567;
- (d) VL-области, приведенной в SEQ ID NO: 71 или 75 в WO 2008/119567, и VH-области, приведенной в SEQ ID NO: 69 или 73 в WO 2008/119567;
- (e) VL-области, приведенной в SEQ ID NO: 8 9 или 93 в WO 2008/119567, и VH-области, приведенной в SEQ ID NO: 87 или 91 в WO 2008/119567;
- (f) VL-области, приведенной в SEQ ID NO: 107 или 111 в WO 2008/119567, и VH-области, приведенной в SEQ ID NO: 105 или 109 в WO 2008/119567;
- (g) VL-области, приведенной в SEQ ID NO: 125 или 129 в WO 2008/119567, и VH-области, приведенной в SEQ ID NO: 123 или 127 в WO 2008/119567;
- (h) VL-области, приведенной в SEQ ID NO: 143 или 147 в WO 2008/119567, и VH-области, приведенной в SEQ ID NO: 141 или 145 в WO 2008/119567;
- (i) VL-области, приведенной в SEQ ID NO: 161 или 165 в WO 2008/119567, и VH-области, приведенной в SEQ ID NO: 159 или 163 в WO 2008/119567; и
- (j) VL-области, приведенной в SEQ ID NO: 179 или 183 в WO 2008/119567, и VH-области, приведенной в SEQ ID NO: 177 или 181 в WO 2008/119567.

Также в связи с конструкцией антитела согласно данному изобретению предпочтительно, чтобы второй домен, который связывается с CD3, содержал VL-область, приведенную в SEQ ID NO: 13, и VH-область, приведенную в SEQ ID NO: 14.

В соответствии с предпочтительным вариантом конструкции антитела согласно данному изобретению первый и/или второй домен имеют следующий формат: пары VH-областей и VL-областей имеют формат одноцепочечного антитела (scFv). VH- и VL-области расположены в порядке VH-VL или VL-VH. Предпочтительно, чтобы VH-область была расположена N-терминально по отношению к линкерной последовательности, а VL-область была расположена C-терминально по отношению к линкерной последовательности.

Предпочтительный вариант описанной выше конструкции антитела согласно данному изобретению характеризуется вторым доменом, который связывается с CD3, содержащим аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23, 25, 41, 43, 59, 61, 77, 79, 95, 97, 113, 115, 131, 133, 149, 151, 167, 169, 185 или 187 в WO 2008/119567, или приведенной в SEQ ID NO: 15.

Также подразумевается, что первый связывающий домен конструкции антитела согласно изобретению содержит VL-область, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-область, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-3, выбранные из группы, состоящей из: (a) CDR-L1, приведенной в SEQ ID NO: 48, CDR-L2, приведенной в SEQ ID NO: 49, CDR-L3, приведенной в SEQ ID NO: 50, CDR-H1, приведенной в SEQ ID NO: 45, CDR-H2, приведенной в SEQ ID NO: 46, и CDR-H3, приведенной в SEQ ID NO: 47; (b) CDR-L1, приведенной в SEQ ID NO: 66, CDR-L2, приведенной в SEQ ID NO: 67, CDR-L3, приведенной в SEQ ID NO: 68, CDR-H1, приведенной в SEQ ID NO: 63, CDR-H2, приведенной в SEQ ID NO: 64, и CDR-H3, приведенной в SEQ ID NO: 65; и (c) CDR-L1, приведенной в SEQ ID NO: 84, CDR-L2, приведенной в SEQ ID NO: 85, CDR-L3, приведенной в SEQ ID NO: 86, CDR-H1, приведенной в SEQ ID NO: 81, CDR-H2, приведенной в SEQ ID NO: 82, и CDR-H3, приведенной в SEQ ID NO: 83.

Дополнительно подразумевается, что первый связывающий домен конструкции антитела согласно изобретению содержит VH-область и VL-область, выбранные из группы, состоящей из: (a) VH-области, приведенной в SEQ ID NO: 51, и VL-области, приведенной в SEQ ID NO: 52; (b) VH-области, приведенной в SEQ ID NO: 57, и VL-области, приведенной в SEQ ID NO: 58; (c) VH-области, приведенной в SEQ ID NO: 69, и VL-области, приведенной в SEQ ID NO: 70; (d) VH-области, приведенной в SEQ ID NO: 75, и VL-области, приведенной в SEQ ID NO: 76; (e) VH-области, приведенной в SEQ ID NO: 87, и VL-области, приведенной в SEQ ID NO: 88; и (f) VH-области, приведенной в SEQ ID NO: 93, и VL-области, приведенной в SEQ ID NO: 94.

Дополнительно подразумевается, что первый связывающий домен конструкции антитела согласно изобретению содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из приведенных в SEQ ID NO: 53, 59, 71, 77, 89 или 95.

Ковалентные модификации конструкций антител также включены в объем этого изобретения и в целом, но не всегда, проводятся после трансляции. Например, несколько типов ковалентных модификаций конструкции антитела вносят в молекулу посредством проведения реакции между конкретными аминокислотными остатками конструкции антитела с органическим дериватизирующим агентом, который способен вступать в реакцию с избранными боковыми цепями N- или C-концевых остатков.

Остатки цистеинила наиболее часто приводят в реакцию с α -галоацетатами (и соответствующими аминами), такими как хлоруксусная кислота или хлорацетамид, чтобы получить карбоксиметильные или карбоксиамидометильные производные.

Остатки цистеинила также дериватизируют путем проведения реакции с бромтрифторацетоном, α -бром- β -(5-имидозоил)пропионовой кислотой, хлорацетилфосфатом, N-алкилмалеимидами, 3-нитро-2-пиридилдисульфидом, метил-2-пиридилдисульфидом, п-хлорртутьбензоатом, 2-хлорртуть-4-нитрофенолом или хлор-7-нитробензо-2-окса-1,3-диазолом.

Остатки гистидила дериватизируют путем проведения реакции с диэтилпиокарбонатом при pH 5,5-7,0, так как этот агент является относительно специфическим в отношении боковой цепи гистидила. Также используют пара-бромфенацилбромид; реакцию предпочтительно проводят в 0,1М какодилате натрия при pH 6,0. Остатки лизинила и аминоконцевые остатки приводят в реакцию с янтарным ангидридом или ангидридами других карбоновых кислот. Дериватизация этими агентами приводит к изменению заряда остатков лизинила на противоположный. Другие подходящие агенты для дериватизации α -аминосодержащих остатков включают сложные имидоэфиры, такие как пиколинимидат; пиридоксальфосфат; пиридоксаль; хлорборгидрид; тринитробензенсульфоновую кислоту; O-метилизомочевину; 2,4-пентандион; и катализируемую трансаминазой реакцию с глиоксилатом.

Остатки аргинила модифицируют путем проведения реакции с одним из нескольких традиционных реагентов, среди которых фенилглиоксаль, 2,3-бутандион, 1,2-циклогександион и нингидрин. Для дериватизации остатков аргинина требуется, чтобы реакция проводилась в щелочных условиях из-за высокого значения pKa функциональной группы гуанидина. Кроме того, эти реагенты могут вступать в реакцию с группами лизина, а также ϵ -аминогруппой аргинина.

Можно осуществлять специфическую модификацию остатков тирозила, при этом особенный интерес представляет внесение спектральных меток в остатки тирозила путем проведения реакции с ароматическими соединениями диазония или тетранитрометаном. Наиболее часто используют N-ацетилимидзол и тетранитрометан для получения молекул O-ацетилтирозила и 3-нитропроизводных соответственно. Остатки тирозила йодируют, используя ^{125}I или ^{131}I , чтобы получить меченые белки для применения в радиоиммуноанализе, при этом подходит описанный выше метод с применением хлорамина Т.

Карбоксильные боковые группы (аспартильные или глутамильные) избирательно модифицируют путем проведения реакции с карбодиимидами ($\text{R}'\text{-N}=\text{C}=\text{N}-\text{R}'$), где R и R' представляют собой необязательно разные алкильные группы, такие как 1-циклогексил-3-(2-морфолинил-4-этил)карбодиимид или 1-этил-3-(4-азония-4,4-диметилпентил)карбодиимид. Кроме того, аспартильные и глутамильные остатки преобразуют в аспарагинильные и глутаминильные остатки путем проведения реакции с ионами аммония.

Дериватизацию бифункциональными агентами используют для перекрестного сшивания конструкций антител согласно изобретению с нерастворимой в воде иммобилизирующей матрицей или поверхностью для применения в различных способах. Обычно применяемые перекрестно-сшивающие агенты включают, например, 1,1-бис(диазоацетил)-2-фенилэтан, глутаральдегид, сложные N-гидроксисукцинимидные эфиры, например сложные эфиры с 4-азидосалициловой кислотой, гомобифункциональные сложные имидоэфиры, включая дисукцинимидиловые сложные эфиры, такие как 3,3'-дитиобис(сукцинимидилпропионат), и бифункциональные малеимиды, такие как бис-N-малеимидо-1,8-октан. Дериватирующие агенты, такие как метил-3-[(п-азидофенил)дитио]пропиоимидат, позволяют получать фотоактивируемые промежуточные соединения, которые способны образовывать перекрестные связи в присутствии света. В альтернативном варианте для иммобилизации белков применяют реактивные нерастворимые в воде матрицы, такие как активируемые цианогенбромидом углеводы, и реактивные субстраты, описанные в патентах США № 3969287; 3691016; 4195128; 4247642; 4229537; и 4330440.

Остатки глутаминила часто деамидируют до соответствующих остатков глутамина и аспартила соответственно. В альтернативном варианте эти остатки деамидируют в умеренных кислых условиях. Любая форма этих остатков попадает в объем этого изобретения.

Другие модификации включают гидроксирование пролина и лизина, фосфорилирование гидроксильных групп остатков серила или треонина, метилирование α -аминогрупп боковых цепей лизина, аргинина и гистидина (T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, pp. 79-86), ацетилирование N-концевого амина и амидирование любой C-концевой карбоксильной группы.

Другой тип ковалентной модификации конструкций антител, включенный в объем этого изобретения, включает изменение профиля гликозилирования белка. Как известно в данной области техники, профили гликозилирования могут зависеть как от последовательности белка (например, наличия или отсутствия конкретных аминокислотных остатков гликозилирования, что обсуждается ниже), так и от клетки-хозяина или организма, в которых вырабатывается белок. Конкретные экспрессионные системы обсуждаются ниже.

Гликозилирование полипептидов, как правило, бывает N-связанным или O-связанным. N-связанное гликозилирование относится к присоединению углеводного компонента к боковой цепи остатка аспарагина. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X является лю-

бой аминокислотой за исключением пролина, представляют собой последовательности распознавания для ферментативного присоединения углеводного компонента к боковой цепи аспарагина. Таким образом, наличие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный участок гликозилирования. О-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксиаминокислоте, наиболее часто серину или треонину, хотя также можно использовать 5-гидроксипролин или 5-гидроксизин.

Добавление участков гликозилирования в конструкцию антитела удобно осуществлять путем изменения аминокислотной последовательности так, чтобы она содержала одну или более из вышеописанных трипептидных последовательностей (для участков N-связанного гликозилирования). Изменение также можно проводить путем добавления или замены одним или более остатками серина или треонина в стартовой последовательности (для участков О-связанного гликозилирования). Для удобства аминокислотную последовательность конструкции антитела предпочтительно изменяют посредством изменений на уровне ДНК, в частности мутируя ДНК, кодирующую полипептид, в предварительно выбранных основаниях, так чтобы создать кодоны, которые будут транслироваться в необходимые аминокислоты.

Другим средством повышения числа углеводных компонентов на конструкции антитела является химическое или ферментативное сопряжение гликозидов с белком. Преимущество этих процедур состоит в том, что для них не требуется выработка белка в клетке-хозяине, в которой существует возможность для N- и О-связанного гликозилирования. В зависимости от применяемого способа сопряжения сахар (а) можно присоединять к (а) аргинину и гистидину, (b) свободным карбоксильным группам, (с) свободным сульфгидрильным группам, таким как в цистеине, (d) свободным гидроксильным группам, таким как в серине, треонине или гидроксипролине, (е) ароматическим остаткам, таким как в фенилаланине, тирозине или триптофане, или (f) амидной группе глутамина. Эти способы описаны в WO 87/05330 и в Aplin and Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306.

Удаление углеводных компонентов, присутствующих в исходной конструкции антитела, можно осуществлять химическим или ферментативным способом. Для химического дегликозилирования необходимо воздействие на белок соединения трифторметансульфоновой кислоты или эквивалентного соединения. Такая обработка приводит к отщеплению большинства или всех сахаров за исключением связующего сахара (N-ацетилглюкозамина или N-ацетилгалактозамина), при этом оставляя полипептид нетронутым. Химическое дегликозилирование описано в Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 и в Edge et al., 1981, Anal. Biochem. 118:131. Ферментативное отщепление углеводных компонентов на полипептидах можно обеспечить путем применения различных эндо- и экзогликозидаз, как описано в Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138:350. Гликозилирование в потенциальных участках гликозилирования можно предотвратить путем применения соединения туникамицина, как описано в Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:3105. Туникамицин блокирует образование связей белок-N-гликозид.

Другие модификации конструкции антитела также предусмотрены в данном документе. Например, другой тип ковалентной модификации конструкции антитела включает связывание конструкции антитела с различными небелковыми полимерами, включая, но не ограничиваясь этим, различные полиолы, такие как полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, полиоксикалклены или сополимеры полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля, так как это описано в патентах США № 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 или 4179337. Кроме того, как известно в данной области техники, можно проводить аминокислотные замены в различных позициях в конструкции антитела, например, чтобы облегчить добавление полимеров, таких как ПЭГ.

В некоторых вариантах реализации изобретения ковалентная модификация конструкций антител согласно изобретению включает добавление одной или более меток. Метящая группа может быть сопряжена с конструкцией антитела посредством спейсерных ножек различной длины для снижения потенциального стерического несоответствия. В данной области техники известны различные способы мечения белков, которые можно применять при осуществлении данного изобретения. Термин "метка" или "метящая группа" относится к любой выявляемой метке. В общем случае метки делятся на множество классов в зависимости от метода анализа, в котором предполагается их выявление; следующие примеры включают, но не ограничиваются этим:

- а) изотопные метки, которые могут представляться собой радиоактивные или тяжелые изотопы, такие как радиоизотопы или радионуклиды (например, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{89}Zr , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I);
- б) магнитные метки (например, магнитные частицы);
- с) редокс-активные компоненты;
- д) оптические красители (включая, но не ограничиваясь этим, хромофоры, люминофоры и флуорофоры), такие как флуоресцентные группы (например, ФИТЦ, родамин, люминофоры на основе комплексов лантанидов), хемилюминесцентные группы и флуорофоры, которые могут представлять собой как "низкомолекулярные" флуорофоры, так и белковые флуорофоры;
- е) ферментативные группы (например, пероксидазу хрена, β -галактозидазу, люциферазу, щелочную фосфатазу);
- ф) биотинилированные группы;
- г) предопределенные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например,

парные последовательности лейциновых молний, участки связывания для вторичных антител, металл-связывающие домены, эпитопные метки и т.д.)

Под "флуоресцентной меткой" подразумевается любая молекула, которую можно выявить благодаря свойственным ей флуоресцентным свойствам. Подходящие флуоресцентные метки включают, но не ограничиваются этим, флуоресцеин, родамин, тетраметилродамин, эозин, эритрозин, кумарин, метилкумарины, пирен, малахитовый зеленый, стильбен, желтый люцифер, голубой каскад J, Техасский красный, IAEDANS, EDANS, BODIPY FL, LC Red 640, Cy 5, Cy 5.5, LC Red 705, зеленый Орегон, красители Alexa-Fluor (Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680), голубой каскад, желтый каскад и R-фикоэритрин (PE) (Molecular Probes, Eugene, OR), ФИТЦ, родамин и Техасский красный (Pierce, Rockford, IL), Cy5, Cy5.5, Cy7 (Amersham Life Science, Pittsburgh, PA). Подходящие оптические красители, включая флуорофоры, описаны в *Molecular Probes Handbook* by Richard P. Haugland.

Подходящие белковые флуоресцентные метки также включают, но не ограничиваются этим, зеленый флуоресцентный белок, включая виды ЗФБ Renilla, Ptilosarcus или Aequorea (Chalfie et al., 1994, Science 263:802-805), УЗФБ (Clontech Laboratories, Inc., номер доступа Genbank U55762), синий флуоресцентный белок (BFP, Quantum Biotechnologies, Inc. 1801 de Maisonneuve Blvd. West, 8th Floor, Montreal, Quebec, Canada H3N 1J9; Stauber, 1998, Biotechniques 24:462-471; Heim et al., 1996, Curr. Biol. 6:178-182), усиленный желтый флуоресцентный белок (УЖФБ, Clontech Laboratories, Inc.), люциферазу (Ichiki et al., 1993, J. Immunol. 150:5408-5417), β -галактозидазу (Nolan et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2603-2607) и Renilla (WO 92/15673, WO 95/07463, WO 98/14605, WO 98/26277, WO 99/49019, патенты США № 5292658; 5418155; 5683888; 5741668; 5777079; 5804387; 5874304; 5876995; 5925558).

Конструкция антитела согласно изобретению также может содержать дополнительные домены, которые, например, помогают при выделении молекулы или имеют отношение к адаптированному фармакокинетическому профилю молекулы. Домены, которые помогают при выделении конструкции антитела, могут быть выбраны из пептидных мотивов или вторично внесенных компонентов, которые могут быть захвачены в способе выделения, например, в колонке для выделения. Неограничивающие варианты реализации таких дополнительных доменов включают пептидные мотивы, известные как Мус-метка, НАТ-метка, НА-метка, ТАР-метка, GST-метка, хитин-связывающий домен (CBD-метка), мальтоза-связывающий белок (MBP-метка), Flag-метка, Strep-метка и ее варианты (например, StrepII-метка) и His-метка. Описанные в данном документе конструкции антител могут содержать домен His-метки, который в общем случае известен как повтор последовательных остатков His в аминокислотной последовательности молекулы, предпочтительно из пяти, и более предпочтительно из шести остатков His (гексакистидин). His-метка может быть расположена, например, в N- или C-конце конструкции антитела, предпочтительно она располагается в C-конце. Наиболее предпочтительно гексакистидиновая метка (HHHHHH) (SEQ ID NO:16) связана посредством пептидной связи с C-концом конструкции антитела в соответствии с изобретением. Кроме того, с поли-гистидиновой меткой можно комбинировать конъюгатную систему ПЛГК-ПЭГ-ПЛГК для применений с замедленным высвобождением и улучшения фармакокинетического профиля.

Также предполагаются модификации аминокислотных последовательностей описанных в данном документе конструкций антител. Например, может требоваться улучшение аффинности связывания и/или других биологических свойств конструкции антитела. Варианты аминокислотных последовательностей конструкций антител получают, внося соответствующие нуклеотидные изменения в нуклеиновые кислоты конструкций антител, или путем пептидного синтеза. Все описанные ниже модификации аминокислотных последовательностей должны приводить к получению конструкции антитела, которая сохраняет необходимую биологическую активность (связывание с BCMA и с CD3) немодифицированной родительской молекулы.

Термин "аминокислота" или "аминокислотный остаток", как правило, относится к аминокислоте, имеющей известное в данной области техники определение, такой как аминокислота, выбранная из группы, состоящей из: аланина (Ala или A); аргинина (Arg или R); аспарагина (Asn или N); аспарагиновой кислоты (Asp или D); цистеина (Cys или C); глутамина (Gln или Q); глутаминовой кислоты (Glu или E); глицина (Gly или G); гистидина (His или H); изолейцина (Ile или I); лейцина (Leu или L); лизина (Lys или K); метионина (Met или M); фенилаланина (Phe или F); пролина (Pro или P); серина (Ser или S); треонина (Thr или T); триптофана (Trp или W); тирозина (Tyr или Y); и валина (Val или V), хотя модифицированные, синтетические или редкие аминокислоты можно использовать в случае необходимости. В общем случае аминокислоты можно разделить на группы, имеющие неполярную боковую цепь (например, Ala, Cys, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Val); отрицательно заряженную боковую цепь (например, Asp, Glu); положительно заряженную боковую цепь (например, Arg, His, Lys); или незаряженную полярную боковую цепь (например, Asn, Cys, Gln, Gly, His, Met, Phe, Ser, Thr, Trp и Tyr).

Аминокислоты модификации включают, например, делеции из и/или вставки в, и/или замены остатков в пределах аминокислотных последовательностей конструкций антител. Для получения конечной конструкции осуществляют любую комбинацию из делеции, вставки и замены, при условии, что конечная конструкция обладает необходимыми характеристиками. Аминокислотные изменения также могут

менять посттрансляционные процессы конструкций антител, такие как изменение числа или позиции участков гликозилирования.

Например, можно проводить вставку, замену или делецию 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислот в каждой из CDR (конечно, в зависимости от их длины), тогда как в каждой из FR можно проводить вставку, замену или делецию 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 25 аминокислот. Предпочтительно вставки аминокислотной последовательности в конструкцию антитела включают аминокислоты и/или карбоксиконцевые слияния длиной в диапазоне 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 остатков в полипептидах, содержащих сто или более остатков, а также вставки одного или нескольких аминокислотных остатков внутри последовательности. Соответствующие модификации также можно проводить в пределах третьего домена конструкции антитела согласно изобретению. Инсерционный вариант конструкции антитела согласно изобретению включает слияние фермента с N-концом или с C-концом конструкции антитела или слияние с полипептидом.

Представляющие наибольший интерес для заместительного мутагенеза остатки включают (не ограничиваются этим) CDR тяжелой и/или легкой цепи, в частности гипервариабельные области, но также предполагаются изменения FR в тяжелой и/или легкой цепи. Замены предпочтительно представляют собой консервативные замены, описанные в данном документе. Предпочтительно можно проводить замену 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот в CDR, тогда как в каркасных областях (FR) можно проводить замену 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 25 аминокислот, в зависимости от длины CDR или FR. Например, если последовательность CDR включает в себя 6 аминокислот, подразумевается возможность замены одной, двух или трех из этих аминокислот. Аналогично, если последовательность CDR включает в себя 15 аминокислот, подразумевается возможность замены одной, двух, трех, четырех, пяти или шести из этих аминокислот.

Полезный способ идентификации определенных остатков или областей конструкций антител, которые являются предпочтительными участками для мутагенеза, называется "аланин-сканирующим мутагенезом" и описан в Cunningham and Wells in Science, 244: 1081-1085 (1989). В данном случае определяют остаток или группу целевых остатков в пределах конструкции антитела (например, заряженных остатков, таких как arg, asp, his, lys и glu) и замещают нейтральной или отрицательно заряженной аминокислотой (наиболее предпочтительно аланином или полиаланином) для воздействия на взаимодействие аминокислот с эпитопом.

Затем те аминокислотные участки, которые демонстрируют функциональную чувствительность к заменам, корректируют, внося дополнительные или другие варианты в участках замен или для них. Таким образом, хотя участок или область для внесения вариации в аминокислотную последовательность predetermined, природа мутации per se не должна быть predetermined. Например, чтобы проанализировать или оптимизировать характеристики мутации в данном участке, можно провести аланин-сканирующий или случайный мутагенез в целевом кодоне или участке и провести скрининг экспрессируемых вариантов конструкции антитела в отношении оптимальной комбинации необходимой активности. Методики осуществления заместительных мутаций в predetermined участках в ДНК с известной последовательностью, хорошо известны, например, это мутагенез с праймером M13 и ПЦР-мутагенез. Скрининг мутантов проводят, применяя анализ антигенсвязывающей активности, например связывания BCMA или CD3.

В общем случае, если замена аминокислот проведена в одной или более, или во всех CDR тяжелой и/или легкой цепи, предпочтительно, чтобы полученная "замещенная" последовательность была по меньшей мере на 60 или 65%, более предпочтительно на 70 или 75%, даже более предпочтительно на 80 или 85% и в особенности предпочтительно на 90 или 95% идентичной "оригинальной" последовательности CDR. Это означает, что от длины CDR зависит, в какой степени она идентична "замещенной" последовательности. Например, CDR, содержащая 5 аминокислот, предпочтительно является на 80% идентичной своей замещенной последовательности, чтобы по меньшей мере одна аминокислота была заменена. Соответственно, CDR конструкции антитела могут иметь разную степень идентичности со своими замещенными последовательностями, например CDRL1 может иметь 80%, тогда как CDRL3 может иметь 90%.

Предпочтительные замены (замещения) представляют собой консервативные замены. При этом подразумевается возможность любой замены (включая неконсервативную замену или одну или более из "типовых замен", перечисленных в табл. 3, ниже) при условии, что конструкция антитела сохраняет свою способность связываться с BCMA посредством первого домена и с CD3 эпсилон посредством второго домена, и/или ее CDR имеют идентичность с замещенной последовательностью (по меньшей мере на 60 или 65%, более предпочтительно на 70 или 75%, даже более предпочтительно на 80 или 85% и в особенности предпочтительно на 90 или 95% идентичны "оригинальной" последовательности CDR).

Консервативные замены приведены в табл. 3 под заголовком "предпочтительные замены". Если такие замены приводят к изменению биологической активности, тогда можно вносить более существенные изменения, обозначенные в табл. 3 как "типовые замены" или дополнительно описанные ниже с привязкой к классам аминокислот, а продукты исследовать в отношении необходимой характеристики.

Таблица 3. Аминокислотные замены

Оригинал	Типовые замены	Предпочтительные замены
Ala (A)	val, leu, ile	val
Arg (R)	lys, gln, asn	lys
Asn (N)	gln, his, asp, lys, arg	gln
Asp (D)	glu, asn	glu
Cys (C)	ser, ala	ser
Gln (Q)	asn, glu	asn
Glu (E)	asp, gln	asp
Gly (G)	Ala	ala
His (H)	asn, gln, lys, arg	arg
Ile (I)	leu, val, met, ala, phe	leu
Leu (L)	norleucine, ile, val, met, ala	ile
Lys (K)	arg, gln, asn	arg
Met (M)	leu, phe, ile	leu
Phe (F)	leu, val, ile, ala, tyr	tyr
Pro (P)	Ala	ala
Ser (S)	Thr	thr
Thr (T)	Ser	ser
Trp (W)	tyr, phe	tyr
Tyr (Y)	trp, phe, thr, ser	phe
Val (V)	ile, leu, met, phe, ala	leu

Существенные модификации биологических свойств конструкции антитела согласно данному изобретению осуществляют, выбирая замены, которые существенно отличаются по своему действию на поддержание: (а) структуры полипептидного скелета в области замены, например, в виде слоя спиральной конформации; (б) заряда или гидрофобности молекулы в целевом участке; или (с) объема боковой цепи. Остатки природного происхождения делятся на группы на основании общих свойств боковых цепей: (1) гидрофобные: норлейцин, met, ala, val, leu, ile; (2) нейтральные гидрофильные: cys, ser, thr, asn, gln; (3) кислые: asp, glu; (4) основные: his, lys, arg; (5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: gly, pro; и (6) ароматические: trp, tyr, phe.

Неконсервативные замены включают замену представителя одного из этих классов представителем другого класса. Любой остаток цистеина, не принимающий участия в поддержании надлежащей конформации конструкции антитела, можно заменять, в общем случае, серином для улучшения устойчивости молекулы к окислению и предотвращения аберрантного перекрестного связывания. И наоборот, цистеиновую(ые) связь(и) можно добавлять в антитело для улучшения его стабильности (в частности, когда антитело представляет собой фрагмент антитела, такой как фрагмент Fv).

В случае аминокислотных последовательностей идентичность и/или сходство последовательностей определяют, используя стандартные методики, известные в данной области техники, включая, но не ограничиваясь этим, алгоритм локальной идентичности последовательностей Смита и Уотермана, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482, алгоритм выравнивания для определения идентичности последовательностей Нидлмана и Вунша, 1970, J. Mol. Biol. 48:443, метод поиска сходства Пирсона и Липмана, 1988, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444, компьютеризованные реализации этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.), программу для последовательностей Best Fit, описанную в Devereux et al., 1984, Nucl. Acid Res. 12:387-395, предпочтительно с применением установок по умолчанию или по усмотрению. Предпочтительно процент идентичности рассчитывают с помощью FastDB на основании следующих параметров: штраф за несовпадение 1; штраф за гэп 1; штраф за размер гэпа 0,33; и штраф за соединение 30, "Current Methods in Sequence Comparison and Analysis," Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, pp 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc.

Примером применимого алгоритма является PILEUP. PILEUP создает множественное выравнивание последовательностей из группы родственных последовательностей, используя прогрессивное, парное выравнивание. Также она может строить дерево, показывающее группирующие взаимосвязи, используемые для создания выравнивания. В PILEUP используется упрощение метода прогрессивного выравнивания Фенга и Дулиттла, 1987, J. Mol. Evol. 35:351-360; этот метод аналогичен описанному Хиггинсом и Шарпом, 1989, CABIOS 5:151-153. Применимые параметры PILEUP включают вес гэпа по умолчанию 3,00, вес продолжения гэпа по умолчанию 0,10, и взвешенные концевые гэпы.

Другим примером применяемого алгоритма является алгоритм BLAST, описанный в: Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; и Karin et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873-5787. В особенности применимой программой BLAST является программа WU-BLAST-2, которая была создана в соответствии с Altschul et al., 1996, Methods in Enzymology 266:460-480. В WU-BLAST-2 используется несколько поисковых параметров, значения большинства которых заданы по умолчанию. Корректируемые параметры установлены со следующими значениями: длина перекрытия=1, доля перекрытия=0,125, пороговая длина слова (T)=П. Параметры HSP S и HSP S2 являются динамическими значениями и устанавливаются самой программой в зависимости от состава конкретной последовательности и состава конкретной базы данных, по которой проводится поиск представляющей интерес последовательности; при этом данные значения могут быть скорректированы для повышения чувствительности.

Дополнительным применимым алгоритмом является BLAST с гэпами, описанный в Altschul et al., 1993, Nucl. Acids Res. 25:3389-3402. В BLAST с гэпами используется матрица оценок замен BLOSUM-62; пороговый параметр T установлен на 9; используется метод двух совпадений для инициации продления без гэпов, приписывается гэпам длиной к стоимости 10-k; X_i установлен на 16, и X_g установлен на 40 для стадии поиска по базе данных и на 67 для выходной стадии алгоритмов. Выравнивания с гэпами иницируются оценкой, соответствующей около 22 битам.

В общем случае аминокислотная гомология, сходство или идентичность между отдельными вариантами CDR или последовательностями VH/VL составляет по меньшей мере 60% с последовательностями, приведенными в данном документе, и, чаще с предпочтительно возрастающей гомологией или идентичностью, составляющей по меньшей мере 65 или 70%, более предпочтительно по меньшей мере 75 или 80%, даже более предпочтительно по меньшей мере 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 и почти 100%. Аналогичным образом "процент (%) идентичности нуклеотидных последовательностей" по отношению к нуклеотидной последовательности определенных в данном документе связывающих белков определяется как процентное содержание нуклеотидных остатков в кандидатной последовательности, которые являются идентичными с нуклеотидными остатками в кодирующей последовательности конструкции антитела. В конкретном методе используется модуль BLASTN из WU-BLAST-2 с установленными по умолчанию параметрами, с длиной перекрытия и долей перекрытия установленными на 1 и 0,125 соответственно.

В общем случае гомология, сходство или идентичность нуклеотидных последовательностей между нуклеотидными последовательностями, кодирующими отдельные варианты CDR или последовательности VH/VL, и нуклеотидными последовательностями, приведенными в данном документе, составляет по меньшей мере 60% и, чаще, с предпочтительно возрастающей гомологией или идентичностью, составляющей по меньшей мере 65, 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% и почти 100%. Таким образом, "вариантная CDR" или "вариантная область VH/VL" представляет собой область с конкретной гомологией, сходством или идентичностью с родительской CDR/VH/VL согласно изобретению и обладает биологической функцией, включая, но не ограничиваясь этим, по меньшей мере 60, 65, 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% специфичности и/или активности родительской CDR или VH/VL.

В одном варианте реализации изобретения процент идентичности с человеческой зародышевой линией конструкций антител в соответствии с изобретением составляет ≥ 70 или $\geq 75\%$, более предпочтительно ≥ 80 или $\geq 85\%$, даже более предпочтительно $\geq 90\%$ и наиболее предпочтительно ≥ 91 , ≥ 92 , ≥ 93 , ≥ 94 , ≥ 95 или даже $\geq 96\%$. Считается, что идентичность с генными продуктами человеческого антитела зародышевой линии является важным фактором для снижения риска того, что терапевтические белки будут вызывать иммунный ответ против лекарственного препарата у пациента во время лечения. Hwang & Foote ("Immunogenicity of engineered antibodies"; Methods 36 (2005) 3-10) продемонстрировали, что уменьшение нечеловеческих частей лекарственных конструкций антител приводит к снижению риска индукции антител против лекарственного препарата у пациентов во время лечения. При сравнении достаточного количества клинически оцененных лекарственных препаратов на основе антител и соответствующих данных по иммуногенности была выявлена тенденция, что гуманизация V-областей антител делает белки менее иммуногенными (в среднем для 5,1% пациентов), чем антитела, несущие неизмененные нечеловеческие V-области (в средней для 23,59% пациентов). Следовательно, для белковых терапевтических средств на основе V-области в форме конструкций антител необходима большая степень идентичности с человеческими последовательностями. С целью определения идентичности зародышевой линии можно проводить выравнивание V-областей VL с аминокислотными последовательностями V-сегментов и J-сегментов человеческой зародышевой линии (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>), используя программное обеспечение Vector NTI, и рассчитывать аминокислотную последовательность путем деления идентичных аминокислотных остатков на общее число аминокислотных остатков VL в процентах. То же самое можно осуществлять в отношении VH-сегментов (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) за исключением того, что VH CDR3 может быть исключена вследствие высокой степени разнообразия и отсутствия партнеров по выравниванию среди VH CDR3 человеческой зародышевой линии. Затем можно применять рекомби-

нантные технологии для повышения идентичности последовательностей с генами человеческого антитела зародышевой линии.

Дополнительно подразумевается, что биспецифические конструкции антител к ВСМАхCD3 согласно данному изобретению (практически) не связываются или не вступают в перекрестную реакцию с BAFF-R человека и/или TACI человека. Дополнительно подразумевается, что биспецифические конструкции антител к ВСМАхCD3 согласно данному изобретению (практически) не связываются или не вступают в перекрестную реакцию с BAFF-R макака/яванского макака и/или TACI макака/яванского макака.

В дополнительном варианте реализации биспецифические конструкции антител согласно данному изобретению демонстрируют высокий выход мономеров в стандартных условиях лабораторного масштаба, например, в условиях стандартного двухэтапного процесса очистки. Предпочтительно выход мономеров конструкций антител в соответствии с изобретением составляет $\geq 0,25$ мг/л супернатанта, более предпочтительно $\geq 0,5$ мг/л, даже более предпочтительно ≥ 1 мг/л и наиболее предпочтительно ≥ 3 мг/л супернатанта.

Аналогично, можно определить выход димерных изоформ конструкций антител и, следовательно, процентное содержание мономеров (т.е. мономер: (мономер+димер)) конструкций антител. Продуктивность мономерных и димерных конструкций антител и рассчитанное процентное содержание мономеров можно, например, получить на этапе ЭХ-очистки культурального супернатанта от стандартизированного производства в лабораторном масштабе в роллерных флаконах. В одном варианте реализации изобретения процентное содержание мономеров конструкций антител составляет $\geq 80\%$, более предпочтительно $\geq 85\%$, даже более предпочтительно $\geq 90\%$ и наиболее предпочтительно $\geq 95\%$.

В одном варианте реализации изобретения конструкции антитела предпочтительно характеризуются плазменной стабильностью (отношением EC_{50} с плазмой к EC_{50} без плазмы), составляющей ≤ 5 или ≤ 4 , более предпочтительно $\leq 3,5$ или ≤ 3 , даже более предпочтительно $\leq 2,5$ или ≤ 2 и наиболее предпочтительно $\leq 1,5$ или ≤ 1 . Плазменную стабильность конструкции антитела можно исследовать, инкубируя конструкцию в человеческой плазме при 37°C в течение 24 ч с последующим определением EC_{50} в анализе высвобождения ^{51}Cr хрома. Эффекторные клетки в анализе цитотоксичности могут представлять собой стимулированные обогащенные человеческие CD8-положительные Т-клетки. Клетки-мишени могут представлять собой, например, клетки СНО, трансфицированные человеческим ВСМА. Соотношение между эффекторными клетками и клетками-мишенями (Э:М) может быть выбрано как 10:1. Применяемый в этих целях пул человеческой плазмы получают из крови здоровых доноров, собранной в покрытые ЭДТК шприцы. Клеточные компоненты удаляют путем центрифугирования, а верхнюю плазменную фазу собирают и после этого объединяют. В качестве контроля конструкции антител разводят непосредственно перед анализом цитотоксичности в среде RPMI-1640. Плазменную стабильность рассчитывают как отношение EC_{50} (после инкубации плазмы) к EC_{50} (контроля).

Также предпочтительно, чтобы преобразование мономеров в димеры конструкций антител было низким. Степень преобразования можно определять в разных условиях и анализировать с помощью высокоэффективной эксклюзионной хроматографии. Например, инкубацию мономерных изоформ конструкций антител можно проводить в течение 7 суток при 37°C и концентрациях, составляющих, например, 100 или 250 мкг/мл, в инкубаторе. В таких условиях предпочтительно, чтобы конструкции антител согласно изобретению демонстрировали процентное содержание димеров $\leq 5\%$, более предпочтительно $\leq 4\%$, даже более предпочтительно $\leq 3\%$, даже более предпочтительно $\leq 2,5\%$, даже более предпочтительно $\leq 2\%$, даже более предпочтительно $\leq 1,5\%$ и наиболее предпочтительно $\leq 1\%$ или $\leq 0,5\%$ или даже 0% .

Также предпочтительно, чтобы биспецифические конструкции антител согласно данному изобретению характеризовались низким уровнем преобразования в димеры после некоторого числа циклов замораживания/размораживания. Например, мономер конструкции антитела доводят до концентрации 250 мкг/мл, например, в генерическом буфере готовой формы и подвергают трем циклам замораживания/размораживания (замораживание при -80°C в течение 30 мин с последующим размораживанием в течение 30 мин при комнатной температуре) с последующим проведением высокоэффективной ЭХ для определения процентного содержания изначально мономерной конструкции антитела, которая была преобразована в димерную конструкцию антитела. Предпочтительно процентное содержание димеров биспецифических конструкций антител составляет $\leq 5\%$, более предпочтительно $\leq 4\%$, даже более предпочтительно $\leq 3\%$, даже более предпочтительно $\leq 2,5\%$, даже более предпочтительно $\leq 2\%$, даже более предпочтительно $\leq 1,5\%$ и наиболее предпочтительно $\leq 1\%$ или даже $\leq 0,5\%$, например, после трех циклов замораживания/размораживания.

Биспецифические конструкции антител согласно данному изобретению предпочтительно демонстрируют хорошую термостабильность с температурой агрегации ≥ 45 или $\geq 50^\circ\text{C}$, более предпочтительно ≥ 52 или $\geq 54^\circ\text{C}$, даже более предпочтительно ≥ 56 или $\geq 57^\circ\text{C}$ и наиболее предпочтительно ≥ 58 или $\geq 59^\circ\text{C}$. Параметр термостабильности можно определить в контексте температуры агрегации антитела следующим образом: Раствор антитела в концентрации 250 мкг/мл переносят в одноразовую кювету и помещают в устройство для исследования методом динамического рассеяния света (ДРС). Образец нагревают от 40 до 70°C при скорости нагрева $0,5^\circ\text{C}/\text{мин}$ с постоянным измерением определяемого радиуса. Увеличе-

ние радиуса, указывающее на плавление и агрегацию белка, используют для расчета температуры агрегации антитела.

В альтернативном варианте температурные кривые плавления можно определить методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) для определения характеристичной биофизической стабильности белка конструкций антител. Эти эксперименты проводят, используя устройство MicroCal LLC (Northampton, MA, U.S.A) VP-DSC. Поглощение энергии образцом, содержащим конструкцию антитела, записывают от 20 до 90°C и сравнивают с образцом, содержащим только буфер готовой формы. Конструкции антител доводят до конечной концентрации 250 мкг/мл, например, в подвижном буфере ЭХ. Для получения соответствующей кривой плавления пошагово повышают общую температуру образца. При каждой температуре Т записывают поглощение энергии образца и стандартного буфера готовой формы. Разницу в поглощении энергии C_p (ккал/моль/°C) образца минус стандарт наносят на график как функцию от соответствующей температуры. Температуру плавления определяют как температуру в первом максимуме поглощения энергии.

Также подразумевается, что биспецифические конструкции антител к ВСМАхCD3 согласно изобретению имеют мутность (определяемую по ОП340 после доведения концентрации очищенной мономерной конструкции антитела до 2,5 мг/мл и инкубации в течение ночи) $\leq 0,2$, предпочтительно $\leq 0,15$, более предпочтительно $\leq 0,12$, даже более предпочтительно $\leq 0,1$ и наиболее предпочтительно $\leq 0,08$.

В дополнительном варианте реализации конструкция антитела в соответствии с изобретением стабильна при физиологическом или немного меньшем pH, т.е. pH от около 7,4 до 6,0. Чем лучше конструкция антитела переносит нефизиологический pH, такой как pH около 6,0, тем выше степень выделения конструкции антитела, элюируемой из ионообменной колонки, по отношению к общему количеству загружаемого белка. Выделение конструкции антитела из ионообменной (например, катионообменной) колонки при pH около 6,0 предпочтительно составляет $\geq 30\%$, более предпочтительно $\geq 40\%$, более предпочтительно $\geq 50\%$, даже более предпочтительно $\geq 60\%$, даже более предпочтительно $\geq 70\%$, даже более предпочтительно $\geq 80\%$, даже более предпочтительно $\geq 90\%$, даже более предпочтительно $\geq 95\%$ и наиболее предпочтительно $\geq 99\%$.

Дополнительно подразумевается, что биспецифические конструкции антител согласно данному изобретению демонстрируют терапевтическую эффективность или противоопухолевую активность. Это можно, например, оценить в описанном в нижеприведенном примере исследовании ксенотрансплантатной модели человеческой опухоли на поздней стадии.

На 1-е сутки исследования 5×10^6 клеток из линии клеток, положительной в отношении человеческого целевого клеточного антигена (в данном случае: ВСМА), подкожно инъецируют в правую заднюю боковую часть самок мышей NOD/SCID. Когда средний объем опухолей достигает около 100 мм^3 , *in vitro* размноженные человеческие CD3-положительные Т-клетки трансплантируют мышам посредством инъекции около 2×10^7 клеток в брюшную полость животных. Мыши из обрабатываемой базовым раствором контрольной группы 1 не получают эффекторных клеток и используются в качестве контроля без трансплантата для сравнения с обрабатываемой базовым раствором контрольной группой 2 (получающей эффекторные клетки), чтобы отслеживать влияние одних Т-клеток на рост опухоли. Обработку антителом начинают, когда средний объем опухолей достигает около 200 мм^3 . Средний объем опухоли для каждой группы обработки в день начала обработки не должен статистически отличаться от любой другой группы (дисперсионный анализ). Мышей обрабатывают 0,5 мг/кг/сутки биспецифической конструкции антитела к ВСМАхCD3 путем внутривенной болюсной инъекции в течение от около 15 до 20 суток. Во время исследования проводят измерение опухолей калиперами, а прогрессирование оценивают путем сравнения объема опухолей (TV) между группами. Ингибирование роста опухоли T/C [%] определяют, рассчитывая TV как

$$T/C\% = 100 \times (\text{медианный TV в анализируемой группе}) / (\text{медианный TV в контрольной группе } 2).$$

Специалистам известно, как модифицировать или адаптировать определенные параметры этого исследования, такие как число инъецируемых опухолевых клеток, место инъекции, число трансплантируемых человеческих Т-клеток, предназначенное для введения количество биспецифических конструкций антител и график, получая при этом имеющий смысл и воспроизводимый результат. Предпочтительно ингибирование роста опухоли T/C [%] составляет ≤ 70 или ≤ 60 , более предпочтительно ≤ 50 или ≤ 40 , даже более предпочтительно ≤ 30 или ≤ 20 и наиболее предпочтительно ≤ 10 или ≤ 5 или даже $\leq 2,5$.

В предпочтительном варианте реализации конструкции антитела согласно изобретению конструкция антитела представляет собой одноцепочечную конструкцию антитела.

Также в предпочтительном варианте реализации конструкции антитела согласно изобретению указанный третий домен содержит в порядке от amino-конца к карбокси-концу шарнир-CH2-CH3-линкер-шарнир-CH2-CH3.

В одном варианте реализации изобретения каждый из указанных полипептидных мономеров третьего домена имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17-24. В предпочтительном варианте реализации изобретения каждый из указанных полипептидных мономеров имеет аминокислотную последо-

вательность, выбранную из SEQ ID NO: 17-24.

Также в одном варианте реализации изобретения домен CH2 одного или предпочтительно каждого (обоих) полипептидных мономеров третьего домена содержит внутридоменный цистеиновый дисульфидный мостик. Как известно в данной области техники, термин "цистеиновый дисульфидный мостик" относится к функциональной группе с общей структурой R-S-S-R. Такая связь также называется SS-связью или дисульфидным мостиком и получена путем сопряжения двух тиольных групп остатков цистеина. Для конструкции антитела согласно изобретению в особенности предпочтительно, чтобы цистеины, образующие цистеиновый дисульфидный мостик в зрелой конструкции антитела, были внесены в аминокислотную последовательность домена CH2, соответствующую позициям 309 и 321 (нумерация Kabat).

В одном варианте реализации изобретения удален участок гликозилирования в позиции 314 по Kabat домена CH2. Предпочтительно, чтобы это удаление участка гликозилирования обеспечивала замена N314X, где X представляет собой любую аминокислоту за исключением Q. Указанная замена предпочтительно представляет собой замену N314G. В более предпочтительном варианте реализации изобретения указанный домен CH2 дополнительно содержит следующие замены (позиции в соответствии с Kabat): V321C и R309C (эти замены вносят внутридоменный цистеиновый дисульфидный мостик в позициях 309 и 321 по Kabat).

Предполагается, что предпочтительные характеристики конструкции антитела согласно изобретению по сравнению, например, с известной в данной области техники биспецифической конструкцией антитела на основе гетеро-Fc (фиг. 1b) могут быть, помимо прочего, связаны с внесением вышеописанных модификаций в домен CH2. Таким образом, для конструкции согласно изобретению предпочтительно, чтобы домены CH2 в третьем домене конструкции антитела согласно изобретению содержали внутридоменный цистеиновый дисульфидный мостик в позициях 309 и 321 по Kabat и/или участок гликозилирования в позиции 314 по Kabat был удален посредством описанной выше замены N314X, предпочтительно замены N314G.

В дополнительном предпочтительном варианте реализации изобретения домены CH2 в третьем домене конструкции антитела согласно изобретению содержат внутридоменный цистеиновый дисульфидный мостик в позициях 309 и 321 по Kabat, а участок гликозилирования в позиции 314 по Kabat удален посредством замены N314G. Наиболее предпочтительно полипептидный мономер в третьем домене конструкции антитела согласно изобретению имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17 и 18.

В одном варианте реализации в изобретении предложена конструкция антитела, в которой:

- (i) первый домен содержит два переменных домена антитела, и второй домен содержит два переменных домена антитела;
- (ii) первый домен содержит один переменный домен антитела, а второй домен содержит два переменных домена антитела;
- (iii) первый домен содержит два переменных домена антитела, а второй домен содержит один переменный домен антитела; или
- (iv) первый домен содержит один переменный домен антитела, и второй домен содержит один переменный домен антитела.

Соответственно, первый и второй домены могут представлять собой связывающие домены, каждый из которых содержит два переменных домена антитела, таких как домены VH и VL. Примеры таких связывающих доменов, содержащих два переменных домена антитела, были описаны выше в данном документе и включают, например, фрагменты Fv, фрагменты scFv или фрагменты Fab, описанные выше в данном документе. В альтернативном варианте один или оба этих связывающих домена могут содержать только один переменный домен. Примеры таких однодоменных связывающих доменов были описаны выше в данном документе и включают, например, нанотела или содержащие один переменный домен антитела, содержащие только один переменный домен, который может представлять собой VHH, VH или VL, который специфически связывает антиген или эпитоп независимо от других V-областей или доменов.

В предпочтительном варианте реализации конструкции антитела согласно изобретению первый и второй домены слиты с третьим доменом посредством пептидного линкера. Предпочтительный пептидный линкер был описан выше в данном документе и характеризуется аминокислотной последовательностью Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, т.е. Gly₄Ser (SEQ ID NO: 1), или ее полимерами, т.е. (Gly₄Ser)_x, где x представляет собой целое число, равное 1 или более (например, 2 или 3). В особенности предпочтительный линкер для слияния первого и второго доменов с третьим доменом приведен в SEQ ID NO: 1.

В предпочтительном варианте реализации конструкция антитела согласно изобретению характеризуется тем, что содержит в порядке от amino-конца к карбокси-концу:

- (a) первый домен;
- (b) пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3;
- (c) второй домен;

- (d) пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 9, 10, 11 и 12;
- (e) первый полипептидный мономер третьего домена;
- (f) пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 6, 7 и 8; и
- (g) второй полипептидный мономер третьего домена.

Конструкция антитела согласно данному изобретению содержит первый домен, который связывается с ВСМА, предпочтительно с внеклеточным доменом (ВКД) ВСМА.

Подразумевается, что термин "связывание с внеклеточным доменом ВСМА" в контексте данного изобретения означает, что связывающий домен связывается с ВСМА, экспрессируемым на поверхности клетки-мишени. Следовательно, первый домен в соответствии с изобретением предпочтительно связывается с ВСМА, когда он экспрессируется клетками или линиями клеток с естественной экспрессией и/или клетками или линиями клеток, трансформированными или (стабильно/временно) трансфицированными ВСМА. В предпочтительном варианте реализации изобретения первый связывающий домен также связывается с ВСМА, когда ВСМА используется в качестве молекулы "мишени" или "лиганда" в *in vitro* анализе связывания, таком как ВІАcore или анализ Скэтчарда. "Клетка-мишень" может представлять собой любую прокариотическую или эукариотическую клетку, экспрессирующую ВСМА на поверхности; предпочтительно клетка-мишень представляет собой клетку, которая является частью организма человека или животного, такую как конкретные экспрессирующие ВСМА раковые или опухолевые клетки.

Предпочтительно первый домен связывается с ВСМА/ВКД ВСМА человека. Предпочтительная последовательность ВСМА человека приведена в SEQ ID NO: 41, а предпочтительная последовательность ВКД ВСМА человека приведена в SEQ ID NO: 42. В дополнительном предпочтительном варианте реализации изобретения он связывается с ВСМА/ВКД ВСМА макака. Предпочтительная последовательность ВСМА макака приведена в SEQ ID NO: 43, а предпочтительная последовательность ВКД ВСМА макака приведена в SEQ ID NO: 44. В соответствии с наиболее предпочтительным вариантом реализации изобретения первый домен связывается с ВСМА/ВКД ВСМА как человека, так и макака. "Внеклеточный домен ВСМА" или "ВКД ВСМА" относится к области или последовательности ВСМА, которая практически не содержит трансмембранные и цитоплазматические домены ВСМА. Специалисту в данной области техники понятно, что трансмембранный домен, определяемый для полипептида ВСМА согласно данному изобретению, определяется на основании критериев, обычно применяемых в данной области техники для определения гидрофобного домена такого типа. Точные границы трансмембранного домена могут варьироваться, но скорее всего не более чем на около 5 аминокислот в любом конце домена, специальным образом указанного в данном документе.

Предпочтительная аминокислотная последовательность полноразмерного ВСМА приведена в SEQ ID NO: 41. Предпочтительный ВКД ВСМА приведен в SEQ ID NO: 42.

Предпочтительные связывающие домены, которые связываются с ВСМА, описаны в WO 2013/072406, WO 2013/072415 и WO 2014/140248. Любой связывающий домен для ВСМА, описанный в этих заявках, можно применять в контексте данного изобретения.

В одном аспекте изобретения конструкция антитела содержит в порядке от amino-конца к карбокси-концу:

- (a) первый домен, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 53, 59, 71, 77, 89 или 95;
- (b) пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3;
- (c) второй домен, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23, 25, 41, 43, 59, 61, 77, 79, 95, 97, 113, 115, 131, 133, 149, 151, 167, 169, 185 или 187 из WO 2008/119567 или SEQ ID NO: 15;
- (d) пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 9, 10, 11 и 12;
- (e) первый полипептидный мономер третьего домена, имеющий полипептидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17-24;
- (f) пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 6, 7 и 8; и
- (g) второй полипептидный мономер третьего домена, имеющий полипептидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17-24.

Наряду с этим предпочтительным вариантом реализации первый и второй домены, которые слиты посредством пептидного линкера с третьим доменом, содержат последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 53, 59, 71, 77, 89 или 95. В одном аспекте изобретения конструкция антитела согласно изобретению характеризуется тем, что имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 55, 56, 61, 62, 73, 74, 79, 80, 91, 92, 97 и 98.

В изобретении дополнительно предложены полинуклеотид/молекула нуклеиновой кислоты, кодирующие конструкцию антитела согласно изобретению. Полинуклеотид представляет собой биополимер,

состоящий из 13 или более нуклеотидных мономеров, ковалентно связанных в цепи. ДНК (такая как кДНК) и РНК (такая как мРНК) являются примерами полинуклеотидов с разной биологической функцией. Нуклеотиды представляют собой органические молекулы, служащие в качестве мономеров или субъединиц молекул нуклеиновых кислот, таких как ДНК или РНК. Молекула нуклеиновой кислоты или полинуклеотид может быть двухцепочечной или одноцепочечной, линейной или круговой. Предпочтительно она находится в векторе, который предпочтительно находится в клетке-хозяине. Указанная клетка-хозяин, например, после трансформации или трансфекции вектором или полинуклеотидом согласно изобретению способна экспрессировать конструкцию антитела. С этой целью полинуклеотид или молекула нуклеиновой кислоты функционально связаны с регуляторными последовательностями.

Генетический код представляет собой набор правил, посредством которого информация, закодированная в генетическом материале (нуклеиновых кислотах), транслируется в белок. Биологическая расшифровка в живых клетках осуществляется рибосомой, которая связывает аминокислоты в порядке, определяемом мРНК, используя молекулы тРНК для переноса аминокислот и для считывания тринуклеотидов мРНК за раз. Код определяет, как последовательности этих нуклеотидных триплетов, называемых кодонами, определяют, какую аминокислоту следует добавлять следующей во время синтеза белка. За некоторыми исключениями тринуклеотидный кодон в последовательности нуклеиновой кислоты предопределяет одну аминокислоту. Так как подавляющее большинство генов кодируется абсолютно одинаковым кодом, этот конкретный код часто называют каноническим или стандартным генетическим кодом. Хотя генетический код определяет белковую последовательность для данной кодирующей области, другие геномные области могут влиять на то, когда и где вырабатываются эти белки.

Кроме того, в изобретении предложен вектор, содержащий полинуклеотид/молекулу нуклеиновой кислоты согласно изобретению. Вектор представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, применяемую в качестве носителя для переноса (чужеродного) генетического материала в клетку. Термин "вектор" включает, но не ограничивается этим, плазмиды, вирусы, космиды и искусственные хромосомы. В общем случае сконструированные векторы содержат точку начала репликации, участок мультиклонирования и селективный маркер. Сам вектор в общем случае представляет собой нуклеотидную последовательность, обычно последовательность ДНК, которая содержит вставку (трансген), и более крупную последовательность, которая служит "скелетом" вектора. Современные векторы могут включать в себя дополнительные элементы помимо вставки трансгена и скелета: промотор, генетический маркер, устойчивость к антибиотикам, репортерный ген, нацеливающую последовательность, метку для очистки белка. Векторы, называемые экспрессионными векторами (экспрессионными конструкциями) специально предназначены для экспрессии трансгена в клетке-мишени и в общем случае содержат регуляторные последовательности.

Термин "регуляторные последовательности" относится к последовательностям ДНК, необходимым для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в конкретном организме-хозяине. Регуляторные последовательности, которые подходят для прокариот, например включают промотор, необязательно, последовательность оператора и участок связывания рибосомы. Известно, что в эукариотических клетках используются промоторы, сигналы полиаденилирования и энхансеры.

Нуклеиновая кислота является "функционально связанной", когда она находится в функциональной взаимосвязи с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, ДНК для предпоследовательности или секреторной лидерной последовательности функционально связана с ДНК для полипептида, если она экспрессируется в виде белка-предшественника, который принимает участие в секреции полипептида; промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию последовательности; или участок связывания рибосомы функционально связан с кодирующей последовательностью, если он расположен так, чтобы облегчать трансляцию. В общем случае "функционально связанный" означает, что связанные последовательности ДНК являются смежными и, в случае секреторной лидерной последовательности, смежными и в фазе считывания. При этом энхансеры не должны быть смежными. Связывание осуществляется путем лигирования в удобных рестрикционных участках. Если такие участки не существуют, используют синтетические олигонуклеотидные адапторы или линкеры в соответствии с традиционной практикой.

"Трансфекция" представляет собой процесс преднамеренного внесения молекул нуклеиновых кислот или полинуклеотидов (включая векторы) в клетки-мишени. Этот термин используется в основном для невирусных методов в эукариотических клетках. Трансдукцию часто используют для описания опосредованного вирусом переноса молекул нуклеиновых кислот или полинуклеотидов. Трансфекция клеток животных, как правило, включает открытие временных пор или "дыр" в клеточной мембране для того, чтобы сделать возможным поглощение материала. Трансфекцию можно проводить, используя фосфат кальция, путем электропорации, путем сжатия клеток или путем смешивания катионного липида с материалом для получения липосом, которые сливаются с клеточной мембраной и оставляют свой груз внутри.

Термин "трансформация" используют для описания невирусного переноса молекул нуклеиновых кислот или полинуклеотидов (включая векторы) в бактерии и также в не принадлежащие животным эукариотические клетки, включая клетки растений. Следовательно, трансформация представляет собой генетическое изменение бактериальной или не принадлежащей животному эукариотической клетки в

результате прямого поглощения через клеточную(ые) мембрану(ы) из окружающей среды и последующее включение экзогенного генетического материала (молекул нуклеиновых кислот). Трансформацию можно проводить искусственными средствами. Для того чтобы произошла трансформация, клетки или бактерии должны находиться в состоянии компетентности, которое может наступать в виде ограниченного во времени ответа на внешние условия, такие как голодание и плотность клеток.

Кроме того, в изобретении предложена клетка-хозяин, трансформированная или трансфицированная полинуклеотидом/молекулой нуклеиновой кислоты или вектором согласно изобретению. В контексте данного документа подразумевается, что термины "клетка-хозяин" или "реципиентная клетка" включают любую отдельную клетку или культуру клеток, которые могут быть или были реципиентами векторов, молекул экзогенных нуклеиновых кислот и полинуклеотидов, кодирующих конструкцию антитела согласно данному изобретению; и/или реципиентами самой конструкции антитела. Внесение соответствующего материала в клетку проводят путем трансформации, трансфекции и т.д. Также подразумевается, что термин "клетка-хозяин" включает потомство или потенциальное потомство одной клетки. Так как в последующих поколениях могут возникать определенные модификации вследствие естественной, случайной или преднамеренной мутации или вследствие влияния со стороны окружающей среды, такое потомство может в действительности не быть полностью идентичным (по морфологии или по комплексу геномной или общей ДНК) с родительской клеткой, но все равно в контексте данного документа включено в объем указанного термина. Подходящие клетки-хозяева включают прокариотические или эукариотические клетки и также включают, но не ограничиваются этим, бактерии, клетки дрожжей, клетки грибов, клетки растений и клетки животных, такие как клетки насекомых и клетки млекопитающих, например мышей, крыс, макак или человека.

Конструкцию антитела согласно изобретению можно получать в бактериях. После экспрессии конструкцию антитела согласно изобретению выделяют из клеточной пасты *E.coli* в растворимую фракцию и затем ее можно очищать с помощью, например, аффинной или эксклюзионной хроматографии. Конечную очистку можно проводить аналогично с процессом очистки антитела, экспрессируемого, например, в клетках СНО.

Кроме прокариот, эукариотические микробы, такие как нитевидные грибы или дрожжи, являются подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии конструкции антитела согласно изобретению. *Saccharomyces cerevisiae* или обычные пекарские дрожжи наиболее часто используются среди микроорганизмов-хозяев из низших эукариот. При этом большое число других родов, видов и штаммов являются общепринятыми и применимыми в данном случае, например, *Schizosaccharomyces pombe*, хозяева из *Kluyveromyces*, такие как *K.lactis*, *K.fragilis* (ATCC 12424), *K.Bulgaricus* (ATCC 16045), *K.wickerhamii* (ATCC 24178), *K.waltii* (ATCC 56500), *K.drosophilum* (ATCC 36906), *K.Thermotolerans* и *K.marxianus*; *yarrowia* (EP 402 226); *Pichia pastoris* (EP 183 070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244 234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces*, такие как *Schwanniomyces occidentalis*; и нитевидные грибы, такие как *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, и хозяева *Aspergillus*, такие как *A.nidulans* и *A.niger*.

Подходящие клетки-хозяева для экспрессии гликозилированной конструкции антитела согласно изобретению получены из многоклеточных организмов. Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Были определены многочисленные бакуловирусные штаммы и варианты и соответствующие перmissive клетки-хозяева насекомых, такие как *Spodoptera frugiperda* (гусеница), *Aedes aegypti* (москит), *Aedes albopictus* (москит), *Drosophila melanogaster* (плодовая мушка) и *Bombyx mori*. Общедоступными являются различные вирусные штаммы для трансфекции, например, вариант L-1 *Autographa californica* NPV и штамм Bm-5 *Bombyx mori* NPV, и такие вирусы можно использовать в качестве вируса в соответствии с настоящим изобретением, в частности, для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

Растительные клеточные культуры хлопка, кукурузы, картофеля, сои, петунии, томата, арабидопсиса и табака также можно использовать в качестве хозяев. Клонированные и экспрессионные векторы, применяемые для получения белков в растительной клеточной культуре, известны специалистам в данной области техники. См., например, Hiatt et al., *Nature* (1989) 342: 76-78, Owen et al. (1992) *Bio/Technology* 10: 790-794, Artsaenko et al. (1995) *The Plant J.* 8: 745-750, и Fecker et al. (1996) *Plant Mol Biol* 32: 979-986.

Однако наибольший интерес представляют клетки позвоночных, а размножение клеток позвоночных в культуре (тканевой культуре) стало рутинной процедурой. Примерами применимых линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия почки обезьяны CV1, трансформированная SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); линия почки эмбриона человека (клетки 293 или 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре, Graham et al., *J. Gen Virol.* 36: 59 (1977)); клетки почки новорожденного хомяка (BHK, ATCC CCL 10); клетки яичника китайского хомяка/-DHFR (CHO, Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216 (1980)); клетки Сертоли мышей (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23: 243-251 (1980)); клетки почки обезьяны (CV1 ATCC CCL 70); клетки почки африканской зеленой марышки (VERO-76, ATCC CRL1587); клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2); клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени серой крысы (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легкого человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, 1413 8065); клетки опухоли молочной железы мышей (MMT 060562, ATCC CCL5 1); клетки TRI (Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* (1982) 383: 44-68);

клетки MRC 5; клетки FS4; и линия гепатомы человека (Hep G2).

В дополнительном варианте реализации в изобретении предложен процесс для получения конструкции антитела согласно изобретению, включающий культивирование клетки-хозяина согласно изобретению, в условиях, обеспечивающих экспрессию конструкции антитела согласно изобретению, и выделение полученной конструкции антитела из культуры.

В контексте данного документа термин "культивирование" относится к *in vitro* поддержанию, дифференцировке, росту, пролиферации и/или размножению клеток в подходящих условиях в среде. Термин "экспрессия" включает любой этап, проводимый для получения конструкции антитела согласно изобретению, включая, но не ограничиваясь этим, транскрипцию, посттранскрипционную модификацию, трансляцию, посттрансляционную модификацию и секрецию.

При применении рекомбинантных технологий конструкцию антитела можно получать внутри клетки, в периплазматическом пространстве, или она может непосредственно секретироваться в среду. Если конструкцию антитела получают внутри клетки, на первом этапе удаляют дебрис в виде частиц, как клеточ-хозяев, так и лизированных фрагментов, например, путем центрифугирования или ультрафильтрации. В Carter et al., *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992) описана процедура для выделения антител, которые секретировались в периплазматическое пространство *E.coli*. Вкратце, клеточную пасту размораживают в присутствии ацетата натрия (pH 3,5), ЭДТК и фенилметилсульфонилфторида (ФМСФ) в течение около 30 мин. Клеточный дебрис удаляют путем центрифугирования. Если антитело секретируется в среду, супернатанты из таких экспрессионных систем в общем случае сначала концентрируют, используя коммерчески доступный фильтр для концентрирования белка, например, установку для ультрафильтрации Amicon или Millipore Pellicon. На любом из вышеуказанных этапов может быть включен ингибитор протеаз, такой как ФМСФ, для ингибирования протеолиза, а антибиотики могут быть включены для предотвращения роста занесенных загрязнителей.

Конструкцию антитела согласно изобретению, полученную из клеток-хозяев, можно выделять или очищать, используя, например, хроматографию с гидроксилapatитом, гель-электрофорез, диализ и аффинную хроматографию. Также в зависимости от предназначенного для выделения антитела доступны другие методики очистки белка, такие как фракционирование на ионообменной колонке, осаждение этанолом, обращенно-фазовая ВЭЖХ, хроматография на силикагеле, хроматография на гепаринсефарозе™, хроматография на анионо- или катионообменной смоле (такой как колонка с полиаспаргиновой кислотой), хроматофокусирование, ДСН-ПААГ и осаждение сульфатом аммония. Если конструкция антитела согласно изобретению содержит домен CH3, для очистки применяют смолу Bakerbond ABX (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ).

Аффинная хроматография является предпочтительной методикой очистки. Матрица, к которой присоединяется аффинный лиганд, наиболее часто является агарозой, но также доступны другие матрицы. Механически стабильные матрицы, такие как стекло с контролируемым размером пор или поли(стиролдивинил)бензен, обеспечивают большую скорость потока и меньшее время обработки по сравнению с агарозой.

Кроме того, в изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая конструкцию антитела согласно изобретению или конструкцию антитела, полученную в соответствии со способом согласно изобретению. Для фармацевтической композиции согласно изобретению предпочтительно, чтобы гомогенность конструкции антитела составляла $\geq 80\%$, более предпочтительно ≥ 81 , ≥ 82 , ≥ 83 , ≥ 84 или $\geq 85\%$, еще предпочтительнее ≥ 86 , ≥ 87 , ≥ 88 , ≥ 89 или $\geq 90\%$, еще предпочтительнее ≥ 91 , ≥ 92 , ≥ 93 , ≥ 94 или $\geq 95\%$ и наиболее предпочтительно ≥ 96 , ≥ 97 , ≥ 98 или $\geq 99\%$.

В контексте данного документа термин "фармацевтическая композиция" относится к композиции, подходящей для введения пациенту, предпочтительно пациенту-человеку. В особенности предпочтительная фармацевтическая композиция согласно данному изобретению содержит одну или множество конструкций антител согласно изобретению, предпочтительно в терапевтически эффективном количестве. Предпочтительно фармацевтическая композиция дополнительно содержит подходящие готовые формы одного или более (фармацевтически эффективных) носителей, стабилизаторов, вспомогательных веществ, разбавителей, солюбилизаторов, поверхностно-активных веществ, эмульсификаторов, консервантов и/или адъювантов. Приемлемые составляющие композиции предпочтительно являются нетоксичными для реципиентов в применяемых дозировках и концентрациях. Фармацевтические композиции согласно изобретению включают, но не ограничиваются этим, жидкие, замороженные и лиофилизированные композиции.

Композиции согласно изобретению могут содержать фармацевтически приемлемый носитель. В общем случае в контексте данного документа "фармацевтически приемлемый носитель" означает любой и все водные и неводные растворы, стерильные растворы, растворители, буферы, например, растворы фосфатно-солевого буфера (ФСБ), воду, суспензии, эмульсии, такие как эмульсии масло/вода, различные типы смачивающих агентов, липосомы, дисперсионные среды и покрытия, которые совместимы с фармацевтическим введением, в частности парентеральным введением. Применение таких сред и агентов в фармацевтических композициях хорошо известно в данной области техники, а композиции, содержащие

такие носители, можно составлять хорошо известными традиционными способами.

В определенных вариантах реализации изобретения предложены фармацевтические композиции, содержащие конструкцию антитела согласно изобретению и дополнительно одно или более вспомогательных веществ, таких как те, которые в иллюстративных целях описаны в этом разделе и в другом месте данного документа. В этой связи вспомогательные вещества можно применять в изобретении во многих целях, таких как корректировка физических, химических или биологических свойств готовых форм, например корректировка вязкости, и/или процессов согласно изобретению для улучшения эффективности и/или для стабилизации таких готовых форм и процессов против деградации и порчи вследствие, например, стрессов, которые возникают во время производства, перевозки, хранения, приготовления перед использованием, введения и впоследствии.

В определенных вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция может содержать составляющие материалы в целях модификации, поддержания или сохранения, например, pH, осмолярности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, всасывания или проникновения композиции (см. REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition, (A.R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company). В таких вариантах реализации изобретения подходящие составляющие материалы могут включать, но не ограничиваются этим

аминокислоты, такие как глицин, аланин, глутамин, аспарагин, треонин, пролин, 2-фенилаланин, включая заряженные аминокислоты, предпочтительно лизин, ацетат лизина, аргинин, глутамат и/или гистидин противомикробные препараты, такие как антибактериальные и противогрибковые агенты антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, метионин, сульфит натрия или гидрогенсульфит натрия;

буферы, буферные системы или буферные агенты, которые используют для поддержания композиции при физиологическом pH или немного меньшем pH; примерами буферов являются борат, бикарбонат, Трис-HCl, цитраты, фосфаты или другие органические кислоты, сукцинат, фосфат и гистидин; например, Трис-буфер с pH около 7,0-8,5;

неводные растворители, такие как пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъекционные сложные органические эфиры, такие как этилолеат;

водные носители, включая воду, спиртово-водные носители, эмульсии или суспензии, включая солевые и забуференные среды;

биоразлагаемые полимеры, такие как сложные полиэфиры;

объемообразующие агенты, такие как маннит или глицин;

хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТК);

изотонические агенты и агенты, замедляющие всасывание;

комплексообразующие агенты, такие как кофеин, поливинилпирролидон, β -циклодекстрин или гидроксипропил- β -циклодекстрин;

наполнители;

моносахариды; дисахариды; и другие углеводы (такие как глюкоза, манноза или декстрины); углеводы могут представлять собой нередуцирующие сахара, предпочтительно трегалозу, сахарозу, октасульфат, сорбит или ксилит;

(низкомолекулярные) белки, полипептиды или белковые носители, такие как человеческий или бычий сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины, предпочтительно человеческого происхождения;

красители и ароматизаторы;

серосодержащие восстановительные агенты, такие как глутатион, тиоктовая кислота, тиогликолят натрия, тиоглицерин, $[\alpha]$ -монотиоглицерин и тиосульфат натрия;

разбавители;

эмульсификаторы;

гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон;

солеобразующие противоионы, такие как натрий;

консерванты, такие как противомикробные средства, антиоксиданты, хелатирующие агенты, инертные газы и тому подобное; примерами являются бензалкония хлорид, бензойная кислота, салициловая кислота, тимеросал, фенол, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновая кислота или перекись водорода;

комплексы металлов, такие как комплексы Zn-белок;

растворители и соразтворители (такие как глицерин, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль);

сахара и сахарные спирты, такие как трегалоза, сахароза, октасульфат, маннит, сорбит или ксилит, стахиоза, манноза, сорбоза, ксилоза, рибоза, миоинизитоза, галактоза, лактит, рибит, миоинозит, галактит, глицерин, циклиты (например, инозит), полиэтиленгликоль; и

многоатомные сахарные спирты;

суспендирующие агенты;

поверхностно-активные вещества или смачивающие агенты, такие как плуроники, ПЭГ, сложные

эфиры сорбитана, полисорбаты, такие как полисорбат 20, полисорбат, тритон, трометамин, лецитин, холестерин, тилоксапал; поверхностно-активные вещества могут представлять собой детергенты, предпочтительно с молекулярной массой $>1,2$ кДа, и/или полиэфир, предпочтительно с молекулярной массой >3 кДа; неограничивающими примерами предпочтительных детергентов являются Твин 20, Твин 40, Твин 60, Твин 80 и Твин 85; неограничивающими примерами предпочтительных полимеров являются ПЭГ 3000, ПЭГ 3350, ПЭГ 4000 и ПЭГ 5000;

агенты, повышающие стабильность, такие как сахароза или сорбит;

агенты, повышающие тоничность, такие как галиды щелочных металлов, предпочтительно хлорид натрия или калия, маннит, сорбит;

средства для парентеральной доставки, включая раствор хлорида натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия, лактат Рингера или жирные масла;

средства для внутривенной доставки, включая наполнители жидкости и питательных веществ, наполнители электролитов (например, на основе декстрозы Рингера).

Для специалистов в данной области техники очевидно, что разные составляющие фармацевтической композиции (например, перечисленные выше) могут иметь разное действие, например аминокислота может действовать в качестве буфера, стабилизатора и/или антиоксиданта; маннит может действовать в качестве объемобразующего агента и/или агента, повышающего тоничность; хлорид натрия может действовать в качестве средства для доставки и/или агента, повышающего тоничность.

Подразумевается, что композиция согласно изобретению может содержать, кроме определенного в данном документе полипептида согласно изобретению, дополнительные биологически активные агенты в зависимости от предполагаемого применения композиции. Такие агенты могут представлять собой лекарственные препараты, действующие на желудочно-кишечную систему, цитостатические лекарственные препараты, лекарственные препараты, предотвращающие гиперурикемию, лекарственные препараты, ингибирующие иммунореакции (например, кортикостероиды), лекарственные препараты, модулирующие воспалительный ответ, лекарственные препараты, действующие на систему кровообращения, и/или агенты, такие как цитокины, известные в данной области техники. Также подразумевается, что конструкцию антителя согласно данному изобретению применяют в совместной терапии, т.е. в комбинации с другим противораковым медикаментом.

В определенных вариантах реализации изобретения оптимальная фармацевтическая композиция определяется специалистом в данной области техники в зависимости, например, от предполагаемого пути введения, формата доставки и необходимой дозировки. См., например, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, выше. В определенных вариантах реализации изобретения такие композиции могут влиять на физическое состояние, стабильность, скорость *in vivo* высвобождения и скорость *in vivo* выведения конструкции антителя согласно изобретению. В определенных вариантах реализации изобретения основной базовый раствор или носитель в фармацевтической композиции может быть по своей природе как водным, так и неводным. Например, подходящий базовый раствор или носитель может представлять собой воду для инъекций, физиологический солевой раствор или искусственную цереброспинальную жидкость, возможно дополненные другими материалами, обычными в композициях для парентерального введения. Дополнительными типовыми базовыми растворами являются нейтральный буферный солевой раствор или солевой раствор, смешанный с сывороточным альбумином. В определенных вариантах реализации композиции конструкции антителя согласно изобретению можно готовить для хранения путем смешивания выбранной композиции, имеющей необходимую степень чистоты, с оптимальными составляющими агентами (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, выше) в форме лиофилизированной лепешки или водного раствора. Кроме того, в определенных вариантах реализации конструкции антителя согласно изобретению можно готовить в виде лиофилизата, используя соответствующие вспомогательные вещества, такие как сахароза.

Если предполагается парентеральное введение, терапевтические композиции для применения в данном изобретении можно получать в форме апиrogenного, парентерально приемлемого водного раствора, содержащего необходимую конструкцию антителя согласно изобретению в фармацевтически приемлемом базовом растворе. В особенности подходящим базовым раствором для парентеральной инъекции является стерильная дистиллированная вода, в которой конструкцию антителя согласно изобретению готовят в виде стерильного, изотонического раствора, сохраняемого должным образом. В определенных вариантах реализации изобретения препарат может включать готовую форму необходимой молекулы с агентом, таким как инъекционные микросферы, биоразлагаемые частицы, полимерные соединения (такие как полимолочная кислота или полигликолевая кислота), гранулы или липосомы, которые могут обеспечивать контролируемое или замедленное высвобождение продукта, который может доставляться посредством депо-инъекции. В определенных вариантах реализации изобретения также можно использовать гиалуроновую кислоту, действие которой состоит в стимуляции продления нахождения в циркуляции. В определенных вариантах реализации изобретения можно использовать имплантируемые устройства для внесения необходимой конструкции антителя.

Дополнительные фармацевтические композиции очевидны для специалистов в данной области техники, включая готовые формы, содержащие конструкцию антителя согласно изобретению в составах для

замедленного высвобождения или контролируемой доставки/высвобождения. Методики приготовления различных других средств для замедленной или контролируемой доставки, таких как липосомные носители, биоразлагаемые микрочастицы или пористые гранулы и депо-инъекции, также известны специалистам в данной области техники. См., например, заявку на международный патент № PCT/US93/00829, в которой описано контролируемое высвобождение пористых полимерных микрочастиц для доставки фармацевтических композиций. Препараты с замедленным высвобождением могут содержать полупроницаемые полимерные матрицы в виде формованных изделий, например пленок или микрокапсул. Матрицы для замедленного высвобождения могут содержать сложные полиэфиры, гидрогели, полилактиды (описанные в патенте США № 3773919 и публикации заявки на европейский патент № EP 058481), сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма этил-L-глутамата (Sidman et al., 1983, *Biopolymers* 2:547-556), поли(2-гидроксиэтилметакрилат) (Langer et al., 1981, *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277 и Langer, 1982, *Chem. Tech.* 12:98-105), этиленвинилацетат (Langer et al., 1981, выше) или поли-D(-)-3-гидроксимасляную кислоту (публикация заявки на европейский патент № EP 133988). Композиции для замедленного высвобождения также могут содержать липосомы, которые можно готовить любым из нескольких способов, известных в данной области техники. См., например, Eppstein et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:3688-3692; публикации заявок на европейский патент № EP 036676; EP 088046 и EP 143949.

Конструкция антитела также может быть заключена в микрокапсулах, приготовленных, например, методами коацервации или межфазной полимеризации (например, микрокапсулы из гидроксиметилцеллюлозы или желатина и микрокапсулы из поли(метилметакрилата) соответственно), в коллоидных системах доставки лекарственного препарата (например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и нанокapsулы) или в макроэмульсиях. Такие методики описаны в Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 16th edition, Oslo, A., Ed., (1980).

Фармацевтические композиции, применяемые для *in vivo* введения, как правило, предоставляются в виде стерильных препаратов. Стерилизацию можно проводить путем фильтрации через стерильные фильтровальные мембраны. Если композиция является лиофилизированной, стерилизацию с применением этого способа можно проводить до или после лиофилизации и восстановления. Композиции для парентерального введения можно хранить в лиофилизированной форме или в растворе. Парентеральные композиции в общем случае помещают в контейнер, имеющий стерильное входное отверстие, например пакет для внутривенного раствора или флакон, имеющий пробку, прокалываемую гиподермической иглой для инъекций.

Другой аспект изобретения включает самобуферизующиеся готовые формы конструкции антитела согласно изобретению, которые можно использовать как фармацевтические композиции, как описано в заявке на международный патент WO 06138181 A2 (PCT/US2006/022599). Доступны различные описания для стабилизации белков и составляющих материалов, а также способов, применяемых в связи с этим, например Arakawa et al., "Solvent interactions in pharmaceutical formulations," *Pharm Res.* 8(3): 285-91 (1991); Kendrick et al., "Physical stabilization of proteins in aqueous solution" in: *RATIONAL DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS: THEORY AND PRACTICE*, Carpenter and Manning, eds. *Pharmaceutical Biotechnology*. 13: 61-84 (2002), и Randolph et al., "Surfactant-protein interactions", *Pharm. Biotechnol.* 13: 159-75 (2002), в частности, см. части, относящиеся к вспомогательным веществам и связанным с ними процессам для самобуферизующихся готовых белковых форм в соответствии с настоящим изобретением, в особенности к белковым фармацевтическим продуктам и процессам для применений в ветеринарии и/или медицине человека.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации изобретения можно использовать соли, например для корректировки ионной силы и/или изотоничности готовой формы, и/или для улучшения растворимости и/или физической стабильности белка или другого ингредиента композиции в соответствии с изобретением. Как хорошо известно, ионы могут стабилизировать нативное состояние белков посредством связывания с заряженными остатками на поверхности белка и путем экранирования заряженных и полярных групп в белке и уменьшения силы их электростатических взаимодействий, взаимодействий притяжения и отталкивания. Ионы также могут стабилизировать денатурированное состояние белка посредством связывания, в частности, с денатурированными пептидными связями (--CONH) белка. Кроме того, ионное взаимодействие с заряженными и полярными группами в белке может уменьшать межмолекулярные электростатические взаимодействия и, таким образом, предотвращать или снижать агрегацию и нерастворимость белка.

Ионные молекулы существенно отличаются по своему воздействию на белки. Было разработано большое количество категоричных классификаций ионов и их воздействия на белки, которые можно использовать при приготовлении фармацевтических композиций в соответствии с изобретением. Одним из примеров является ряд Гофмейстера, в котором ионные и полярные неионные растворенные вещества упорядочены в соответствии с их воздействием на конформационную стабильность белков в растворе. Стабилизирующие растворенные вещества называются "космотропными". дестабилизирующие растворенные вещества называются "хаотропными". Космотропы обычно используются в высоких концентрациях (например, >1-молярный сульфат аммония) для осаждения белков из раствора ("высаливание"). Ха-

отропы обычно используются для денатурации и/или солюбилизации белков ("всаливание"). Относительная эффективность ионов в отношении "всаливания" и "высаливания" определяет их позицию в ряде Гофмейстера.

Свободные аминокислоты можно использовать в готовых формах конструкции антитела согласно изобретению в соответствии с различными вариантами реализации изобретения в качестве объемообразующих агентов, стабилизаторов и антиоксидантов, а также для других стандартных применений. Лизин, пролин, серин и аланин можно использовать для стабилизации белков в готовой форме. Глицин применяют при лиофилизации, чтобы гарантировать правильную структуру и свойства лепешки. Аргинин можно применять для ингибирования агрегации белка, как в жидких, так и в лиофилизированных готовых формах. Метионин применяют в качестве антиоксиданта.

Полиоолы включают сахара, например маннит, сахарозу и сорбит, а также многоатомные спирты, такие как, например, глицерин и пропиленгликоль, и, в целях обсуждения в данном документе, полиэтиленгликоль (ПЭГ) и родственные вещества. Полиолы являются космотропными. Они являются полезными стабилизирующими агентами как в жидких, так и в лиофилизированных готовых формах для защиты белков от процессов физической и химической деградации. Полиолы также применяют для корректировки тоничности готовых форм. Среди полиолов, применяемых в выбранных вариантах реализации изобретения, находится маннит, обычно используемый для гарантии структурной стабильности лепешки в лиофилизированных готовых формах. Он гарантирует структурную стабильность лепешки. В общем случае его используют с лиопротектором, например сахарозой. Сорбит и сахароза находятся среди предпочтительных агентов для корректировки тоничности и применения в качестве стабилизаторов для защиты от стрессов при замораживании-размораживании во время перевозки или приготовления нерасфасованных форм во время процесса производства. Редуцирующие сахара (которые содержат свободные альдегидные или кетонные группы), такие как глюкоза или лактоза, могут гликировать поверхностные остатки лизина и аргинина. Следовательно, в общем случае они не находятся среди предпочтительных полиолов для применения в соответствии с этим изобретением. Кроме того, сахара, которые образуют реактивные молекулы, такие как сахароза, которая гидролизует до фруктозы и глюкозы в кислых условиях и впоследствии приводит к гликированию, в связи с этим также не находятся среди предпочтительных полиолов согласно изобретению. ПЭГ применяют для стабилизации белков и в качестве криопротектора, и в связи с этим его можно применять в данном изобретении.

Варианты реализации конструкции антитела согласно изобретению дополнительно включают поверхностно-активные вещества. Белковые молекулы могут быть восприимчивы в адсорбции на поверхности и денатурации и последующей агрегации на поверхностях раздела воздух-жидкость, твердое вещество-жидкость и жидкость-жидкость. Эти эффекты в общем случае обратно пропорциональны концентрации белка. Эти вредные взаимодействия в общем случае обратно пропорциональны концентрации белка и, как правило, усугубляются физическим взбалтыванием, таким как возникает во время перевозки и работы с продуктом. Поверхностно-активные вещества обычно используют для предотвращения, минимизации или снижения поверхностной адсорбции. В этой связи применимые поверхностно-активные вещества согласно изобретению включают полисорбат 20, полисорбат 80, другие сложные эфиры жирных кислот полиэтоксилатов сорбитана и полноксамер 188. Поверхностно-активные вещества также обычно используют, чтобы регулировать конформационную стабильность белка. Применение поверхностно-активных веществ в этой связи является белок-специфическим, так как любое заданное поверхностно-активное вещество будет стабилизировать одни белки и дестабилизировать другие.

Полисорбаты чувствительны к окислительной деградации и часто в том виде, в котором они поставляются, содержат достаточные количества пероксидов, чтобы вызывать окисление боковых цепей белковых остатков, в особенности метионина. Следовательно, полисорбаты нужно использовать осторожно, а при использовании их следует применять в самой низкой эффективной концентрации. В этой связи полисорбаты являются примером общего правила, что вспомогательные вещества следует применять в самой низкой эффективной концентрации.

Варианты реализации готовых форм конструкции антитела согласно изобретению дополнительно включают применение одного или более антиоксидантов. Вредное окисление белков в фармацевтических готовых формах можно в некоторой степени предотвратить, поддерживая надлежащие внешние уровни кислорода и температуры и избегая воздействия света. Также можно использовать вспомогательные вещества антиокислительного действия для предотвращения окислительной деградации белков. Среди применимых в этой связи антиоксидантов находятся восстановительные агенты, ловушки для кислорода/свободных радикалов и хелатирующие агенты. Антиоксиданты для применения в терапевтических белковых готовых формах в соответствии с изобретением предпочтительно растворимы в воде и сохраняют свою активность в продолжение срока годности продукта. ЭДТК является предпочтительным в этой связи антиоксидантом в соответствии с изобретением. Антиоксиданты могут повреждать белки. Например, восстановительные агенты, такие как, в частности, глутатион, могут разрушать внутримолекулярные дисульфидные связи. Таким образом, антиоксиданты для применения в изобретении выбирают так, чтобы, помимо прочего, устранить или существенно снизить возможность повреждения ими белков в готовой форме.

Готовые формы в соответствии с изобретением могут содержать ионы металлов, которые являются кофакторами белков и необходимы для образования координационных комплексов белков, например как цинк, необходимый для образования некоторых суспензий инсулина. Ионы металлов также могут ингибировать некоторые процессы, которые разрушают белки. Однако ионы металлов также могут катализировать физические и химические процессы, которые разрушают белки. Ионы магния (10-120 мМ) можно использовать для ингибирования изомеризации аспарагиновой кислоты до изоаспарагиновой кислоты. Ионы Ca^{+2} (до 100 мМ) могут повышать стабильность человеческой дезоксирибонуклеазы. Однако Mg^{+2} , Mn^{+2} и Zn^{+2} могут дестабилизировать рекомбинантную человеческую ДНКазу. Аналогично, Ca^{+2} и Sr^{+2} могут стабилизировать фактор VIII, при этом он может дестабилизироваться Mg^{+2} , Mn^{+2} и Zn^{+2} , Cu^{+2} и Fe^{+2} , а его агрегация может повышаться ионами Al^{+3} .

Варианты реализации готовых форм конструкции антитела согласно изобретению дополнительно включают применение одного или более консервантов. Консерванты необходимы при разработке многодозовых парентеральных готовых форм, которые предполагают более одного набора из одного и того же контейнера. Их основной функцией является ингибирование роста микроорганизмов и гарантия стерильности продукта на протяжении срока годности или срока применения лекарственного продукта. Обычно используемые консерванты включают бензиловый спирт, фенол и м-крезол. Хотя консерванты давно применяют с низкомолекулярными парентеральными средствами, разработка белковых готовых форм, которые содержат консерванты, может оказаться проблематичной. Консерванты почти всегда оказывают дестабилизирующее действие (агрегация) на белки, и это стало основным фактором в ограничении их применения в многодозовых белковых готовых формах. На данный момент большинство белковых лекарственных препаратов готовят исключительно для одного применения. При этом в случае возможности многодозовых готовых форм они имеют дополнительное преимущество обеспечения удобства для пациента и повышения конкурентоспособности на рынке. Хороший пример связан с человеческим гормоном роста (hGH), когда разработка содержащих консерванты готовых форм привела к коммерческой реализации более удобных, многоразовых шприцов-ручек. На сегодня по меньшей мере четыре таких устройства-ручки, содержащих готовые формы hGH с консервантами, доступны на рынке. Нордитропин (жидкий, Novo Nordisk), нутропин AQ (жидкий, Genentech) и генотропин (лиофилизированный, с двухкамерным картриджем, Pharmacia & Upjohn) содержат фенол, тогда как соматроп (Eli Lilly) приготовлен с м-крезолом. При приготовлении и разработке содержащих консерванты дозированных форм необходимо учитывать несколько аспектов. Эффективная концентрация консерванта в лекарственном продукте должна быть оптимизирована. Это требует тестирования данного консерванта в дозированной форме в концентрационном диапазоне, который обеспечивает противомикробную эффективность, не нарушая стабильность белка.

Как можно ожидать, разработка жидких готовых форм, содержащих консерванты, является более сложной, чем в случае лиофилизированных готовых форм. Высушенные сублимацией продукты можно лиофилизировать без консерванта и восстанавливать с помощью содержащего консервант разбавителя во время использования. Это уменьшает время, в течение которого консервант находится в контакте с белком, что существенно минимизирует связанный с ним риск в отношении стабильности. В случае жидких готовых форм эффективность и стабильность консерванта должна сохраняться в продолжении всего срока годности продукта (от около 18 до 24 месяцев). Важным моментом, который стоит отметить, является то, что эффективность консерванта должна проявляться в конечной готовой форме, содержащей активный лекарственный препарат и все вспомогательные компоненты.

Описанные в данном документе конструкции антител также можно готовить в виде иммунолипосом. "Липосома" представляет собой маленькую везикулу, состоящую из различного типа липидов, фосфолипидов и/или поверхностно-активного вещества, которую используют для доставки лекарственного препарата в организм млекопитающих. Компоненты липосомы обычно имеют бислоевое упорядочение, аналогично липидному упорядочению биологических мембран. Липосомы, содержащие конструкцию антитела, готовят известными в данной области техники способами, такими как описанные в Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); патентах США № 4485045 и 4544545; и WO 97/38731. Липосомы с увеличенным временем нахождения в циркуляции описаны в патенте США № 5013556. В особенности применимые липосомы можно создавать методом обращенно-фазового выпаривания с липидной композицией, содержащей фосфатидилхолин, холестерин и ПЭГ-дериватизированный фосфатидилэтаноламин (ПЭГ-ФЭ). Липосомы пропускают через фильтры с определенным размером пор для получения липосом с необходимым диаметром. Фрагменты Fab' конструкции антитела согласно данному изобретению можно конъюгировать к липосомам, как описано в Martin et al. J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982), посредством реакции дисульфидного обмена. В липосоме необязательно содержится химиотерапевтический агент. См. Gabizon et al. J. National Cancer Inst. 81 (19) 1484 (1989).

После приготовления фармацевтической композиции ее можно хранить в стерильных флаконах в виде раствора, суспензии, геля, эмульсии, твердого вещества, кристалла или в виде обезвоженного или лиофилизированного порошка. Такие готовые формы можно хранить в готовой для применения форме или в форме (например, лиофилизированной), которую восстанавливают перед введением.

Биологическую активность определенной в данном документе фармацевтической композиции можно определить, например, с помощью анализа цитотоксичности, как описано в нижеприведенных примерах, в WO 99/54440 или в Schlereth et al. (Cancer Immunol. Immunother. 20 (2005), 1-12). В контексте данного документа "эффективность" или "in vivo эффективность" относится к ответу на терапию фармацевтической композицией согласно изобретению, оцениваемому по стандартизированным критериям ответа NCI (Национального института рака). Успех или in vivo эффективность терапии с применением фармацевтической композиции согласно изобретению относится к эффективности композиции в отношении ее предполагаемой цели, т.е. способности композиции оказывать желаемое действие, т.е. уничтожение патологических клеток, например опухолевых клеток. In vivo эффективность можно отслеживать с помощью общепринятых стандартных методов для соответствующих нозологических форм, включая, но не ограничиваясь этим, число белых кровяных телец, лейкоцитарную формулу, сортировку флуоресцентно-активированных клеток, аспирацию костного мозга. Кроме того, можно использовать различные специфические для заболевания клинические химические параметры и другие общепринятые стандартные методы. Кроме того, можно использовать компьютерную томографию, рентгеновское исследование, ядерную магнитно-резонансную томографию (например, для оценки ответа на основании критериев Национального института рака [Cheson B.D., Horning S.J., Coiffier B., Shipp M.A., Fisher R.I., Connors J.M., Lister T.A., Vose J., Grillo-Lopez A., Hagenbeek A., Cabanillas F., Klippensten D., Hiddemann W., Castellino R., Harris N.L., Armitage J.O., Carter W., Hoppe R., Canellos G.P. Доклад на международном семинаре по стандартизированным критериям ответа для неходжкинских лимфом. NCI Sponsored International Working Group. J. Clin. Oncol. 1999 Apr; 17(4): 1244]), сканирование методом позитронно-эмиссионной томографии, число белых кровяных телец, лейкоцитарную формулу, сортировку флуоресцентно-активированных клеток, аспирацию костного мозга, биопсию/гистологию лимфатических узлов и различные специфические в отношении лимфомы клинические химические параметры (например, уровень лактат дегидрогеназы) и другие общепринятые стандартные методы.

Другой основной задачей при разработке лекарственных препаратов, таких как фармацевтическая композиция согласно изобретению, является прогнозируемая модуляция фармакокинетических свойств. С этой целью можно устанавливать фармакокинетический профиль кандидатного лекарственного препарата, т.е. профиль фармакокинетических параметров, которые влияют на способность конкретного лекарственного препарата лечить заданное патологическое состояние. Фармакокинетические параметры лекарственного препарата, влияющие на способность лекарственного препарата лечить определенную нозологическую форму, включают, но не ограничиваются этим: время полужизни, объем распределения, пресистемный метаболизм в печени и степень связывания сыворотки крови. На эффективность заданного лекарственного агента может влиять каждый из вышеупомянутых параметров. Подразумеваемой характеристикой конструкций антител согласно данному изобретению, предоставляемых со специфической модальностью Fc, является то, что они влекут за собой, например, разницу в фармакокинетическом поведении. Нацеливающая конструкция антитела с продленным временем полужизни в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно демонстрирует неожиданно возросшее время удержания in vivo по сравнению с "каноническими" не-HLE версиями указанной конструкции антитела.

"Время полужизни" означает время, за которое выводится 50% введенного лекарственного препарата посредством биологических процессов, например метаболизма, экскреции и т.д. Под "пресистемным метаболизмом в печени" подразумевается подверженность лекарственного препарата метаболизму после первого контакта с печенью, т.е. во время первого прохождения через печень. "Объем распределения" означает степень удержания лекарственного препарата в различных компартментах организма, таких как, например, внутриклеточное и внеклеточное пространство, ткани или органы и т.д., и распределение лекарственного препарата в этих компартментах. "Степень связывания сыворотки крови" означает предрасположенность лекарственного препарата к взаимодействию и связыванию с белками сыворотки крови, такими как альбумин, что приводит к снижению или утрате биологической активности лекарственного препарата.

Фармакокинетические параметры также включают биодоступность, временной лаг (Tlag), Tmax, скорость всасывания, начало действия и/или Cmax для заданного количества вводимого лекарственного препарата. "Биодоступность" означает количество лекарственного препарата в кровяном компартменте. "Временной лаг" означает время запаздывания между введением лекарственного препарата и его выявлением и возможностью определения в крови или плазме. "Tmax" представляет собой время, через которое достигается максимальная концентрация лекарственного препарата в крови, а "Cmax" представляет максимальную концентрацию в крови, получаемую при применении данного лекарственного препарата. На время, необходимое для достижения концентрации лекарственного препарата в крови или ткани, которая требуется для биологического действия, влияют все параметры.

Фармакокинетические параметры биспецифических конструкций антител, демонстрирующих межвидовую специфичность, которые можно определить в доклинических исследованиях на животных для отличных от шимпанзе приматов, как указано выше, также приведены, например, в публикации Schlereth et al. (Cancer Immunol. Immunother. 20 (2005), 1-12).

В предпочтительном аспекте изобретения фармацевтическая композиция является стабильной по

меньшей мере в течение четырех недель при около -20°C . Как очевидно из прилагающихся примеров, качество конструкции антитела согласно изобретению по сравнению с качеством соответствующих существующему уровню техники конструкций антител можно исследовать, используя разные системы. Понятно, что эти исследования согласуются с "ICH Harmonised Tripartite Guideline: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products Q5C and Specifications: Test procedures and Acceptance Criteria for Biotech Biotechnological/Biological Products Q6B" и, следовательно, выбраны так, чтобы обеспечивать указывающий на стабильность профиль, который обеспечивает достоверность выявления изменений в идентичности, чистоте и эффективности продукта. Общепринято, что термин "чистота" является относительным термином. Вследствие действия гликозилирования, деамидирования или другой гетерогенности абсолютную чистоту биотехнологического/биологического продукта, как правило, следует оценивать более чем одним способом, а полученное значение чистоты зависит от способа. В целях испытания стабильности исследования в отношении чистоты должны фокусироваться на способах определения продуктов деградации.

Для оценки качества фармацевтической композиции, содержащей конструкцию антитела согласно изобретению, можно проводить анализ, например, анализируя содержание растворимых агрегатов в растворе (ВМК, оцениваемые с помощью эксклюзионной хроматографии). Предпочтительно, чтобы стабильность в течение по меньшей мере четырех недель при около -20°C характеризовалась содержанием менее 1,5% ВМК, предпочтительно менее 1% ВМК.

Предпочтительная готовая форма конструкции антитела в виде фармацевтической композиции может, например, содержать компоненты готовой формы, описанные ниже.

Готовая форма А: фосфат калия, L-аргинина гидрохлорид, дигидрат трегалозы, полисорбат 80 при pH 6,0.

Другие примеры оценки стабильности конструкции антитела согласно изобретению в форме фармацевтической композиции приведены в прилагающихся примерах 4-12. В этих примерах варианты реализации конструкций антител согласно изобретению исследуют в отношении разных стрессовых условий в разных фармацевтических готовых формах, а результаты сравнивают с другими продлевающими время полужизни (HLE) форматами биспецифической, вовлекающей Т-клетки, конструкции антитела, известными в данной области техники. В общем случае подразумевается, что конструкции антител, имеющие специфическую модалность Fc, в соответствии с настоящим изобретением, как правило, являются более стабильными в широком ряде стрессовых условий, таких как температурный световой стресс, по сравнению с конструкциями антител, имеющими разные HLE-форматы, и в отсутствие какого-либо HLE-формата (т.е. "каноническими" конструкциями антител). Указанная температурная стабильность может относиться как к пониженной (ниже комнатной температуры, включая замораживание), так и к повышенной (выше комнатной температуры, включая температуры до или выше температуры тела) температуре. Как понятно специалисту в данной области техники, такая улучшенная стабильность в отношении стресса, которого трудно избежать при клинической практической реализации, делает конструкцию антитела более безопасной, так как при клинической практической реализации возникает меньше продуктов деградации. Соответственно, указанная повышенная стабильность означает повышенную безопасность.

В одном варианте реализации предложена конструкция антитела согласно изобретению или конструкция антитела, полученная в соответствии со способом согласно изобретению, для применения в предотвращении, лечении или уменьшении интенсивности В-клеточного нарушения, коррелирующего с экспрессией ВСМА или сверхэкспрессией ВСМА, нарушения, связанного с плазматическими клетками, и аутоиммунного нарушения.

Описанные в данном документе готовые формы применимы в качестве фармацевтических композиций в лечении, уменьшении интенсивности и/или предотвращении описанного в данном документе патологического состояния у нуждающегося в этом пациента. Термин "лечение" относится как с терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам. Лечение включает применение или введение готовой формы в организм, выделенную ткань или клетку пациента, который имеет заболевание/нарушение, симптом заболевания/нарушения или предрасположенность к заболеванию/нарушению, с целью лечения, излечения, смягчения, облегчения, изменения, исправления, уменьшения интенсивности, улучшения или воздействия на заболевание, симптом заболевания или предрасположенность к заболеванию.

В контексте данного документа термин "уменьшение интенсивности" относится к любому улучшению состояния заболевания у пациента, имеющего заболевание, указанное ниже в данном документе, посредством введения нуждающемуся в этом субъекту конструкции антитела в соответствии с изобретением. Такое улучшение также может проявляться как замедление или прекращение прогрессирования заболевания пациента. В контексте данного документа термин "предотвращение" означает предупреждение появления или повторного появления пациента, имеющего опухоль или рак, или метастатический рак, указанные ниже в данном документе, посредством введения нуждающемуся в этом субъекту конструкции антитела в соответствии с изобретением.

Термин "заболевание" относится к любому патологическому состоянию, на которое лечение опи-

санными в данном документе конструкцией антитела или фармацевтической композицией оказало бы благоприятное действие. Он включает хронические и острые нарушения или заболевания, включая те патологические состояния, которые являются причиной предрасположенности млекопитающего к рассматриваемому заболеванию.

"Новообразование" представляет собой аномальное разрастание ткани, обычно, но не всегда образующее массу. При образовании массы оно также называется "опухолью".

Новообразования или опухоли могут быть доброкачественными, потенциально злокачественными (предраковыми) или злокачественными. Злокачественные новообразования обычно называют раком. Они обычно инвазируют и разрушают окружающую ткань и могут образовывать метастазы, т.е. они распространяются в другие части, ткани или органы тела. Следовательно, термин "метастатический рак" включает метастазы в другие ткани или органы помимо тех, где находится исходная опухоль. Лимфомы и лейкозы являются лимфоидными новообразованиями. В целях данного изобретения они также включены в термины "опухоль" или "рак".

Термин "вирусное заболевание" описывает заболевания, которые возникают в результате вирусной инфекции у субъекта.

В контексте данного документа термин "иммунологическое нарушение" описывает, наряду с обычным определением этого термина, иммунологические нарушения, такие как аутоиммунные заболевания, гиперчувствительность, иммунодефицит.

В одном варианте реализации в изобретении предложен способ лечения или уменьшения интенсивности В-клеточного нарушения, коррелирующего с экспрессией ВСМА или сверхэкспрессией ВСМА, нарушения, связанного с плазматическими клетками, или аутоиммунного заболевания, включающий этап введения нуждающемуся в этом субъекту конструкции антитела согласно изобретению или конструкции антитела, полученной в соответствии со способом согласно изобретению.

При нарушениях, связанных с плазматическими клетками, один из клонов плазматических клеток неконтролируемо размножается. В результате этот клон вырабатывает огромное количество одного (моноклонального) антитела, известного как М-протеин. В некоторых случаях, например при моноклональных гаммапатиях, вырабатываемое антитело является неполным, состоящим только из легких цепей или тяжелых цепей. Эти аномальные плазматические клетки и вырабатываемые ими антитела обычно ограничены одним типом.

Предпочтительно нарушение, связанное с плазматическими клетками, выбрано из группы, состоящей из множественной миеломы, плазмацитомы, плазмноклеточного лейкоза, макроглобулинемии, амилоидоза, макроглобулинемии Вальденстрема, солитарной костной плазмацитомы, экстрамедуллярной плазмацитомы, остеосклеротической миеломы, болезней тяжелых цепей, моноклональной гаммапатии неясного значения и вялотекущей множественной миеломы. В-клеточные нарушения также могут быть выбраны из группы, состоящей из В-клеточной неходжкинской лимфомы, хронического лимфоцитарного лейкоза и ходжкинской лимфомы.

Аутоиммунное заболевание представляет собой, например, системную красную волчанку (СКВ) или ревматоидный артрит (РА).

Термины "нуждающийся субъект" или "нуждающийся в лечении" включают тех, у кого уже есть нарушение, а также тех, у кого необходимо предотвратить нарушение. Нуждающийся субъект или "пациент" включает людей или других млекопитающих субъектов, которые получают профилактическое или терапевтическое лечение.

Конструкция антитела согласно изобретению в общем случае сконструирована для конкретных путей и способов введения, для конкретных дозировок и частоты введения, для конкретных вариантов лечения конкретных заболеваний, с определенными диапазонами биодоступности и способности сохранения в организме, помимо прочего. Материалы композиции предпочтительно готовят в концентрациях, которые являются приемлемыми для данного участка введения.

Таким образом, готовые формы и композиции могут быть получены в соответствии с изобретением для доставки любым подходящим путем введения. В контексте данного изобретения пути введения включают, но не ограничиваются этим местные пути (такие как накожный, ингаляционный, назальный, глазной, аурикулярный/ушной, вагинальный, мукозальный); энтеральные пути (такие как пероральный, желудочно-кишечный, подъязычный, сублингаальный, буккальный, ректальный); парентеральные пути (такие как внутривенный, внутриартериальный, внутрикостный, внутримышечный, внутримозговой, интрацеребровентрикулярный, эпидуральный, интратекальный, подкожный, внутрибрюшинный, экстраамниотический, внутрисуставной, внутрисердечный, внутрикожный, внутриочаговый, внутриматочный, интравезикальный, интравитреальный, трансдермальный, интраназальный, трансмукозальный, интрасинавиальный, интралюминальный).

Фармацевтические композиции и конструкции антител согласно данному изобретению в особенности применимы для парентерального введения, например подкожной или внутривенной доставки, например путем инъекции, такой как болюсная инъекция, или путем инфузии, такой как непрерывная инфузия.

Фармацевтические композиции можно вводить с помощью устройства медицинского назначения.

Примеры устройств медицинского назначения для введения фармацевтических композиций описаны в патентах США № 4475196; 4439196; 4447224; 4447233; 4486194; 4487603; 4596556; 4790824; 4941880; 5064413; 5312335; 5312335; 5383851; и 5399163.

В частности, в данном изобретении предложено непрерывное введение подходящей композиции. В качестве неограничивающего примера непрерывное или по существу непрерывное, т.е. продолжительное введение можно реализовать с помощью небольшой насосной системы, носимой пациентом, для дозирования подачи терапевтического агента в организм пациента. Фармацевтическую композицию, содержащую конструкцию антитела согласно изобретению, можно вводить, используя указанные насосные системы. В общем случае такие насосные системы известны в данной области техники, а их работа обычно основана на периодической замене картриджей, содержащих предназначенный для инфузии терапевтический агент. Замена картриджа в такой насосной системе влечет за собой временное прерывание или какое-либо иное прерывание потока терапевтического агента в организм пациента. В таком случае фаза введения до замены картриджа и фаза введения после замены картриджа все равно рассматриваются в рамках значения фармацевтических средств и способов согласно изобретению, которые вместе составляют одно "непрерывное введение" такого терапевтического агента.

Продолжительное или непрерывное введение конструкций антител согласно изобретению может быть внутривенным или подкожным и осуществляться посредством устройства для доставки жидкости или небольшой насосной системы, включая механизм направления жидкости для направления жидкости из резервуара и приводной механизм для приведения в действие направляющего механизма. Насосные системы для подкожного введения могут содержать иглу или канюлю для прокалывания кожи пациента и доставки подходящей композиции в организм пациента. Указанные насосные системы могут быть напрямую прикреплены или присоединены к коже пациента независимо от вен, артерий и кровяных сосудов, обеспечивая, таким образом, прямой контакт между насосной системой и кожей пациента. Насосная система может быть присоединена к коже пациента в течение от 24 ч до нескольких суток. Насосная система может иметь небольшой размер с резервуаром для небольших объемов. В качестве неограничивающего примера объем резервуара для предназначенной для введения подходящей фармацевтической композиции может составлять от 0,1 до 50 мл.

Продолжительное введение также может осуществляться трансдермальным путем посредством пластыря, носимого на коже и заменяемого через определенные интервалы. Специалисту в данной области техники известны подходящие для этой цели системы на основе пластырей для доставки лекарственного препарата. Следует отметить, что трансдермальное введение в особенности подходит для непрерывного введения, так как замену первого израсходованного пластыря можно преимущественно осуществлять одновременно с размещением нового, второго пластыря, например, на поверхности кожи, непосредственно вблизи первого израсходованного пластыря и непосредственно перед удалением первого израсходованного пластыря. Не возникает проблем с прерыванием потока или прекращением действия питающей ячейки.

Если фармацевтическая композиция была лиофилизирована, лиофилизированный материал сначала восстанавливают в соответствующей жидкости перед введением. Лيوфилизированный материал можно восстанавливать, например в бактериостатической воде для инъекций (БВДИ), физиологическом солевом растворе, фосфатно-солевом буфере (ФСБ) или в том самом составе, в котором белок находился перед лиофилизацией.

Композиции согласно данному изобретению можно вводить субъекту в подходящей дозе, которую можно определить, например, с помощью исследований с повышением дозы путем введения возрастающих доз описанной в данном документе конструкции антитела согласно изобретению, демонстрирующей межвидовую специфичность, отличным от шимпанзе приматам, например макакам. Как указано выше, описанную в данном документе конструкцию антитела согласно изобретению, демонстрирующую межвидовую специфичность, преимущественно можно использовать в идентичной форме в доклинических исследованиях на отличных от шимпанзе приматах и в качестве лекарственного препарата на людях. Режим дозирования определяется лечащим врачом и клиническими факторами. Как хорошо известно в области медицины, дозировки для любого пациента зависят от многих факторов, включая массу пациента, площадь поверхности тела, возраст, конкретное предназначенное для введения соединение, пол, время и путь введения, общее состояние здоровья и другие одновременно вводимые лекарственные препараты.

Термин "эффективная доза" или "эффективная дозировка" определяется как количество, достаточное для достижения или, по меньшей мере, частичного достижения желаемого эффекта. Термин "терапевтически эффективная доза" определяется как количество, достаточное для излечения или, по меньшей мере, частичного прерывания заболевания и его осложнений у пациента, который уже страдает от заболевания. Количества или дозы, эффективные для этого применения, зависят от предназначенного для лечения патологического состояния (показания), доставляемой конструкции антитела, терапевтического контекста и целей, тяжести заболевания, предыдущей терапии, клинической истории пациента и его ответа на терапевтический агент, пути введения, размера (массы) тела, поверхности тела или размера органов) и/или состояния (возраста и общего состояния здоровья) пациента, и общего состояния собственной иммунной системы пациента. Надлежащую дозу можно корректировать в соответствии с решением ле-

чащего врача так, чтобы ее можно было вводить пациенту за один раз или посредством серии введений и с целью получения оптимального терапевтического эффекта.

Типичная дозировка может находиться в диапазоне от около 0,1 мкг/кг до около 30 мг/кг или более в зависимости от вышеупомянутых факторов. В конкретных вариантах реализации изобретения дозировка может находиться в диапазоне от 1,0 мкг/кг до около 20 мг/кг, оптимально от 10 мкг/кг до около 10 мг/кг или от 100 мкг/кг до около 5 мг/кг.

Терапевтически эффективное количество конструкции антитела согласно изобретению предпочтительно приводит к снижению тяжести симптомов заболевания, повышению частоты или длительности бессимптомных периодов или предотвращению нарушений или недееспособности вследствие поражения заболеванием. Для лечения вышеописанных заболеваний, коррелирующих с экспрессией ВСМА, терапевтически эффективное количество конструкции антитела согласно изобретению, в данном случае конструкции анти-ВСМА/анти-CD3 антитела, предпочтительно ингибирует рост клеток или рост опухоли по меньшей мере на около 20%, по меньшей мере на около 40%, по меньшей мере на около 50%, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 80% или по меньшей мере на около 90% по сравнению с не проходящими лечение пациентами. Способность соединения ингибировать рост опухоли можно оценить в животной модели, прогностической в отношении эффективности.

Фармацевтическую композицию можно вводить в виде единственного терапевтического средства или в комбинации с дополнительными вариантами терапии, такими как противораковая терапия, в случае необходимости, например, другими белковыми и небелковыми лекарственными препаратами. Эти лекарственные препараты можно вводить одновременно с композицией, содержащей определенную в данном документе конструкцию антитела согласно изобретению, или отдельно, до или после введения указанной конструкции антитела в определенные временные интервалы и в определенных дозах.

В контексте данного документа термин "эффективная и нетоксичная доза" относится к переносимой дозе конструкции антитела согласно изобретению, которая является достаточно высокой, чтобы приводить к уничтожению патологических клеток, элиминации опухоли, уменьшению размеров опухоли или стабилизации заболевания без или практически без основных токсических явлений. Такие эффективные и нетоксичные дозы можно определить, например, с помощью исследований с повышением дозы, описанных в данной области техники, и они должны быть ниже дозы, индуцирующей серьезные нежелательные побочные явления (дозолимитирующая токсичность, ДЛТ).

В контексте данного документа термин "токсичность" относится к токсическому действию лекарственного препарата, проявляемому в нежелательных явлениях или серьезных нежелательных явлениях. Эти побочные явления могут относиться к отсутствию переносимости лекарственного препарата в целом и/или отсутствию локальной переносимости после введения. Токсичность также может включать тератогенное или карциногенное действие, вызываемое лекарственным препаратом.

В контексте данного документа термин "безопасность", "in vivo безопасность" или "переносимость" определяет введение лекарственного препарата без индукции серьезных нежелательных явлений непосредственно после введения (локальная переносимость) и на протяжении более длительного периода применения лекарственного препарата. "Безопасность", "in vivo безопасность" или "переносимость" можно оценивать, например, через регулярные интервалы во время лечения и в следующий за ним период. Измерения включают клиническую оценку, например, органные проявления, и исследование лабораторных аномалий. Можно проводить клиническую оценку и записывать/зашифровывать отклонения от нормальных результатов в соответствии со стандартами NCI-CTC и/или MedDRA. Органные проявления могут включать такие критерии, как аллергия/иммунология, кровь/костный мозг, сердечная аритмия, коагуляция и тому подобное, как описано, например, в общих терминологических критериях нежелательных явлений v3.0 (CTCAE). Лабораторные параметры, которые можно исследовать, включают, например, гематологию, клиническую химию, профиль коагуляции и анализ мочи, а также исследование других жидкостей организма, таких как сыворотка, плазма, лимфатическая или спинномозговая жидкость, ликвор и тому подобное. Таким образом, безопасность можно оценить, например, посредством физического осмотра, методов визуализации (т.е. ультразвукового исследования, рентгеновского исследования, КТ-сканов, магнито-резонансной томографии (МРТ), других измерений с помощью технических устройств (т.е. электрокардиограммы), показателей жизнедеятельности, путем измерения лабораторных параметров и записи нежелательных явлений. Например, нежелательные явления у отличных от шимпанзе приматов в применениях и способах согласно изобретению можно исследовать гистопатологическими и/или гистохимическими способами.

Вышеуказанные термины также перечислены, например, в Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived Pharmaceuticals S6; ICH Harmonised Tripartite Guideline; ICH Steering Committee meeting on July 16, 1997.

И наконец, в изобретении предложен набор, содержащий конструкцию антитела согласно изобретению или полученную в соответствии со способом согласно изобретению, фармацевтическую композицию согласно изобретению, полинуклеотид согласно изобретению, вектор согласно изобретению и/или клетку-хозяина согласно изобретению.

В контексте данного изобретения термин "набор" означает два или более компонентов, один из ко-

торых соответствует конструкции антитела, фармацевтической композиции, вектору или клетке-хозяину согласно изобретению, упакованным вместе в контейнере, приемнике или каким-либо другим образом. Следовательно, набор может быть описан как набор продуктов и/или принадлежностей, достаточный для достижения определенной цели, который может поступать в продажу в виде отдельной единицы.

Набор может содержать один или более приемников (таких как флаконы, ампулы, контейнеры, шприцы, бутылки, пакеты) любой подходящей формы, размера и из любого материала (предпочтительно водонепроницаемого, например, пластика или стекла), содержащих конструкцию антитела или фармацевтическую композицию согласно данному изобретению в подходящей для введения дозировке (смотрите выше). Набор может дополнительно содержать указания по применению (например, в форме вкладыша или инструкции по применению), средства для введения конструкции антитела согласно данному изобретению, такие как шприц, насос, инфузионное устройство и тому подобное, средства для восстановления конструкции антитела согласно изобретению и/или средства для разведения конструкции антитела согласно изобретению.

В изобретении также предложены наборы для устройства для однократового введения. Набор согласно изобретению также может содержать первый приемник, содержащий высушенную/лиофилизированную конструкцию антитела, и второй приемник, содержащий водную готовую форму. В определенных вариантах реализации данного изобретения предложены наборы, содержащие однокамерные и многокамерные предварительно наполненные шприцы (например, шприцы с жидкостью или шприцы с лиофилизатом).

Следует отметить, что в контексте данного документа формы единственного числа включают множественное число, если иное четко не следует из контекста. Таким образом, например, ссылка на "реагент" включает один или более таких разных реагентов, а ссылка на "способ" включает ссылку на эквивалентные этапы и способы, известные специалистам в данной области техники, которые можно модифицировать или заменить на описанные в данном документе способы.

Если не указано иное, термин "по меньшей мере", предвещающий ряд элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в ряде. Специалисты в данной области техники признают наличие или смогут определить, используя всего лишь рутинные эксперименты, многие эквиваленты конкретным вариантам реализации изобретения, описанным в данном документе. Подразумевается, что такие эквиваленты включены в данное изобретение.

В контексте данного документа термин "и/или" включает значение "и", "или" и "все или любая комбинация элементов, объединяемых указанным термином".

В контексте данного документа термин "около" или "приблизительно" означает в пределах 20%, предпочтительно в пределах 10% и более предпочтительно в пределах 5% заданной величины или диапазона. При этом он включает также конкретное число, например около 20 включает 20.

Термины "меньше чем" или "больше чем" включают конкретное число. Например, меньше чем 20 означает меньше или равно. Аналогично, более чем или больше чем означает более или равно или больше или равно соответственно.

В тексте описания и в нижеприведенной формуле изобретения, если иное не следует из контекста, слово "содержать" и его вариации, такие как "содержит" и "содержащий" следует понимать как подразумевающие включение указанного целого числа или этапа или группы целых чисел или этапов, но не исключение любого другого целого числа или этапа или группы целых чисел или этапов. В контексте данного документа термин "содержащий" можно заменить термином "вещающий" или "включающий" или иногда термином "имеющий".

В контексте данного документа выражение "состоящий из" исключает любой элемент, этап или ингредиент, не указанный в заявляемом элементе. В контексте данного документа выражение "состоящий преимущественно из" не исключает материалы или этапы, которые не оказывают материального влияния на основные и новые характеристики заявляемого предмета.

В каждом случае любой из терминов "содержащий", "состоящий преимущественно из" и "состоящий из" можно заменить любым из оставшихся двух терминов.

Следует понимать, что данное изобретение не ограничено конкретными методологиями, протоколами, материалами, реагентами и веществами и т.д., описанными в данном документе, и, следовательно, может варьироваться. Употребляемая в данном документе терминология используется только в целях описания конкретных вариантов реализации и не подразумевает ограничения данного изобретения, которое определяется исключительно формулой изобретения.

Все публикации и патенты, цитируемые в тексте этого описания (включая все патенты, патентные заявки, научные публикации, спецификации производителей, инструкции и т.д.), выше или ниже, в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки. Ничто в данном документе не следует воспринимать как признание того, что данное изобретение не имеет права противопоставлять такое описание на основании более раннего изобретения. В тех случаях, когда включенный посредством ссылки материал противоречит или не согласуется с данным описанием, это описание имеет приоритет относительно любого такого материала.

Лучшее понимание данного изобретения и его преимуществ обеспечат следующие примеры, при-

веденные исключительно в иллюстративных целях. Полагается, что примеры не ограничивают объем данного изобретения каким-либо образом. Описанные ниже примеры можно проводить аналогично, т.е. следуя таким же протоколам, с другими биспецифическими конструкциями антител в соответствии с изобретением.

Пример 1. Индуцированная BiTE® экспрессия CD69 на Т-клетках в отсутствие клеток-мишеней.

Выделенные МПКП от здоровых человеческих доноров культивировали с возрастающими количествами биспецифических HLE-конструкций антител к мишени В/CD3 или мишени А/CD3 в течение 48 ч. Экспрессию маркера активации CD69 на Т-клетках определяли с помощью иммуоокрашивания и проточной цитометрии и антиген-специфических конъюгатов mAb.

Независимую от мишени активацию Т-клеток в контексте повышающей регуляции CD69 наблюдали для всех анти-CDH 19 конструкций, но наиболее выраженной она была для молекул гетеро-Fc и кросстел. Повышение регуляции CD69 scFc-конструкцией против мишени В происходило при более высоких концентрациях, а амплитуда была немного ниже по сравнению с другими конструкциями на основе Fc.

В случае конструкций против мишени А практически не наблюдали независимую от мишени активацию Т-клеток для scFc-содержащей молекулы, тогда как конструкция гетеро-Fc индуцировала сильное повышение регуляции CD69 на клеточной поверхности Т-клеток в отсутствие клеток-мишеней.

Независимую от мишени активацию Т-клеток, индуцируемую конструкциями BiTE®, содержащими одноцепочечный Fc или гетеро-Fc слияние в С-конце, оценивали для следующих конструкций.

Конструкции BiTE® (серийные разведения: 0,1 пМ-2 мкМ):

a. Мишень А-I2C scFc; 1,14 мг/мл;

b. Мишень А гетеро-Fc; 1,02 мг/мл.

Эффекторные клетки - человеческие МПКП (3 донора; #065, #823, #836 (scFc) #401, #415, #433 (гетеро-Fc); #590, #595, 598, #605 (Х-тело)).

Время инкубации - 48 ч.

Определение экспрессии CD69 на Т-клетках CD4⁺ и CD8⁺ с помощью проточного цитометра и антиген-специфических конъюгатов mAb. Результаты см. на фиг. 2.

Независимую от мишени активацию Т-клеток, индуцируемую конструкциями антител BiTE®, содержащими одноцепочечный Fc, гетеро-Fc или слияние кросстела в С-конце, оценивали для следующих конструкций.

Конструкции BiTE® (серийные разведения: 0,1 пМ-2 мкМ):

c. Мишень В х I2C-scFc; 245,3 мг/мл;

d. Мишень В гетеро-FC; 1 мг/мл;

e. Мишень В кросстело; 6,3 мг/мл.

Эффекторные клетки - человеческие МПКП (от 3 до 4 доноров; #386, #392, #401 (scFc) #282, #284, #287 (гетеро-Fc)).

Время инкубации - 48 ч.

Определение экспрессии CD69 на Т-клетках CD4⁺ и CD8⁺ с помощью проточного цитометра и антиген-специфических конъюгатов mAb. Результаты см. на фиг. 3.

Независимую от мишени активацию Т-клеток в контексте повышающей регуляции CD69 наблюдали для нескольких биспецифических конструкций, исследуемых в этих анализах. Повышающая регуляция CD69 в общем случае была более выражена для канонических конструкций антител BiTE®, молекул гетеро-Fc и кросстел по сравнению с соответствующими конструкциями scFc. Повышение регуляции CD69 конструкциями scFc происходило в общем случае при более высоких концентрациях, а амплитуда была немного ниже по сравнению с другими двумя конструкциями на основе Fc.

В случае scFc-конструкции против мишени В не наблюдали независимую от мишени активацию Т-клеток, тогда как конструкции гетеро-Fc и Х-тела индуцировали сильное повышение регуляции CD69 на клеточной поверхности Т-клеток в отсутствие клеток-мишеней.

Кроме того, не наблюдали независимое от клетки-мишени повышение регуляции CD69 в анализе с применением конструкций против мишени С и мишени G. Из-за экспрессии мишени на клетках миелодной линии дифференцировки эти клетки удаляли перед проведением анализа. Эти данные свидетельствуют о том, что взаимодействие Fc-областей биспецифических конструкций с FcγR-экспрессирующими клетками может отвечать на независимую от мишени индукцию CD69 на Т-клетках.

Сильное повышение регуляции CD69 на Т-клетках scFc-конструкцией против мишени Н в отсутствие опухолевых клеток происходит вследствие экспрессии мишени Н на Т-клетках.

Материалы и методы.

1) Мишень I.

Независимая от мишени активация Т-клеток, индуцируемая молекулой BiTE®, содержащей одноцепочечный Fc, для следующей конструкции:

1. Конструкция антитела BiTE® (серийные разведения: 1,3 пМ-20 нМ).

1. Мишень I-scFc.

2. Эффекторные клетки - человеческие МПКП (3 донора).

3. Время инкубации - 48 ч.

4. Анализ методом проточной цитометрии экспрессии CD69 на Т-клетках CD4⁺ и CD8⁺ с применением PE-Су7-конъюгированного mAb, специфического в отношении CD69.

2. Мишень D.

Независимую от мишени активацию Т-клеток, индуцируемую молекулами ViTE®, содержащими одноцепочечный Fc, гетеро-Fc или слияние кросстела в С-конце, оценивали для следующих конструкций.

1. Конструкции антител ViTE® (серийные разведения: 1,3 пМ -20 нМ).

1. Мишень D-hetFc (гетеро-Fc).

2. Мишень D-scFc.

3. Мишень D-X-тело (Мишень D-кросстело).

2. Эффекторные клетки - человеческие МКПК (3 донора).

3. Время инкубации - 48 ч.

4. Анализ методом проточной цитометрии экспрессии CD69 на Т-клетках CD4⁺ и CD8⁺ с применением PE-Су7-конъюгированного mAb, специфического в отношении CD69.

3) Мишень С.

Независимую от мишени активацию Т-клеток, индуцируемую молекулами ViTE®, содержащими одноцепочечный Fc, гетеро-Fc или слияние кросстела в С-конце, оценивали для следующих конструкций.

1. Конструкции антител ViTE® (серийные разведения: 1,3 пМ-20 нМ).

1. Мишень С-каноническая конструкция.

2. Мишень С-scFc.

3. Мишень С-hetFc.

4. Мишень С-X-тело.

2. Эффекторные клетки - человеческие МКПК (3 донора).

3. Время инкубации - 48 ч.

4. Анализ методом проточной цитометрии экспрессии CD69 на Т-клетках CD4⁺ и CD8⁺ с применением PE-Су7-конъюгированного mAb, специфического в отношении CD69.

4) Мишень В.

Независимую от мишени активацию Т-клеток, индуцируемую молекулами ViTE®, содержащими одноцепочечный Fc, гетеро-Fc или слияние кросстела в С-конце, оценивали для следующих конструкций.

1. Конструкции антител ViTE® (серийные разведения: 1,3 пМ-20 нМ).

1. Мишень В-scFc.

2. Мишень В-hetFc.

3. Мишень В-X-тело.

2. Эффекторные клетки - человеческие МКПК (3 донора).

3. Время инкубации - 48 ч.

4. Анализ методом проточной цитометрии экспрессии CD69 на Т-клетках CD4⁺ и CD8⁺ с применением PE-Су7-конъюгированного mAb, специфического в отношении CD69.

5. Мишень А.

Независимую от мишени активацию Т-клеток, индуцируемую молекулами ViTE®, содержащими одноцепочечный Fc, гетеро-Fc или слияние кросстела в С-конце, оценивали для следующих конструкций.

1. Конструкции антител ViTE® (серийные разведения: 1,3 пМ-20 нМ).

1. Мишень А-scFc.

2. Мишень А-hetFc.

3. Мишень А-X-тело.

2. Эффекторные клетки - человеческие МКПК (3 донора).

3. Время инкубации - 48 ч.

4. Анализ методом проточной цитометрии экспрессии CD69 на Т-клетках CD4⁺ и CD8⁺ с применением PE-Су7-конъюгированного mAb, специфического в отношении CD69.

6. Мишень F.

Независимую от мишени активацию Т-клеток, индуцируемую молекулами ViTE®, содержащими одноцепочечный Fc или гетеро-Fc, оценивали для следующих конструкций.

1. Конструкции антител ViTE® (серийные разведения: 1,3 пМ-20 нМ).

1. Мишень F-каноническая конструкция.

2. Мишень F-scFc.

3. Мишень F-hetFc.

2. Эффекторные клетки - человеческие МКПК (3 донора).

3. Время инкубации - 48 ч.

4. Анализ методом проточной цитометрии экспрессии CD69 на Т-клетках CD4⁺ и CD8⁺ с применением PE-Су7-конъюгированного mAb, специфического в отношении CD69.

7) Мишень Е.

Независимую от мишени активацию Т-клеток, индуцируемую молекулами ViTE®, содержащими

одноцепочечный Fc или гетеро-Fc, оценивали для следующих конструкций.

1. Конструкции антител ViTE® (серийные разведения: 1,3 пМ-20 нМ).

1. Мишень Е-каноническая конструкция.

2. Мишень Е-scFc.

3. Мишень Е-hetFc.

2. Эффекторные клетки - человеческие МКПК (3 донора).

3. Время инкубации - 48 ч.

4. Анализ методом проточной цитометрии экспрессии CD69 на Т-клетках CD4⁺ и CD8⁺ с применением PE-Су7-конъюгированного mAb, специфического в отношении CD69.

8) Мишень Н.

Независимую от мишени активацию Т-клеток, индуцируемую молекулой ViTE®, содержащей одноцепочечный Fc, оценивали для следующей конструкции.

1. Конструкция антитела ViTE® (серийные разведения: 1,3 пМ-20 нМ).

1. Мишень Н-scFc.

2. Эффекторные клетки - человеческие МКПК (3 донора).

3. Время инкубации - 48 ч.

4. Анализ методом проточной цитометрии экспрессии CD69 на Т-клетках CD4⁺ и CD8⁺ с применением PE-Су7-конъюгированного mAb, специфического в отношении CD69.

9) Мишень G.

Независимую от мишени активацию Т-клеток, индуцируемую молекулой ViTE®, содержащей одноцепочечный Fc, оценивали для следующей конструкции.

1. Конструкция антитела ViTE® (серийные разведения: 1,3 пМ-20 нМ).

1. Мишень G-scFc.

2. Эффекторные клетки - человеческие МКПК (3 донора; без клеток CD14⁺/CD33⁺).

3. Время инкубации - 48 ч.

4. Анализ методом проточной цитометрии экспрессии CD69 на Т-клетках CD4⁺ и CD8⁺ с применением PE-Су7-конъюгированного mAb, специфического в отношении CD69.

Пример 2.

Очищенные конструкции антител ViTE® наносили на планшет Maxisorb в снижающейся концентрации (100 нМ, 1:4 разведение). После 3 промывок ФСБ-Т и блокирования ФСБ/3% (мас./об.) БСА (60 мин, 37°C) объединенную человеческую плазму инкубировали в течение 60 мин, при 80 об/мин при комнатной температуре. После 3 промывок добавляли мышинное моноклональное антитело, специфическое в отношении субъединицы А человеческого C1q (CC1q) (Thermo MA1-83963, 1:500) в течение 60 мин, при 80 об/мин при комнатной температуре, после описанных этапов промывки козье антимышинное Fc-POX mAb (1:5,000) инкубировали в течение 60 мин, при 80 об/мин при комнатной температуре. После дополнительной промывки инкубировали ТМБ-субстрат и прекращали после колориметрической реакции путем добавления H₂SO₄. Поглощение определяли на 450 нм.

Результат. Как изображено на фиг. 4, при высоких концентрациях конструкция ViTE® на основе гетеро-Fc (квадраты) демонстрировала более высокие сигналы связывания в отношении человеческого CC1q по сравнению с конструкцией ViTE® на основе одноцепочечного Fc (треугольники). В качестве отрицательного контроля использовали каноническое ViTE® (круги), которое не демонстрировало существенного связывания CC1q.

Пример 3. Фармакокинетика конструкций антител ViTE®, слитых с продлевающими время полужизни модальностями.

Различные связывающие мишень конструкции антител ViTE® сливали с четырьмя разными продлевающими время полужизни компонентами. Все разные HLE-варианты, доступные для антитела ViTE®, исследовали на яванских макаках в контексте фармакокинетических (ФК) исследований. Их последовательно называли ViTE®-scFc, ViTE®-hetFc, ViTE®-HALB, ViTE®-Х-тело в соответствии с продлевающей время полужизни модальностью, присоединенной к связывающей мишень конструкции. Не слитую с HLE молекулу ViTE® называли "каноническим" ViTE®. Соответствующая номенклатура этих молекул кратко обобщена в табл. 4 ниже.

Таблица 4. Номенклатура соединений однодозовых молекул BiTE®

синоним соединения	название исследуемого соединения
Соединение 1a	Мишень C-scFc
Соединение 1b	Мишень C-hetFc
Соединение 1c	Мишень C-HALB
Соединение 2a	Мишень A-scFc
Соединение 2b	Мишень A-hetFc
Соединение 2c	Мишень A-HALB
Соединение 2d	Мишень A-X-тело
Соединение 3a	Мишень B-scFc
Соединение 3b	Мишень B-hetFc
Соединение 3c	Мишень B-HALB
Соединение 3d	Мишень B-H6
Соединение 4a	Мишень D-scFc
Соединение 4b	Мишень D-hetFc
Соединение 5a	Мишень E-scFc
Соединение 5b	Мишень E-hetFc
Соединение 5c	Мишень E-HALB
Соединение 6a	Мишень F-scFc
Соединение 6b	Мишень F-HALB
Соединение 7	Мишень G-scFc
Соединение 8	Мишень H-scFc
Соединение 9	Мишень I cc-scFc
Соединение 10a	BCMA (cc)-scFc
Соединение 10b	BCMA (каноническое BiTE®)

Молекулы BiTE® вводили в виде внутривенной болюсной инъекции (соединения 1b, 2a-d, 3a/b, 4a/b, 5a-5c, 7-9) и внутривенной инфузии (соединения 1a, 1c, 3c/d, 6a/b, каждое в виде 30-минутной инфузии). Молекулы BiTE® вводили в линейном, фармакокинетически релевантном диапазоне доз, составляющем от 3 до 6 мкг/кг, 12 и 15 мкг/кг соответственно. Соединение 10a вводили в виде короткой внутривенной болюсной инъекции, каноническую конструкцию (соединение 10b) - в виде непрерывной внутривенной инфузии. Для сравнения фармакокинетических параметров обоих соединений, 10a и 10b, на фиг. 5 изображена только конечная фаза, начинающаяся непосредственно после завершения инфузии, для канонического BCMA-BiTE®. Молекулы BCMA BiTE® вводили в линейном, фармакокинетически релевантном диапазоне доз, составляющем 15 мкг/кг. Для возможности сравнения сывороточные концентрации, приведенные на фиг. 5, нормализованы относительно дозы и нормализованы относительно молекулярной массы (описываемой в нмолях). В случае каждого из вышеприведенных соединений исследовали группу по меньшей мере из 2-3 животных. Собирали образцы крови и готовили сыворотку для определения сывороточных концентраций. Сывороточные уровни антитела BiTE® определяли с помощью иммуноанализа. Сывороточные уровни BCMA BiTE® определяли с помощью иммуноанализа, в котором используется пара анти-CD3 идиотипических антител для покрытия и выявления молекул BiTE®. Профили сывороточная концентрация - время использовали для определения ФК-параметров. Соответствующую конфигурацию исследования корректировали относительно характеристик молекул BiTE® с учетом продолжительности в 1 или 2 недели. Моменты сбора образцов крови могут немного варьироваться и приведены для обеих конфигураций в табл. 5 ниже.

Таблица 5. Время сбора образцов крови во время ФК-исследования

время сбора образцов крови для 1-недельной продолжительности исследования [ч]	время сбора образцов крови для 2-недельной продолжительности исследования [ч]	время сбора образцов крови для соединения 10а; [ч] после начала инфузии	время сбора образцов крови для соединения 10b; [ч] после начала инфузии
0,05/0,085*	0,05/0,085*	0,085	
0,25	0,25	0,25	
0,5	0,5	0,5	
1	1	1	
2	2		
4*	4*	4	
8	8	8	
24 16	16		
24*	24*	24	
48*	48*	48	
72*	72*	72	
96	96		
120	120		
144	144		
168*	168*	168	168,00
	216		169,01
	240	240	172,01
	264		175,99
	336*	336	180,00

Время может варьироваться между одиночными исследованиями. Время, обозначенное звездочкой, является обязательным и общепринятым для всех исследований.

Фармакокинетика молекул ViTE®-HLE приведена в качестве примера в табл. 6. Группа каждого из соединений представляет один белок ViTE®, слитый с scFc-, hetFc-, HSA- (человеческим сывороточным альбумином, HALB), или кросстело-Fc-формат, или оставлена в виде канонической молекулы ViTE®. Для всех белков сывороточные уровни подлежали количественной оценке для всех моментов времени у всех животных после введения молекулы ViTE®-. ФК-профили демонстрируют двухфазное, экспоненциальное снижение после введения каждого отдельного исследуемого соединения.

Фармакокинетические параметры определяли, используя стандартные методы некомпартментного анализа (НКА). Используя некомпартментный анализ, оценили следующие ФК-параметры: $PPK_{беск.}$ (площадь под кривой сывороточная концентрация - время), V_{ss} (объем распределения в стационарном состоянии), CL (системное выведение) и терминальное $t_{1/2}$ (терминальное время полужизни).

ФК-параметры для каждого исследуемого соединения обобщены в виде среднего по $n=2$ и $n=3$ соответственно в табл. 6 ниже.

Таблица 6. Фармакокинетические параметры различных HLE-вариантов для разных связывающих мишень конструкций ViTE® у яванских макаков

исследуемое соединение	терминальное $t_{1/2}$ [ч]	ППК _{беск.} Нормализация к 15 мкг/кг [ч*нг/мл]	Cl [мл/ч/ кг]	Vss [мл/кг]
Соединение 1a	167	9981	1, 4	256
Соединение 1b	95	6159	2, 4	235
Соединение 1c	47	4498	3, 3	161
Соединение 2a	213	41173	0, 4	89
Соединение 2b	116	18745	0, 8	78
Соединение 2c	77	28928	1, 0	65
Соединение 2d	77	9825	1, 5	112
Соединение 3a	61	4109	3, 7	129
Соединение 3b	59	4561	3, 3	78
Соединение 3c	51	2769	6, 8	299
Соединение 3d	3	510	30, 0	653
Соединение 4a	97	7816	1, 9	181
Соединение 4b	62	3606	4, 2	292
Соединение 5a	234	30954	0, 5	144
Соединение 5b	173	18299	0, 8	166
Соединение 5c	142	26418	0, 6	103
Соединение 6a	97	15854	1, 0	103
Соединение 6b	48	77271	1, 0	64
Соединение 7	64	1971	7, 6	395
Соединение 8	122	17093	0, 9	119
Соединение 9	210	6729	2, 2	540
Соединение 10a	112	18772	0, 8	110
Соединение 10b	3	1677	62, 6	5268

Как правило, ФК-профиль для канонических молекул ВСМА-ViTE® демонстрирует очень крутое снижение профиля сывороточной концентрации, связанное с механизмом выведения этих канонических белков. Нацеленная на ВСМА конструкция ViTE®-scFc с продленным временем полужизни демонстрирует двухфазное, экспоненциальное снижение после введения каждого отдельного исследуемого соединения у яванских макаков.

В целом, молекула ВСМА-ViTE®, слитая с scFc HLE-модальностью (соединение 10a), демонстрирует среднюю ППК_{беск.}, составляющую 18772 ч·нг/мл, значение системного выведения 0,8 мл/ч/кг, а также соответствующий объем распределения 110 мл/кг.

Соединение 10b, каноническое, нацеленное на ВСМА ViTE® без продления времени полужизни, демонстрирует быстрое выведение, составляющее 62,6 мл/ч/кг, приводящее к низкой представленности в сыворотке, составляющей 1677 ч·нг/мл.

Разница в фармакокинетическом поведении двух разных исследованных модальностей ВСМА ViTE® всесторонне описывает преимущество нацеленного на ВСМА ViTE®-scFc с продленным временем полужизни над соответствующей канонической версией, в особенности в терминах времени удержа-

ния вещества в организме.

В целом, ППК_{беск.} для разных связывающих мишень BiTE®, слитых с -scFc, -hetFc, HAS или модальностью кросстело-HLE, соответственно, находится в диапазоне от 1971 ч·нг/мл до 77271 ч·нг/мл в зависимости от типа мишени BiTE®. Все проанализированные HLE-слияния достигали значений системного выведения от 0,4 до 7,6 мл/ч/кг. Соответствующий объем распределения находился в диапазоне от 68 до 540 мл/кг.

Соединение 3d, каноническое, связывающее мишень соединение 3 BiTE® без продления времени полужизни включено в качестве стандарта. Молекулы BiTE® без продления времени полужизни демонстрируют быстрое выведение, низкую сывороточную представленность и, как следствие, короткое терминальное время полужизни. Сравнение терминального времени полужизни в зависимости от модальности обобщено в табл. 7.

Таблица 7. Сравнение терминального времени полужизни в зависимости от модальности в исследованиях на яванских макаках

модальность HLE	терминальное $t_{1/2}$ [ч]
Каноническое BiTE®	3
BiTE®-scFc	61-234
BiTE®-hetFc	48-173
BiTE®-HALB	47-142
BiTE®-кросстело	77

После исследования до четырех продлевающих время полужизни (HLE) компонентов для каждого нацеливающего BiTE® становится понятно, что компонент -scFc демонстрирует повышение $t_{1/2}$ по сравнению с соответствующими другими продлевающими время полужизни компонентами после введения одной низкой дозы 6, 10, 12 и 15 мкг/кг (см. фиг. 6).

Пример 4.

В предварительно составленных лекарственных веществах, содержащих очищенные конструкции мишень A-hALB, мишень A-hFc и мишень A-scFc соответственно, проводили замену буфера посредством ультрафильтрации/диализации с применением мембран с номинальным отсечением по молекулярной массе (НОММ) 10 кДа. Конечную готовую форму получали путем добавления концентрированных исходных растворов. Полученные в результате готовые формы для каждой конструкции приведены в табл. 8. Концентрация целевого белка составляла 1,0 мг/мл. Приготовленные конструкции мишени A наливали до 1 во флаконы из стекла типа I, которые закрывали бутилкаучуковыми пробками и обжимали алюминиевыми колпачками. Наполненные флаконы инкубировали при 20, 5, 25 и 37°C. Один флакон с каждой версией подвергали пяти циклам замораживания и размораживания (З/Р). Целевая температура замораживания составляла 29°C. Целевая температура размораживания составляла 2°C. Скорость изменения составляла приблизительно 0,3 К/мин.

Подготовленные сотрудники оценивали видимые частицы в соответствии с методом, описанным Ph Eur 2.9.20. Число видимых частиц на флакон приведено в табл. 8. Число видимых (крупнее 125 мкм) белковых частиц было больше для конструкции мишень A-hFc по сравнению как с конструкцией мишень A-hALB, так и мишень A-scFc.

Таблица 8. Число видимых белковых частиц на флакон для подверженных и не подверженных стрессу (Т0) образцов, содержащих разные конструкции ВiТЕ® против мишени А с продленным временем полужизни

Конструкция	hALB	hFc		scFc	
Готовая форма	K60RTrT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
Число видимых (>125 мкм) белковых частиц на флакон					
Т0	0	0	1	0	0
5 циклов З/Р	0	2	2	0	1
2н 5°C	0	2	2	0	0
2н 25°C	0	2	1	0	0
2н 37°C	0	2	2	0	0
4н -20°C	0	2	1	0	0
4н 5°C	0	1	2	0	0
4н 25°C	0	2	2	0	0
4н 37°C	0	2	2	0	0

Вышеописанные образцы также анализировали методом эксклюзионной ультравысокоэффективной хроматографии (ЭХ-УЭЖХ), чтобы количественно оценить процентное содержание высокомолекулярных компонентов (ВМК). ЭХ-УЭЖХ проводили на УЭЖХ-системе AcquityH-Class (Waters), используя 150 мм колонку Acquity UPLC BEH200 SEC (Waters). Температура колонки была установлена на 25°C. Разделение размерных вариантов обеспечивали применением изократического метода со скоростью потока 0,4 мл/мин. Подвижная фаза состояла из 100 мМ фосфата натрия, 250 мМ NaCl при pH 6,8. Время анализа составляло в целом 6,0 мин. Образцы держали при 8°C в автодозаторе до проведения анализа. Вводили общее количество белка 3 мкг. Чтобы избежать загрязнения, после каждого образца проводили промежуточную инъекцию 40% ацетонитрила. Выявление базировалось на флуоресцентной эмиссии (возбуждение на 280 нм, эмиссия на 325 нм). Интегрирование пиков проводили с помощью программного обеспечения Empower®. Относительная площадь под кривой ВМК представлена в табл. 9.

Конструкции на основе Fc демонстрировали более низкое содержание ВМК в варианте готовой формы G40MSuT, чем в K60RTrT, независимо от стрессовых условий. Стало очевидно, что конструкция мишень А-scFc содержала меньше ВМК, чем мишень А-hFc в обоих препаратах G40MSuT, а также K60RTrT. Мишень А-scFc в своей предпочтительной готовой форме (G40MSuT) была менее предрасположена к образованию ВМК, чем мишень А-hALB, приготовленная в K60RTrT. В предыдущих экспериментах этот буфер демонстрировал улучшенный стабилизирующий потенциал для конструкций на основе hALB.

Таблица 9. Обобщенная информация по содержанию ВМК в подверженных и не подверженных стрессу (Т0) препаратах мишень А hALB, hFc и -scFc, определенному с помощью ЭХ-УЭЖХ

Конструкция	hALB	hFc		scFc	
Готовая форма	K60RTrT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
%ВМК					
Т0	1,8	6,7	3,3	2,5	1,3
5 циклов З/Р	2,0	7,2	4,1	3,0	1,5
2н 5°C	н. и.	н. и.	н. и.	2,9	1,1
2н 25°C	н. и.	6,6	2,7	2,4	0,5
2н 37°C	2,6	6,3	2,1	2,7	0,3
4н -20°C	5,9	8,7	1,6	6,6	0,3
4н 5°C	2,0	8,2	2,8	3,6	0,6
4н 25°C	2,2	6,8	2,6	2,7	0,4
4н 37°C	3,5	7,6	1,9	4,3	0,3

н. и. - не исследовано.

Распространенность химических модификаций после теплового стресса (инкубации при 37°C) от-

слеживали с помощью пептидного картирования. Образцы белка ферментативно расщепляли, а полученные в результате пептиды разделяли, используя обращенно-фазовую хроматографию. Элюат из колонки вводили непосредственно в источник ионов масс-спектрометра для идентификации и количественного определения пептидов.

Для достижения максимального покрытия проводили два отдельных ферментативных расщепления: одно трипсином, а одно химотрипсином. В каждом случае белки денатурировали гуанидиний хлоридом, а затем восстанавливали дитиотреитолом (ДТТ). После инкубации в ДТТ свободные цистеиновые остатки алкилировали путем добавления йодоуксусной кислоты. Затем для образцов проводили замену буфера на 50 мМ Трис, pH 7,8, для расщепления. Трипсин и химотрипсин добавляли в отдельные реакционные пробирки в соотношении 1:10 (образец:фермент) каждого. Расщепление образцов проводили в течение 30 мин при 37°C и гасили реакцию добавлением трифторуксусной кислоты.

5 мкг каждого продукта расщепления отдельно вводили в обращенно-фазовую колонку Zorbax SB-C18 (Agilent #859700-902), уравновешенную в 0,1% (об./об.) муравьиной кислоты (МК). Применяли 156-минутный градиент из до 90% ацетонитрила, содержащего 0,1% МК, для элюирования пептидов непосредственно в источник ионов для электрораспыления масс-спектрометра Q-Exactive Plus (Thermo Scientific). Данные получали в зависимом от данных режиме, используя метод топ-12, в котором за полным сканированием (разрешение 70000; диапазон сканирования 200 2000 m/z) следует индуцируемая высоко-энергетическим соударением диссоциация (HCD) 12 наиболее распространенных ионов (разрешение 17500).

Пептиды идентифицировали на основании точных масс- и tandemных масс-спектров, используя внутрилабораторное программное обеспечение. Результаты идентификации подтверждали вручную. Относительные количества модифицированных и немодифицированных пептидов рассчитывали на основании распространенности ионов, используя программное обеспечение Pinpoint (Thermo Scientific).

Процентное содержание химических модификаций определяющих комплементарность областей (CDR) и продлевающей время полужизни части (hALB или Fc), определенное в препаратах мишень A-hALB, -hFc и -scFc, приведено в табл. 10. При сравнении аналогичных условий приготовления становится очевидно, что в целом химические модификации были наименее распространены в scFc-конструкциях.

Таблица 10. Обобщенная информация по химическим модификациям в подверженных и не подверженных стрессу (T0) препаратах мишень A-hALB, -hFc и -scFc, определенным с помощью пептидного картирования

Конструкция	hALB	hFc		scFc	
Готовая форма	K60RTrT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
%N101 деамидирования (CDR)					
T0	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2
2н 37°C	0,7	0,8	3,0	0,7	3,2
4н 37°C	1,3	н. и.	8,5	н. и.	6,4
%N162 деамидирования (CDR)					
T0	3,0	1,7	1,9	2,3	2,5
2н 37°C	15,9	11,6	2,7	15,0	3,3
4н 37°C	26,8	н. и.	3,7	н. и.	4,1
%M279 окисления (CDR)					
T0	0,6	1,4	1,6	0,6	1,0

2н 37°C	1,2	0,8	0,8	0,6	1,0
4н 37°C	0,9	н. и.	0,8	н. и.	0,6
%N348 деамидирования (CDR)					
T0	0,5	3,2	3,3	0,5	0,9
2н 37°C	20,5	21,6	1,9	9,4	1,3
4н 37°C	22,8	н. и.	2,0	н. и.	2,9
%N351 деамидирования (CDR)					
T0	0,2	2,9	2,6	0,5	1,0
2н 37°C	6,6	12,7	0,9	3,8	0,4
4н 37°C	8,7	н. и.	0,8	н. и.	0,8
%M530 окисления (Fc)					
T0	н. п.	3,9	4,1	2,6	3,2
2н 37°C	н. п.	9,0	3,1	4,0	4,3
4н 37°C	н. п.	н. и.	3,4	н. и.	3,5
%N603 деамидирования (Fc)					
T0	н. п.	1,3	1,9	1,3	1,4
2н 37°C	н. п.	7,9	4,6	7,0	5,6
4н 37°C	н. п.	н. и.	6,9	н. и.	8,1
%M706 окисления (Fc)					
T0	н. п.	3,2	3,6	1,5	2,1
2н 37°C	н. п.	6,0	2,8	2,1	2,5
4н 37°C	н. п.	н. и.	2,6	н. и.	2,0
%M587 окисления (hALB)					
T0	1,0	н. п.	н. п.	н. п.	н. п.
2н 37°C	2,2	н. п.	н. п.	н. п.	н. п.
4н 37°C	2,3	н. п.	н. п.	н. п.	н. п.
%M623 окисления (hALB)					
T0	1,9	н. п.	н. п.	н. п.	н. п.
2н 37°C	2,4	н. п.	н. п.	н. п.	н. п.
4н 37°C	3,0	н. п.	н. п.	н. п.	н. п.
%M798 окисления (hALB)					
T0	1,4	н. п.	н. п.	н. п.	н. п.
2н 37°C	3,3	н. п.	н. п.	н. п.	н. п.
4н 37°C	3,5	н. п.	н. п.	н. п.	н. п.
%M829 окисления (hALB)					
T0	8,9	н. п.	н. п.	н. п.	н. п.
2н 37°C	42,9	н. п.	н. п.	н. п.	н. п.
4н 37°C	44,1	н. п.	н. п.	н. п.	н. п.

н. п. - не применимо; н. и. - не исследовано.

Пример 5.

Конструкции мишень A-hALB, -hFc, -scFc, приготовленные так, как описано в примере 4, подвергали эксперименту со скачком pH. Концентрация исходных материалов составляла 1,0 мг/мл. В стеклянный флакон наливали объем 0,38 мл каждого стартового материала. После предварительного кондиционирования при 37°C растворы разбавляли 20-кратным объемом фосфатно-солевого буфера (ФСБ), который состоял из 0,090М фосфата калия, 0,480М фосфата натрия (оба двухосновные), 0,052М хлорида калия и 2,76М NaCl. Разбавленные образцы инкубировали при 37°C в течение двух недель. После инкубации их анализировали с помощью ЭХ-УЭЖХ, используя метод, описанный в примере 4, а процентное содержание ВМК приведено в табл. 11. При сравнении всех конструкций, приготовленных в K60RTgT,

содержание ВМК возрастало в следующем порядке: hALB < scFc < hFc. Конструкция мишень A-scFc также демонстрировала более низкое содержание ВМК, чем мишень A-hFc при приготовлении в G40MSuT.

Таблица 11. Обобщенная информация по содержанию ВМК в подверженных стрессу (скачок pH+2н. 37°C) препаратах мишень A-hALB, -hFc и -scFc, определенному с помощью ЭХ-УЭЖХ

Конструкция	hALB	hFc		scFc	
Готовая форма	K60RTrT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
%ВМК					
2н 37°C	1,5	8,3	7,1	5,4	5,1

Пример 6.

Конструкции мишень A-hALB, -hFc и -scFc, приготовленные так, как описано в примере 4, подвергали стрессу, вызываемому встряской. Концентрация исходных материалов составляла 1,0 мг/мл. Объем 0,5 мл каждого раствора фильтровали через соответствующий 0,22 мкм фильтр и наливали во флаконы из стекла 3сс. Флаконы помещали в пластиковую коробку, убедившись, что флаконы не смещаются внутри коробки во время встряски. Коробку помещали на орбитальный встряхиватель. Образцы встряхивали при 500 об/мин в течение 65 ч. Видимые частицы оценивали в соответствии с методом, описанным Ph Eur 2.9.20. Этот метод осуществляли подготовленные сотрудники. Число видимых частиц на флакон приведено в табл. 12. Видимые белковые частицы наблюдали только в препаратах мишень A-hFc.

Таблица 12. Число видимых белковых частиц на флакон в подверженных встряске образцах

Конструкция	hALB	hFc		scFc	
Готовая форма	K60RTrT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
Число видимых (>125 мкм) белковых частиц на флакон					
65 ч, 500 об/мин	0	1	1	0	0

Вышеуказанные образцы также анализировали методом эксклюзионной ультравысокоэффективной хроматографии (ЭХ-УЭЖХ), чтобы количественно оценить процентное содержание высокомолекулярных компонентов (ВМК). Применяли тот же метод, который описан в примере 4. Содержание ВМК в образцах после встряски приведено в табл. 13. Образование ВМК было наиболее выражено для конструкции мишень A-hFc при сравнении препаратов K60RTrT. ВМК были больше распространены в случае конструкции мишень A-hFc, чем мишень A-scFc.

Таблица 13. Обобщенная информация по содержанию ВМК в подверженных стрессу (скачок pH+2н. 37°C) препаратах мишень A-hALB, -hFc и -scFc, определенному с помощью ЭХ-УЭЖХ

Конструкция	hALB	hFc		scFc	
Готовая форма	K60RTrT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
%ВМК					
65 ч, 500 об/мин	1,8	5,8	2,4	1,8	0,3

Пример 7.

Конструкции мишень A-hALB, -hFc и -scFc, приготовленные так, как описано в примере 4, подвергали воздействию видимого и УФА-света (фотостресс). Во всех препаратах общая концентрация белка составляла 1 мг/мл. Белковые растворы фильтровали через фильтр с размером пор 0,22 мкм и наливали в 0,5 мл флаконы из стекла типа I. Конструкции мишень A-hALB и -scFc подвергали двум разным испытаниям, включающим 0,2 Млк видимого света/25 Вт·ч/м² УФА-света и 1,2 Млк видимого света/173 Вт·ч/м² соответственно. Конструкцию мишень A-hFc подвергали двум разным испытаниям, включающим 0,2 Млк видимого света без УФА-света и 1,2 Млк видимого света/30 Вт·ч/м² УФА-света соответственно. Температуру в камере устанавливали на 25°C. После воздействия света образцы анализировали путем визуального осмотра (табл. 14), ЭХ-УЭЖХ (табл. 15) и пептидного картирования (табл. 16). Вышеуказанные методы осуществляли в соответствии с процедурами, описанными в примере 4. Хотя конструкции мишень A-hALB и -scFc подвергали воздействию более высоких доз УФА-света, видимых белковых частиц не наблюдали, тогда как образцы мишень A-hFc демонстрировали по одной видимой белковой частице на флакон в обоих испытаниях, независимо от приготовления.

Таблица 14. Обобщенная информация по числу видимых белковых частиц на флакон в препаратах мишень А-hALB, -hFc и -scFc, определенному после воздействия света

Конструкция	hALB	hFc		scFc	
Готовая форма	K60RTrT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
Число видимых (>125 мкм) белковых частиц на флакон					
T0	0	0	1	0	0
Испытание 1	0 ¹⁾	1 ²⁾	1 ²⁾	0 ¹⁾	0 ¹⁾
Испытание 2	0 ³⁾	1 ⁴⁾	1 ⁴⁾	0 ³⁾	0 ³⁾

¹⁾ 0,2 Млк видимого света/25 Вт·ч/м² УФА-света;

²⁾ 0,2 Млк видимого света без УФА-света;

³⁾ 1,2 Млк видимого света/173 Вт·ч/м²;

⁴⁾ 1,2 Млк видимого света/30 Вт·ч/м².

Количество ВМК возрастало в следующем порядке: мишень А-hALB < -scFc < -hFc, когда белок был приготовлен в K60RTrT. Количество ВМК могло быть снижено для конструкций на основе Fc при приготовлении в G40MSuT. При этом ВМК снова были менее выражены для конструкции мишень А-scFc. Оказалось, что конструкция мишень А-hFc в особенности чувствительна к воздействию УФА-света.

Таблица 15. Обобщенная информация по содержанию ВМК в препаратах мишень А-hALB, -hFc и -scFc, определенному после воздействия света с помощью ЭХ-УЭЖХ

Конструкция	hALB	hFc		scFc	
Готовая форма	K60RTrT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
%ВМК					
T0	1,8	6,7	3,3	2,5	1,3
Испытание 1	1,8 ¹⁾	6,3 ²⁾	2,5 ²⁾	2,1 ¹⁾	0,4 ¹⁾
Испытание 2	2,0 ³⁾	11,0 ⁴⁾	2,1 ⁴⁾	2,4 ³⁾	0,3 ³⁾

¹⁾ 0,2 Млк видимого света/25 Вт·ч/м² УФА-света;

²⁾ 0,2 Млк видимого света без УФА-света;

³⁾ 1,2 Млк видимого света/173 Вт·ч/м²;

⁴⁾ 1,2 Млк видимого света/30 Вт·ч/м².

Процентное содержание химических модификаций определяющих комплементарность областей (CDR) и продлевающей время полужизни части (hALB или Fc), определенное в препаратах мишень А-hALB, -hFc и -scFc, приведено в табл. 16. При сравнении аналогичных условий приготовления становится очевидно, что в целом химические модификации были наименее распространены в scFc-конструкциях.

Таблица 16. Обобщенная информация по химическим модификациям в препаратах мишень A-hALB, -hFc и -scFc, определенным после воздействия света с помощью пептидного картирования

Конструкция	hALB	hFc		scFc	
Готовая	K60RTrT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MS
форма					uT
%N101 деамидирования (CDR)					
T0	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2
Испытание 1	0,2 ¹⁾	н. и.	0,3 ²⁾	н. и.	0,5 ¹⁾
Испытание 2	0,2 ³⁾	н. и.	0,6 ⁴⁾	н. и.	0,7 ³⁾
%N162 деамидирования (CDR)					
T0	3,0	1,7	1,9	2,3	2,5
Испытание 1	3,0 ¹⁾	н. и.	2,1 ²⁾	н. и.	2,7 ¹⁾
Испытание 2	3,6 ³⁾	н. и.	3,1 ⁴⁾	н. и.	2,8 ³⁾
%M279 окисления (CDR)					
T0	0,6	1,4	1,6	0,6	1,0
Испытание 1	0,8 ¹⁾	н. и.	2,6 ²⁾	н. и.	0,6 ¹⁾
Испытание 2	1,0 ³⁾	н. и.	6,3 ⁴⁾	н. и.	0,7 ³⁾
%N348 деамидирования (CDR)					
T0	0,5	3,2	3,3	0,5	0,9
Испытание 1	0,4 ¹⁾	н. и.	2,7 ²⁾	н. и.	0,2 ¹⁾
Испытание 2	0,9 ³⁾	н. и.	3,9 ⁴⁾	н. и.	0,2 ³⁾
%N351 деамидирования (CDR)					
T0	0,2	2,9	2,6	0,5	1,0
Испытание 1	0,4 ¹⁾	н. и.	2,0 ²⁾	н. и.	0,3 ¹⁾
Испытание 2	0,5 ³⁾	н. и.	2,6 ⁴⁾	н. и.	0,3 ³⁾
%M530 окисления (Fc)					
T0	н. п.	3,9	4,1	2,6	3,2
Испытание 1	н. п.	н. и.	7,6 ²⁾	н. и.	3,1 ¹⁾
Испытание 2	н. п.	н. и.	21,8 ⁴⁾	н. и.	4,1 ³⁾
%M706 окисления (Fc)					
T0	н. п.	3,2	3,6	1,5	2,1
Испытание 1	н. п.	н. и.	6,5 ²⁾	н. и.	1,8 ¹⁾
Испытание 2	н. п.	н. и.	17,8 ⁴⁾	н. и.	2,7 ³⁾
%M587 окисления (hALB)					
T0	1,0	н. п.	н. п.	н. п.	н. п.
Испытание 1	1,5	н. п.	н. п.	н. п.	н. п.
Испытание 2	2,4	н. п.	н. п.	н. п.	н. п.
%M623 окисления (hALB)					

T0	1,9	н. п.	н. п.	н. п.	н. п.
Испытание 1	4,0	н. п.	н. п.	н. п.	н. п.
Испытание 2	4,1	н. п.	н. п.	н. п.	н. п.
%M798 окисления (hALB)					
T0	1,4	н. п.	н. п.	н. п.	н. п.
Испытание 1	2,1	н. п.	н. п.	н. п.	н. п.
Испытание 2	3,1	н. п.	н. п.	н. п.	н. п.
%M829 окисления (hALB)					
T0	8,9	н. п.	н. п.	н. п.	н. п.
Испытание 1	31,0	н. п.	н. п.	н. п.	н. п.
Испытание 2	25,2	н. п.	н. п.	н. п.	н. п.

н. п. - не применимо; н. и. - не исследовано.

Пример 8.

Конструкцию мишень A-hALB готовили в K60RTrT, а конструкцию мишень A-scFc готовили в G40MSuT в соответствии с процедурой, описанной в примере 4. Общая концентрация белка составляла 0,05 мг/мл. Стекланные (боросиликат, тип I, 13 мм 3сс флакон от West, арт. № 68000375) и полипропиленовые контейнеры для испытаний (2 мл с O-кольцом, например, от Sarstedt, арт. № 72.694.005) наполняли 500 мкл исследуемого раствора. Исследуемый раствор оставляли на пять минут в первом контейнере для испытаний. Затем отбирали 150 мкл аликвоту для анализа. Оставшийся исследуемый раствор (350 мкл) последовательно переносили из одного контейнера для испытаний в следующий (всего пять контейнеров). В каждом флаконе раствор оставляли на пять минут перед следующим переносом. На каждом этапе переноса использовали один и тот же наконечник для пипетки. Такое же испытание проводили, используя 30 мл поликарбонатные бутылки (Nalgene, PCS-000295 с крышкой, PP/20-415/ZTPE). В случае этого типа контейнера первый контейнер наполняли 5 мл. После отбора 150 мкл аликвоты оставшийся объем переносили из одного контейнера для испытаний в следующий (в соответствии с процедурой, описанной выше). Образцы, полученные из контейнера #1 и #5 анализировали с помощью ЭХ-УЭЖХ (методом, аналогичным описанному в примере 4). Дополнительно проводили выявление белка с помощью детектора с ФДМ (280 нм), чтобы определить концентрацию белков. Процентное восстановление белка из каждого контейнера для испытаний приведено в табл. 17. Было показано, что восстановление белка было более выражено для конструкции мишень A-scFc, чем для конструкции мишень A-hALB, независимо от типа контейнера.

Таблица 17. Восстановление белка из разных типов контейнеров для конструкций мишень A-hALB и -scFc, определенное с помощью ЭХ-УЭЖХ

Конструкция	hALB	scFc
Готовая форма	K60RTrT	G40MSuT
% Восстановления белка (от номинального)		
Стекло типа I	80,0	92,0
Полипропилен	87,0	97,3
Поликарбонат	87,0	96,0

Пример 9.

Конструкцию мишень A-hALB готовили в K60RTrT, а конструкцию мишень A-scFc готовили в K60RTrT и G40MSuT в соответствии с процедурой, описанной в примере 4. Общая концентрация белка составляла 1,0 мг/мл. 1950 мкл каждого исследуемого раствора дополняли 50 мкл 1000 м.д. кремниевого стандартного раствора (Specpure from AlfaAesar, Арт. № 38717), что приводило к получению 25 м.д. дополненного образца. Не дополненный исследуемый раствор служил в качестве контрольного образца. Дополненный исследуемый раствор с добавкой, а также контрольный образец наливали в 3сс флаконы из стекла типа I и инкубировали при 37°C в течение 24 ч. Все образцы анализировали с помощью ЭХ-УЭЖХ в соответствии с методом, описанным в примере 4, чтобы оценить количества ВМК (табл. 18). При приготовлении в K60RTrT, конструкции мишень A-hALB и -scFc демонстрировали аналогичное повышение числа ВМК после добавления кремния.

Таблица 18. Обобщенная информация по содержанию ВМК в препаратах мишень А-hALB и -scFc, определенному с помощью ЭХ-УЭЖХ после дополнения 25 м.д. кремния

Конструкция	hALB	scFc	
Готовая форма	K60RTrT	K60RTrT	G40MSuT
Δ %ВМК (по сравнению с не дополненным контролем)			
25 м. д. дополнение	1,0	1,0	0,2

Пример 10.

В предварительно составленных лекарственных веществах, содержащих очищенные конструкции мишень С (cc)-hALB, мишень С (cc)-hFc и мишень С (cc)-scFc соответственно, проводили замену буфера посредством ультрафильтрации/диализации с применением мембран с номинальным отсечением по молекулярной массе (НОММ) 10 кДа. Конечную готовую форму получали путем добавления концентрированных исходных растворов. Полученные в результате готовые формы для каждой конструкции приведены в табл. 19. Концентрация целевого белка составляла 1,0 мг/мл. Приготовленные конструкции мишень С (cc)-наливали до 1 мл во флаконы из стекла типа I, которые закрывали бутылкаучковыми пробками и обжимали алюминиевыми колпачками. Наполненные флаконы инкубировали при -20, 5, 25 и 37°C. Один флакон с каждой версией подвергали пяти циклам замораживания и размораживания (З/Р). Целевая температура замораживания составляла -29°C. Целевая температура размораживания составляла 2°C. Скорость изменения составляла приблизительно 0,3 К/мин. Вышеописанные образцы также анализировали методом эксклюзионной ультравысокоэффективной хроматографии (ЭХ-УЭЖХ), чтобы количественно оценить процентное содержание высокомолекулярных компонентов (ВМК). ЭХ-УЭЖХ проводили в соответствии с методом, описанным в примере 4. При приготовлении в K60RTrT количество ВМК в не подвергавшихся стрессу образцах возрастало в следующем порядке: scFc < hALB < hFc. Наименее выраженное повышение количества ВМК после стресса, связанного с замораживанием и размораживанием, наблюдали для scFc-конструкции. hFc-конструкция оказалась наиболее предрасположенной к образованию ВМК при 20°C. Содержание ВМК повышалось после 4 недель хранения при 5°C. Образование ВМК в этих условиях было более выраженным для конструкций на основе Fc, чем для конструкций на основе альбумина. В K60RTrT не наблюдали существенного повышения количества ВМК при повышенных температурах хранения (25 и 37°C). При приготовлении в G40MSuT все конструкции продемонстрировали сходное содержание ВМК в не подвергавшихся стрессу образцах. Повышение во время замораживания и размораживания больше отличалось в случае конструкций на основе Fc, если сравнивать с конструкциями на основе альбумина. В G40MSuT hFc-конструкция была наименее стабильной при хранении при 20°C. Значительное повышение количества ВМК при хранении в жидком виде наблюдали только для hALB-конструкции.

Таблица 19. Обобщенная информация по содержанию ВМК в подверженных и не подверженных стрессу (Т0) препаратах мишень С (cc)-hALB, -hFc и -scFc, определенному с помощью ЭХ-УЭЖХ

Конструкция	hALB		hFc		scFc	
Готовая форма	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
%ВМК						
Т0	1,5	0,3	2,7	0,3	1,3	0,3
5 циклов З/Р	2,0	0,5	3,1	0,7	1,6	0,7
2н - 20°C	н. и.	н. и.	н. и.	н. и.	1,5	0,5
2н 5°C	н. и.	н. и.	н. и.	н. и.	1,8	0,2
2н 25°C	1,7	0,6	2,3	0,2	1,3	0,2
2н 37°C	1,9	0,7	1,8	0,2	1,2	0,2
4н - 20°C	1,6	0,4	4,2	1,5	1,7	0,9
4н 5°C	1,9	0,3	3,3	0,3	2,1	0,4
4н 25°C	1,4	0,6	2,2	0,2	1,4	0,4
4н 37°C	1,3	0,7	2,0	0,1	1,4	0,3

н. и. - не исследовано.

Распространенность химических модификаций после теплового стресса (инкубации при 37°C) отслеживали с помощью пептидного картирования в соответствии с методом, описанным в примере 4. Процентное содержание химических модификаций определяющих комплементарность областей (CDR), определенное в препаратах мишень С (cc)-hALB, -hFc и -scFc, приведено в табл. 20. В целом, конструкции мишень С (cc)-scFc демонстрировали наименьшее количество химических модификаций в CDR. Стало очевидным, что в особенности деамидирование в CDR было наименее выраженным для scFc-конструкции.

Таблица 20. Обобщенная информация по химическим модификациям в подверженных и не подверженных стрессу (T0) препаратах мишень С (cc)-hALB, -hFc и -scFc, определенным с помощью пептидного картирования

Конструкция	hALB		hFc		scFc	
Готовая форма	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
%M34 окисления (CDR)						
T0	1,0	1,8	1,0	1,4	1,7	1,9
2н 37°C	0,9	1,3	0,9	1,1	1,0	1,7
4н 37°C	н. и.	н. и.	н. и.	1,6	н. и.	1,8
%D103 изомеризации (CDR)						
T0	0,8	0,8	0,8	0,8	0,6	0,6
2н 37°C	4,0	4,6	4,5	4,4	5,8	7,3
4н 37°C	н. и.	н. и.	н. и.	8,0	н. и.	12,4
%M290 окисления (CDR)						
T0	0,7	1,4	0,8	1	1,3	1,4
2н 37°C	0,7	1,0	0,8	0,8	0,8	1,3
4н 37°C	н. и.	н. и.	н. и.	1,2	н. и.	1,6
%N359 деамидирования (CDR)						
T0	5,8	11,4	5,3	6,3	0,4	0,5
2н 37°C	19,3	5,8	11,2	2,8	7,0	0,9
4н 37°C	н. и.	н. и.	н. и.	2,9	н. и.	2,2
%N362 деамидирования (CDR)						
T0	5,4	8,7	3,9	4,0	0,2	0,3
2н 37°C	13,5	3,6	6,7	1,2	3,1	0,3
4н 37°C	н. и.	н. и.	н. и.	1,4	н. и.	0,7

н.п. - не применимо; н.и. - не исследовано.

Пример 11.

Конструкции мишень С (cc)-hALB, -hFc и -scFc, приготовленные так, как описано в примере 4, подвергали эксперименту со скачком pH. Концентрация исходных материалов составляла 1,0 мг/мл. В стеклянный флакон наливали объем 0,38 мл каждого стартового материала. После предварительного кондиционирования при 37°C растворы дополняли 20-кратным объемом фосфатно-солевого буфера (ФСБ), который состоял из 0,090М фосфата калия, 0,480М фосфата натрия (оба двухосновные), 0,052М хлорида калия и 2,76М NaCl. Разбавленные образцы инкубировали при 37°C в течение двух недель. После инкубации их анализировали с помощью ЭХ-УЭЖХ, используя метод, описанный в примере 4, а процентное содержание ВМК приведено в табл. 21. Конструкции мишень С (cc)-scFc демонстрировали наименьшее содержание ВМК после скачка pH по сравнению с конструкциями мишень С (cc)-hALB и -hFc, независимо от приготовления.

Таблица 21. Обобщенная информация по содержанию ВМК в подверженных стрессу (скачок pH+2н. 37°C) препаратах мишень С (cc)-hALB, -hFc и -scFc, определенному с помощью ЭХ-УЭЖХ

Конструкция	hALB		hFc		scFc	
Готовая форма	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
%ВМК						
2н 37°C	1,7	4,8	1,6	1,8	1,1	1,5

Пример 12.

Конструкции мишень С (cc)-hALB, -hFc и -scFc, приготовленные так, как описано в примере 4, подвергали стрессу, вызываемому встряской. Концентрация исходных материалов составляла 1,0 мг/мл. Объем 0,5 мл каждого раствора фильтровали через соответствующий 0,22 мкм фильтр и наливали в 3cc флаконы из стекла типа I. Флаконы помещали в пластиковую коробку, убедившись, что флаконы не смещаются внутри коробки во время встряски. Коробку помещали на орбитальный встряхиватель. Образцы встряхивали при 500 об/мин в течение 65 ч. Образцы анализировали методом ЭХ-УЭЖХ, чтобы количественно оценить процентное содержание высокомолекулярных компонентов (ВМК). Применяли тот же метод, который описан в примере 4. Содержание ВМК в образцах после встряски приведено в табл. 22. Образование ВМК было наименее выражено для конструкции мишень С (cc)-scFc в любой готовой форме.

Таблица 22. Обобщенная информация по содержанию ВМК в подверженных стрессу (скачок pH+2н. 37°C) препаратах мишень С (cc)-hALB, -hFc и -scFc, определенному с помощью ЭХ-УЭЖХ

Конструкция	hALB		hFc		scFc	
Готовая форма	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
%ВМК						
65 ч, 500 об/мин	2,1	0,8	2,3	0,4	1,3	0,2

Пример 13.

Конструкции мишень С (cc)-hALB, -hFc и -scFc, приготовленные так, как описано в примере 4, подвергали воздействию видимого и УФА-света (фотостресс). Во всех препаратах общая концентрация белка составляла 1 мг/мл. Белковые растворы фильтровали через фильтр с размером пор 0,22 мкм и наливали в 0,5 мл стеклянные флаконы типа I. Конструкции мишень С (cc)-hALB и -scFc подвергали двум разным испытаниям, включающим 0,2 Млк видимого света/25 Вт·ч/м² УФА-света и 1,2 Млк видимого света/173 Вт·ч/м² соответственно. Конструкцию мишень С (cc)-hFc подвергали двум разным испытаниям, включающим 0,2 Млк видимого света без УФА-света и 1,2 Млк видимого света/30 Вт·ч/м² УФА-света соответственно. Температуру в камере устанавливали на 25°C. После воздействия света образцы анализировали методом ЭХ-УЭЖХ (табл. 23) и пептидного картирования (табл. 24).

Вышеуказанные методы осуществляли в соответствии с процедурами, описанными в примере 4. Несмотря на более высокую интенсивность УФА-света, применяемую к конструкции мишень С (cc)-scFc, эта конструкция была стабильной против образования ВМК. В противоположность этому, конструкции мишень С (cc)-hFc и мишень С (cc)-hALB демонстрировали повышение количества ВМК после 2 условий испытаний.

Таблица 23. Обобщенная информация по содержанию ВМК в препаратах мишень С (cc)-hALB, -hFc и -scFc, определенному после воздействия света с помощью ЭХ-УЭЖХ

Конструкция	hALB		hFc		scFc	
Готовая форма	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
%ВМК						
T0	1,5	0,3	2,7	0,3	1,3	0,3
Испытание 1	1. 8 ¹	0. 3 ¹	2. 5 ²	0. 3 ²	1. 4 ¹	0. 3 ¹
Испытание 2	4,6 ³	1,1 ³	6,0 ⁴	0,7 ⁴	1,5 ³	0,3 ³

¹) 0,2 Млк видимого света/25 Вт·ч/м² УФА-света;

²) 0,2 Млк видимого света без УФА-света;

³) 1,2 Млк видимого света/173 Вт·ч/м²;

⁴) 1,2 Млк видимого света/30 Вт·ч/м².

В целом, химические модификации после воздействия света были наименее выражены для конструкции мишень С (cc)-scFc. В особенности деамидирование CDR в большей степени проявлялось в конструкциях мишень С (cc)-hALB и мишень С (cc)-hFc. По сравнению с конструкциями на основе Fc было обнаружено, что конструкция мишень С (cc)-scFc была менее предрасположена к химическим модифи-

кациям Fc-части, хотя scFc-конструкцию подвергали более высоким дозам УФ-света, чем hFc-конструкцию. В табл. 24 также перечислены наиболее распространенные химические модификации альбуминовой части в конструкции мишень С (cc)-hALB, демонстрируя, что продлевающая время полужизни часть этой конструкции была более химически деградирована, чем Fc-части конструкции мишень С (cc)-hFc и -scFc.

Таблица 24. Обобщенная информация по химическим модификациям в препаратах мишень С (cc)-hALB, -hFc и -scFc, определенным после воздействия света с помощью пептидного картирования

Конструкция	hALB		hFc		scFc	
Готовая форма	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
%M34 окисления (CDR)						
T0	1,0	1,8	1,0	1,4	1,7	1,9
Испытание 1	1,5 ¹⁾	н. и.	0,7 ²⁾	4,2 ²⁾	1,4 ¹⁾	1,2 ¹⁾
Испытание 2	1,7 ³⁾	н. и.	1,1 ⁴⁾	4,2 ⁴⁾	1,3 ³⁾	1,7 ³⁾
%D103 изомеризации (CDR)						
T0	0,8	0,8	0,8	0,8	0,6	0,6
Испытание 1	0,8 ¹⁾	н. и.	0,9 ²⁾	0,9 ²⁾	0,8 ¹⁾	1,0 ¹⁾
Испытание 2	1,1 ³⁾	н. и.	1,2 ⁴⁾	1,4 ⁴⁾	1,0 ³⁾	1,3 ³⁾
%M290 окисления (CDR)						
T0	0,7	1,4	0,8	1	1,3	1,4
Испытание 1	1,1 ¹⁾	н. и.	0,5 ²⁾	3,3 ²⁾	1,0 ¹⁾	0,9 ¹⁾
Испытание 2	1,4 ³⁾	н. и.	1,1 ⁴⁾	4,2 ⁴⁾	1,0 ³⁾	1,4 ³⁾
%N359 деамидирования (CDR)						
T0	5,8	11,4	5,3	6,3	0,4	0,5
Испытание 1	10,8 ¹⁾	н. и.	4,5 ²⁾	5,6 ²⁾	0,4 ¹⁾	0,2 ¹⁾
Испытание 2	12,4 ³⁾	н. и.	10,3 ⁴⁾	3,6 ⁴⁾	0,6 ³⁾	0,2 ³⁾
%N362 деамидирования (CDR)						
T0	5,4	8,7	3,9	4,0	0,2	0,3
Испытание 1	8,8 ¹⁾	н. и.	3,4 ²⁾	3,5 ²⁾	0,3 ¹⁾	0,3 ¹⁾
Испытание 2	9,8 ³⁾	н. и.	6,4 ⁴⁾	2,3 ⁴⁾	0,5 ³⁾	0,3 ³⁾
%D510 изомеризации (Fc)						
T0	н. п.	н. п.	0,4	0,4	0,5	0,4
Испытание 1	н. п.	н. п.	0,4 ²⁾	0,6 ²⁾	0,6 ¹⁾	0,5 ¹⁾
Испытание 2	н. п.	н. п.	0,7 ⁴⁾	0,7 ⁴⁾	0,7 ³⁾	0,7 ³⁾
%M541 окисления (Fc)						
T0	н. п.	н. п.	2,8	3	3,7	4,1

Испытание 1	н. п.	н. п.	5, 0 ²⁾	0, 7 ²⁾	3, 8 ¹⁾	3, 8 ¹⁾
Испытание 2	н. п.	н. п.	17, 5 ⁴⁾	18, 4 ⁴⁾	4, 8 ³⁾	5, 5 ³⁾
%N614 деамидирования (Fc)						
T0	н. п.	н. п.	1, 2	1, 2	1, 6	1, 5
Испытание 1	н. п.	н. п.	1, 3 ²⁾	1, 7 ²⁾	2, 8 ¹⁾	2, 2 ¹⁾
Испытание 2	н. п.	н. п.	6, 1 ⁴⁾	1, 9 ⁴⁾	1, 9 ³⁾	2, 3 ³⁾
%N673 деамидирования (Fc)						
T0	н. п.	н. п.	0, 3	0, 3	0, 0	0, 0
Испытание 1	н. п.	н. п.	0, 5 ²⁾	0, 6 ²⁾	0, 5 ¹⁾	0, 6 ¹⁾
Испытание 2	н. п.	н. п.	0, 5 ⁴⁾	0, 6 ⁴⁾	0, 5 ³⁾	1, 5 ³⁾
%M717 окисления (Fc)						
T0	н. п.	н. п.	2, 1	2, 4	2, 5	2, 8
Испытание 1	н. п.	н. п.	4, 1 ²⁾	7, 3 ²⁾	2, 2 ¹⁾	2, 3 ¹⁾
Испытание 2	н. п.	н. п.	13, 7 ⁴⁾	13, 5 ⁴⁾	2, 8 ³⁾	3, 8 ³⁾
%M598 окисления (hALB)						
T0	1, 0	н. и.	н. п.	н. п.	н. п.	н. п.
Испытание 1	2, 3 ¹⁾	н. и.	н. п.	н. п.	н. п.	н. п.
Испытание 2	6, 4 ³⁾	н. и.	н. п.	н. п.	н. п.	н. п.
%M809 окисления (hALB)						
T0	1, 8	н. и.	н. п.	н. п.	н. п.	н. п.
Испытание 1	3, 5 ¹⁾	н. и.	н. п.	н. п.	н. п.	н. п.
Испытание 2	8, 3 ³⁾	н. и.	н. п.	н. п.	н. п.	н. п.
%M840 окисления (hALB)						
T0	12, 8	н. и.	н. п.	н. п.	н. п.	н. п.
Испытание 1	32, 0 ¹⁾	н. и.	н. п.	н. п.	н. п.	н. п.
Испытание 2	61, 7	н. и.	н. п.	н. п.	н. п.	н. п.
%K1036 гликирования (hALB)						
T0	10, 1	н. и.	н. п.	н. п.	н. п.	н. п.
Испытание 1	10, 2 ¹⁾	н. и.	н. п.	н. п.	н. п.	н. п.
Испытание 2	9, 9 ³⁾	н. и.	н. п.	н. п.	н. п.	н. п.

¹⁾ 0,2 Млк видимого света/25 Вт·ч/м² УФА-света;

²⁾ 0,2 Млк видимого света без УФА-света;

³⁾ 1,2 Млк видимого света/173 Вт·ч/м²;

⁴⁾ 1,2 Млк видимого света/30 Вт·ч/м².

Пример 14.

Исследовали разные конструкции антител BiTE®, сконструированные для нацеливания на мишень F, включая мишень F без продления времени полужизни (не-HLE, каноническую), мишень F-hALB и мишень F-scFc. Концентрация целевого белка составляла 1,0 мг/мл для hALB и scFc и 0,4 мг/мл для не-HLE версии.

Приготовленные конструкции антител BiTE® наливали до 1 мл во флаконы из стекла типа I, которые закрывали бутылкаучковыми пробками и обжимали алюминиевыми колпачками. Наполненные флаконы инкубировали при -20°C и 37°C (без и с 25 м.д. кремния, который известен своим потенциалом индуцировать агрегацию белков) в течение 4 недель. Вышеуказанные конструкции также подвергали воздействию света (1,2 Млк видимого света/173 Вт·ч/м² УФА-света). В случае стресса, вызванного светом, температуру в камере устанавливали на 25°C. Образцы, хранимые при -70°C, служили в качестве контроля (T0).

Вышеописанные образцы анализировали в дубликатах методом эксклюзионной ультравысокоэффективной хроматографии (ЭХ-УЭЖХ), чтобы количественно оценить процентное содержание высокомолекулярных компонентов (ВМК). ЭХ-УЭЖХ проводили на УЭЖХ-системе Aquity H-Class (Waters), используя 150 мм колонку Acquity UPLC BEH200 SEC (Waters). Температура колонки была установлена на 25°C. Разделение размерных вариантов обеспечивали применением изократического метода со скоростью потока 0,4 мл/мин. Подвижная фаза состояла из 100 мМ фосфата натрия, 250 мМ NaCl, pH 6,8. Время анализа составляло в целом 6,0 мин. Образцы держали при 8°C в автодозаторе до проведения ана-

лиза. Вводили общее количество белка 3 мкг. Чтобы избежать загрязнения после каждого образца проводили промежуточную инъекцию 40% АЦН. Выявление базировалось на флуоресценции (возбуждение на 280 нм, эмиссия на 325 нм). Интегрирование пиков проводили с помощью программного обеспечения Empower®. Представлена относительная площадь под кривой ВМК (табл. 25).

Среди не подверженных стрессу образцов ВМК были наименее выражены для scFc-конструкции. Образование ВМК наблюдали исключительно во время 4-недельного хранения при -20°C. Содержание ВМК в этих условиях возрастало в следующем порядке scFc < hALB < не-HLE.

Таблица 25. Обобщенная информация по содержанию ВМК в подверженных и не подверженных стрессу (Т0) препаратах мишень F-не-HLE, -hALB и -scFc, определенному с помощью ЭХ-УЭЖХ

Конструкция	не-HLE (каноническая)	hALB	scFc
Т0	1,3%	1,3%	1,0%
4н -20°C	4,6%	1,8%	1,6%
4н 37°C	0,9%	0,6%	0,5%
4н 37°C (25 м. д. кремния)	1,1%	0,8%	0,8%
Воздействие света	1,0%	0,9%	0,5%

В дополнение образцы после теплового стресса в отсутствие и присутствии кремния оценивали в отношении наличия невидимых невооруженным глазом частиц методом микрофлюидной визуализации (МФВ), используя Flowcam от Fluid Imaging Technologies, Inc. Прибор был оборудован проточной ячейкой FC80FV. Применяли десятикратное оптическое увеличение. Применимость системы подтверждали с помощью не содержащей частиц воды. Применяли скорость автоматического получения изображений 20 кадров в секунду. Теневое и световое пороговые значения были установлены на 25 и 20 пикселей соответственно. Общий объем образца для одного измерения составлял 0,25 мл. Измерения образцов проводили в трипликатах. Перед каждым трипликатом систему промывали 0,5 мл соответствующих растворов образцов. В начале и между каждым из трипликатов проводили промывку 1,0 мл не содержащей частиц воды. Оценку данных проводили с помощью программного обеспечения Visual Spreadsheet. Измерения образцов проводили в трипликатах. Результаты приведены в табл. 26.

Тепловой стресс приводил к образованию невидимых невооруженным глазом частиц в препаратах, содержащих конструкции не-HLE и hALB. scFc-конструкция, наоборот, оставалась стабильной. Добавление кремния не стимулировало образование невидимых невооруженным глазом частиц независимо от природы конструкции антитела BiTE®.

Таблица 26. Оценка невидимых невооруженным глазом частиц методом МФВ в препаратах мишень F-не-HLE (каноническая), -hALB и -scFc после теплового стресса в отсутствие и присутствии кремния

Конструкция	не-HLE (каноническая)				hALB				scFc			
	≥ 2	≥ 5	≥ 10	≥ 25	≥ 2	≥ 5	≥ 10	≥ 25	≥ 2	≥ 5	≥ 10	≥ 25
Размер частиц [мкм]												
Т0	146	35	12	0	281	71	35	0	298	150	33	0
4н 37°C	410	163	23	0	742	225	11	0	110	44	0	0
4н 37°C (25 м. д. кремния)	69	35	11	0	272	91	34	0	146	55	11	0

Образцы, которые подвергали тепловому стрессу, также анализировали методом слабой катионообменной (СКО) хроматографии, чтобы количественно оценить содержание зарядовых вариантов, используя UPLC Aquity H-класса от Waters. Применяли 4,6×100 мм колонку Protein-Pak Hi Res CM 7im (Waters, кат. № 186004929). Температуру колонки устанавливали на 30°C. Скорость потока устанавливали на 0,65 мл/мин. Применяемый градиент был спроектирован следующим образом (табл. 27). Температуру автодозатора поддерживали при 2-8°C.

Таблица 27. Градиент, применяемый для СКО хроматографии

Время [мин:с]	% А 20 мМ фосфата натрия, pH 6,5	% В 20 мМ фосфата натрия, 250 мМ хлорида натрия, pH 6,5
00:00	100	0
04:00	100	0
25:00	50	50
25:01	0	100
29:00	0	100
29:01	100	0
33:00	100	0

Вводили общее количество белка 3 мкг. Выявление базировалось на флуоресценции (возбуждение на 280 нм, эмиссия на 325 нм). Интегрирование пиков проводили с помощью программного обеспечения Empower®. Относительные площади под кривыми основного пика, а также для кислых и основных зарядовых вариантов приведены в табл. 28.

Тепловой стресс приводил к снижению процентной доли, приходящейся на основной пик, что должно быть связано с преобладающим образованием кислых зарядовых вариантов. Уменьшение процентной доли, приходящейся на основной пик, было наименее выражено для scFc-конструкции (7,5%). Основные зарядовые варианты образовывались в обеих конструкциях с продлением времени полужизни после воздействия света. Повышение количества основных зарядовых вариантов находилось в диапазоне от 5 до 6% в конструкциях hALB и scFc.

Таблица 28. Оценка зарядовых вариантов методом СКО-хроматографии в препаратах мишень F-не-HLE (каноническая), -hALB и -scFc после индуцированного теплом и светом стресса

Конс трук ция	Не-HLE (каноническая)			hALB			scFc		
	% основн ой	% кислы х	% основн ых	% основн ой	% кислы х	% основн ых	% основн ой	% кислы х	% основн ых
T0	89,9	3,6	6,5	83,3	0,7	16,0	74,5	3,4	22,1
4н 37°C	79,3	11,1	9,5	75,6	9,8	14,6	67,0	11,2	21,8

В дополнение чистоту образцов оценивали в подвергнутых тепловому и световому стрессу образцах, используя анализ методом микрофлюидного капиллярного электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия (КЭ-ДСН) на основе системы LabChip GXII (Perkin Elmer). Денатурирующий раствор для образцов состоял из буфера для образца HT Protein Express (поставляемого Perkin Elmer) с добавлением 34 мМ дитиотреитола. Каждый образец развели 1:8 денатурирующим раствором и нагревали до 70°C в течение 10 мин вместе с лэддером protein express. В 40 мкл денатурированного образца добавляли 35 мкл воды для инъекций (ВДИ). В 12 мкл лэддера добавляли 120 мкл ВДИ. Образцы, лэддер, промыточный буфер protein express, гелевый краситель и обесцвечивающий раствор переносили в соответствующие резервуары. Образцы загружали электрокинетическим способом из микротитровального планшета на чип, объединяя разделение, окрашивание, обесцвечивание и выявления белка и его размерных вариантов. Оценивали полученные в результате электрофорограммы и записывали изменения в чистоте. Общая информация по выраженной в процентах чистоте, зарегистрированной после стресса, приведена в табл. 29 и сравнена с не подвергнутыми стрессу образцами (T0).

Более высокую чистоту наблюдали для конструкций hALB и scFc по сравнению с конструкцией не-HLE во всех условиях. Небольшое снижение чистоты по сравнению с T0 было зарегистрировано для конструкций hALB и scFc после теплового и светового стресса. Снижение чистоты после 4-недельного хранения при 37°C составляло в общем 8,4% для конструкции hALB и 6,6% для конструкций scFc. Снижение после воздействия света было сравнимо для конструкций hALB и scFc.

Таблица 29. Обобщенная информация по выраженной в процентах чистоте в подверженных и не подверженных стрессу (Т0) препаратах мишень F-не-HLE, -hALB и -scFc, определенной с помощью LabChip GXII (Caliper)

Конструкция	He-HLE (каноническая)	hALB	scFc
Т0	57,4	96,0	92,2
4н 37°C	60,6	87,6	85,6
Воздействие света	61,5	90,1	86,4

Пример 15.

Готовили разные конструкции антител BiTE®, сконструированные для нацеливания на мишень E, включая мишень E-hALB и мишень E-scFc, соответственно. Концентрация целевого белка составляла 1,0 мг/мл для обеих конструкций. Приготовленные конструкции антител BiTE® наливали до 1 мл во флаконы из стекла типа I, которые закрывали бутылкаучуковыми пробками и обжимали алюминиевыми колпачками. Наполненные флаконы инкубировали при 37°C (мишень E-hALB) и 40°C (мишень E-scFc) в течение 4 недель. Образцы, хранимые при -70°C, служили в качестве контроля (Т0). Образцы анализировали с помощью ЭХ-УЭЖХ в соответствии с методом, описанным в Примере 13. Результаты приведены в табл. 30.

scFc-конструкция демонстрировала меньшее снижение количества мономеров (2,3%) после теплового стресса по сравнению с конструкцией hALB (4,0%), хотя температура инкубации была немного выше.

Таблица 30. Обобщенная информация по процентной доле, приходящейся на мономерный пик, в подверженных и не подверженных стрессу (Т0) препаратах мишень F-hALB и -scFc, определенной с помощью ЭХ-УЭЖХ

Конструкция	hALB	scFc
Т0	97,6%	99,8%
4w	93,6%	97,5%

Пример 16.

Исследовали разные конструкции антител BiTE®, сконструированные для нацеливания на мишень I, включая мишень I-X-тело и мишень I-scFc. Концентрация целевого белка составляла 1,0 мг/мл. Приготовленные конструкции антител BiTE® наливали до 1 мл во флаконы из стекла типа I, которые закрывали бутылкаучуковыми пробками и обжимали алюминиевыми колпачками.

Наполненные флаконы инкубировали при -20°C и 37°C в течение 4 недель. Кроме того, все образцы подвергали воздействию 1,2 Млк видимого света и 173 Вт·ч/м² УФ-А-света. Температуру в камере устанавливали на 25°C. Образцы, хранимые при -70°C, служили в качестве контроля (Т0). Образцы, хранимые при -20 и -37°C, анализировали с помощью ЭХ-УЭЖХ в соответствии с методом, описанным в примере 13. Результаты приведены в табл. 31.

scFc-конструкция сохраняла более высокое содержание мономеров при хранении в течение четырех недель при -20 и 37°C соответственно по сравнению с X-телом.

Таблица 31. Обобщенная информация по содержанию мономеров в подверженных и не подверженных стрессу (Т0) препаратах мишень I-X-тело и -scFc, определенному с помощью ЭХ-УЭЖХ

Конструкция	X-тело	scFc
Т0	100,0	98,8
4н -20°C	97,1	97,9
4н 37°C	94,5	95,7

Кроме того, не подверженные стрессу образцы оценивали в отношении наличия невидимых невооруженным глазом частиц с помощью микрофлюидной визуализации (МФВ), используя метод, описанный в примере 13. Результаты приведены в табл. 32. Препарат мишень I-scFc демонстрировал существенно меньшие количества невидимых невооруженным глазом частиц по сравнению с препаратом мишень I-X-тело. Это применимо ко всем включенным размерным фракциям.

Таблица 32. Оценка невидимых невооруженным глазом частиц методом МФВ в не подверженных стрессу конструкциях мишень I-X-тело и -scFc

В не подверженных стрессу конструкциях мишень T-X тело и scFc								
Конструкция	X-тело				scFc			
Размер частиц [мкм]	≥ 2	≥ 5	≥ 10	≥ 25	≥ 2	≥ 5	≥ 10	≥ 25
T0	2648	688	192	32	160	64	43	11

Образцы, которые подвергали световому стрессу, также анализировали методом слабой катионообменной (СКО) хроматографии, чтобы количественно оценить процентное содержание зарядовых вариан-

тов, используя UPLC Aquity H-класса от Waters в соответствии с методом, описанным в примере 13. Относительные площади под кривыми основного пика, а также для кислых и основных зарядовых вариантов приведены в табл. 33.

scFc-конструкция продемонстрировала повышенную стабильность после воздействия света по сравнению с X-телом, на что указывает менее выраженное уменьшение основного пика, которое в общем составило 1,4% по сравнению с 5,5% для конструкции X-тела.

Таблица 33. Оценка зарядовых вариантов методом СКО-хроматографии в препаратах мишень I-X-тело и -scFc после индуцированного теплом и светом стресса

Конструкция	X-тело			scFc		
	%, основной	%, кислых	%, основных	%, основн й	%, кислых	%, основн ых
T0	51,4	30,3	18,3	83,5	1,3	15,2
Воздействие света	45,9	33,2	20,9	82,1	1,2	16,7

Пример 17. Эксклюзионная хроматография биспецифических scFc-вариантов.

Конструкции D9F, T2G, D3L, T7I и K6C (см. фиг. 7) исследовали в отношении их поведения во время испытаний методом эксклюзионной хроматографии в соответствии со стандартными процедурами. Конкретнее, определенное количество, составляющее 25 мкг, каждой конструкции анализировали (при 750 мкл/мин) в цитратном лизиновом буфере (10 mM и 75 mM, pH7) на колонке Superdex 200 increase 10/300GL при комнатной температуре и записывали ОП на 280 нм. После этого проводили сравнение конструкций в отношении времени удержания. В результате конструкция D9F демонстрировала существенно замедленное элюирование (табл. 34) по сравнению с T2G, D3L, T7I и K6C, что указывает на разницу в структуре/упорядочении Fc-доменов. Эта разница во времени удержания была наиболее существенной в случае конструкции T7I, содержащей неспаренные цистеины в шарнирной области и связь CH2 и CH2CH3 с CH3 (18,98 мин и 18,62 мин, разница 0,36 мин). При этом разница во времени удержания в 0,16 мин между D9F и T2G является существенной, учитывая соответствующее время удержания БСА-контроля. БСА-контроль показывал время удержания 19,07 мин для мономеров и 16,82 мин для димеров, демонстрируя разницу в 2,25 мин во времени удержания в случае удвоенной молекулярной массы. Следовательно, так как конструкции имеют структурную разницу только в Fc-части, разница во времени удержания в 0,16 мин является существенной. В целом, конструкция D9F продемонстрировала наибольшее время удержания, что указывает на самое сильное связывание. Этот вывод позволяет ожидать, что D9F также имеет самое большое время полужизни in vivo.

Таблица 34

Конструкция	Время удержания в мин
D9F	18,98
T2G	18,82
D3L	18,78
K6C	18,77
T7I	18,62
Мономер БСА	19,07
Димер БСА	16,82

Пример 18. Определение методом поверхностного плазмонного резонанса связывания с человеческим FcRn (FCGRT/B2M).

Каждую из конструкций D9F, T2G, D3L, T7I и K6C (фиг. 7) исследовали в отношении их способности к связыванию с человеческим FcRn в ППР (Biacore) экспериментах в соответствии со стандартными процедурами. Конкретнее, сенсорные чипы CM5 (GE Healthcare) иммобилизовали 450-500 ЕО FCGRT/B2M (ACRO Biosystems), используя буфер на основе ацетата Na, pH 4,5, и подвижный буфер, состоящий из 200 mM ГЭПЭС, 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТК, pH 6,0. Затем конструкции вводили в последовательных опытах в двух концентрациях 250 и 125 нМ, разведенных в 200 mM ГЭПЭС, 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТК, pH 6,0, и при 36°C. Ассоциацию проводили в течение 90 с со скоростью потока 30 мкл/мин с последующей фазой диссоциации в течение 90 с со скоростью потока 30 мкл/мин в 200 mM ГЭПЭС, 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТК, pH 6,0, при 36°C. Последующее восстановление проводили в течение 10 с при 30 мкл/мин с помощью 10 mM ГЭПЭС, 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТК, pH 7,4.

Максимальное связывание во время инъекционной фазы измеряли для всех конструкций в соответствующих единицах ответа (ЕО), эквивалентных увеличению молекулярной массы на покрытом FcRn чипе CM5 вследствие наличия связанной конструкции. Все конструкции измеряли в дубликатах. Средние значения определения дубликатов приведены на фиг. 8А и 8В соответственно.

В результате конструкция D9F демонстрировала существенно большее увеличение массы на по-

крытом FcRn чипе CM5 по сравнению с T2G, D3L, T7I и K6C, что указывает на большую аффинность связывания D9F с человеческим FcRn. Это наблюдение имело место для обеих концентраций соответствующих конструкций.

Связывание с FcRn опосредуется Fc-частью в конструкциях. Более сильное связывание с человеческим FcRn, согласно описанию в литературе, является показателем большего времени полужизни *in vivo* благодаря более высокому внутриклеточному сохранению соответствующего белка и, следовательно, сниженного уровня деградации. По этой причине более сильное связывание D9F с человеческим FcRn по сравнению с другими конструкциями делает эту молекулу бесспорно превосходящей в качестве основы для терапевтических молекул, обеспечивающей более длительное нахождение потенциального лекарственного препарата в организме пациента и меньшую частоту введения лекарственного препарата.

Пример 19. Определение методом поверхностного плазмонного резонанса связывания с человеческим FcRn (FCGRT/B2M).

Каждую из конструкций D9F, T2G, D3L, T7I и K6C и человеческое IgG1-к антитело MT201 исследовали в отношении их способности к связыванию с человеческим FcRn в ППП (Biacore) экспериментах в соответствии со стандартными процедурами. Конкретнее, сенсорные чипы CM5 (GE Healthcare) иммобилизовали около 350 ЕО FCGRT/B2M (ACRO Biosystems), используя буфер на основе ацетата Na, pH 4,5, и подвижный буфер, состоящий из 200 мМ ГЭПЭС, 150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТК, pH 6,0. Затем конструкции и человеческий IgG1-к контроль (MT201) вводили в концентрации 125 нМ, разведенной в 200 мМ ГЭПЭС, 150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТК, pH 6,0, и при 36°C. Ассоциацию проводили в течение 90 с со скоростью потока 30 мкл/мин с последующей фазой диссоциации в течение 60 с со скоростью потока 30 мкл/мин в 200 мМ ГЭПЭС, 150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТК, pH 6,0, при 36°C. Последующее восстановление проводили в течение 10 с при 30 мкл/мин с помощью 10 мМ ГЭПЭС, 150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТК, pH 7,4.

Максимальное связывание во время фазы инъекции измеряли для всех конструкций в соответствующих единицах ответа (ЕО), эквивалентных увеличению молекулярной массы на покрытом FcRn чипе CM5 вследствие наличия связанной конструкции. Все конструкции измеряли в дубликатах. На фиг. 9 приведены средние значения определения дубликатов, включая планки погрешностей, указывающие стандартное отклонение.

В результате конструкция D9F демонстрировала существенно большее увеличение массы на покрытом FcRn чипе CM5 по сравнению с T2G, D3L, T7I и K6C, что указывает на большую аффинность связывания D9F с человеческим FcRn. Увеличение массы на покрытом FcRn чипе CM5 для D9F хорошо сравнимо с увеличением массы человеческого IgG1-к контрольного антитела MT201, что указывает на сравнимое связывание конструкции D9F с человеческим FcRn.

Связывание с FcRn опосредуется Fc-частью человеческого IgG1 в конструкциях. Более сильное связывание с человеческим FcRn, согласно описанию в литературе, является показателем большего времени полужизни *in vivo* благодаря более высокому внутриклеточному сохранению соответствующего белка и, следовательно, сниженного уровня деградации. По этой причине более сильное связывание D9F с человеческим FcRn в диапазоне человеческого IgG1-к антитела (MT201) по сравнению с другими конструкциями делает эту молекулу бесспорно превосходящей в качестве основы для терапевтических молекул, обеспечивающей более длительное нахождение потенциального лекарственного препарата в организме пациента, предположительно в диапазоне полноразмерного человеческого антитела IgG1, и меньшую частоту введения лекарственного препарата.

SEQ ID NO:	Описание	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
1.	Линкер G_4S	GGGGS
2.	Линкер $(G_4S)_2$	GGGGSGGGGS
3.	Линкер $(G_4S)_3$	GGGGSGGGGSGGGGS
4.	Линкер $(G_4S)_4$	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
5.	Линкер $(G_4S)_5$	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
6.	Линкер $(G_4S)_6$	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
7.	Линкер $(G_4S)_7$	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
8.	Линкер $(G_4S)_8$	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
9.	Пептидный линкер	PGGGS
10.	Пептидный линкер	PGGDGS
11.	Пептидный линкер	SGGGGS
12.	Пептидный линкер	GGGG
13.	CD3ε-связывающая VL	QTVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPR GLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWY SNRWVFGGGTKLTVL
14.	CD3ε-связывающая VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTA VYYCVRHGNFNGNSYVSWWAYWGQGTLLTVSS
15.	CD3ε-связывающий scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTA VYYCVRHGNFNGNSYVSWWAYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSGGGGSQ TVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRG LIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYS NRWVFGGGTKLTVL
16.	гекса-гистидиновая метка	HHHHHH
17.	Fc-мономер-1 +c/-g	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
18.	Fc-мономер-2 +c/-g/delGK	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
19.	Fc-мономер-3 -c/+g	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
20.	Fc-мономер-4	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS

	-c/+g/delGK	HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
21.	Fc-мономер-5 -c/-g	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
22.	Fc-мономер-6 -c/-g/delGK	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
23.	Fc-мономер-7 +c/+g	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKCEEQYNSTYRCVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
24.	Fc-мономер-8 +c/+g/delGK	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKCEEQYNSTYRCVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
25.	scFc-1	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGG GSGGGGGGGGGGGGGGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPC EEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
26.	scFc-2	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGGGGG GGGGGGGGGGGGGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKCEE

		QYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNH YTQKSLSLSP
27.	scFc-3	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGG SGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALH NNHYTQKSLSLSPGK
28.	scFc-4	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGGGSGGGG GGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALH NNHYTQKSLSLSP
29.	scFc-5	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGG SGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALH NNHYTQKSLSLSPGK
30.	scFc-6	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGGGSGGGG

		GGGGSGGGSGGGSGGGSDKTHTCPAPPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNH YTQKSLSLSP
31.	scFc-7	DKTHTCPAPPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP CEEQYNSTYRCVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNH YTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSDKTHTCPAPPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPC EEQYNSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALH NNHYTQKSLSLSPGK
32.	scFc-8	DKTHTCPAPPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP CEEQYNSTYRCVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNH YTQKSLSLSPGGGGSGGGSGGGSDKTHTCPAPPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP CEEQYNSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNH YTQKSLSLSP
33.	Мишень A-HLE Гетеро-Fc, цепь 1	QVQLVESGQGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMTWIRQAPGKGLEW LSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLFLQMNSLRAEDTAVY YCARDRNSHFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPS SVSASVGRDVTITCRASQGINTWLAWYQQKPKGAPKLLIYGASGLQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTITSLQPEDFATYYCQQAKSFRTFGQGTK VEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWV RQAPGKGLEWVARISKYNNTATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQ MNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSG GGGGSGGGGQTVVTVQEPSTLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWV QQKPGQAPRGLIGGKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDE AEYYCVLWYSNRWVFGGKTLTVLGGGDKTHTCPAPPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE

		WESNGQPENNYKTTPPVLSKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
34.	Мишень А-HLE Гетеро-Fc, цепь 2	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSLDTVDSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
35.	Мишень А-HLE hALB-слияние	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYMTWIRQAPGKGLEWLSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLFLQMNSLRAEDTAVYICARDRNSHFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGINTWLAWYQQKPKGAPKLLIYGASGLQSGVPSRFGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQAQKSFRTFGQGTKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQT VVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGVPEDAEYYCVLWYSNRWVFGGKTLTVLPGGDGSDAHKSEVAHRFKDLGEE NFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFLGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNP NLPRLVRPEVDMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCGHDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVT KCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLHHHHHH
36.	Мишень В-HLEа Х-тело, цепь 1	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSSYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDRLEGEKYTSWYQQRPGQSPLLVIYQDTKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWESSTVFGGGTKLTVLASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDT

		TPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSOSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
37.	Мишень В-HLEb Х-тело, цепь 2	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEW VAFIWEYEGSNKYAESVKDRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARRAGIIGTIGYYYGMDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSQTVVTQ EPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGT KFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVF GGGKTLTVLQGPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAV TVAWKADSSPVKAGVETTPPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSY SCQVTHEGSTVEKTVAPTECDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCE EQYGSTYRCVSVTLVLHQQDLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSOSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
38.	Мишень В-HLE Гетеро-Fc, цепь 1	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEW VAFIWEYEGSNKYAESVKDRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARRAGIIGTIGYYYGMDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGSGGGSS YELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDRLEKYSWYQQRPGQSPLLVIY QDTRKPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWESSTV VFGGGTKLTVLSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFN KYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQTLTVTS SGGGSGGGSGGGSGGQTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTS GNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTL GVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGDKHTHTCPPCP PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVTLVLHQQDLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSOSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
39.	Мишень В-HLE Гетеро-Fc, цепь 2	DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVTLVLHQQD WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPVLDSGDSFFLYS DLTVDKSRWQQGNVFSOSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
40.	Мишень С-HLE Гетеро-Fc, цепь 1	QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYTFITNYGMNWVRQAPGQCLEW MGWINTYTGEPTYADKFKGRVTMTTDTSTSTAYMEIRNLGGDDTAVY YCARWSWSDGYVYFDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIVM TQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNSLAWYQQKPGQPPK LLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDSPQPEDSATYYCQQSA HFPITFGCGTRLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASG

		FTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTIS RDDSKN TAYLQMN LKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGSGGGSGT VVTQEP SLTVSPGGTVTLTCSSTG AVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAA LTL SGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCP CPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
41.	Человеческий BCMA	MLQMAGQCSQNEYFDSLHACIFCQLRCSSTPPLTCQRYCNASVTN SVKGTNAI LWTCLGLSLIISLAVFVLMFLLRKINSEPLKDEFKNTGS GLLGMANIDLEKSRGTGDEIILPRGLETVVEECTCEDCIKSKPKVDS DHCFLPAMEEGATILVTTKTNDYCKSLPAALSATEIEKSISAR
42.	БКД человеческого BCMA	MLQMAGQCSQNEYFDSLHACIFCQLRCSSTPPLTCQRYCNASVTN SVKGTNA
43.	BCMA макаки	MLQMARQCSQNEYFDSLHDCKPCQLRCSSTPPLTCQRYCNASMTNS VKGMNAI LWTCLGLSLIISLAVFVLTFLLRKMSSEPLKDEFKNTGSG LLGMANIDLEKGRGTGDEIVLPRGLETVVEECTCEDCIKNKPKVDS DHCFPLPAMEEGATILVTTKTNDYCNLSAALSVTEIEKSISAR
44.	БКД BCMA макаки	MLQMARQCSQNEYFDSLHDCKPCQLRCSSTPPLTCQRYCNASMTNS VKGMNA
45.	VH CDR1 BCMA-08	NHIIH
46.	VH CDR2 BCMA-08	YINPYPGYHAYNEKFQG
47.	VH CDR3 BCMA-08	DGYRDTDVLDY
48.	VL CDR1 BCMA-08	QASQDISNYLN
49.	VL CDR2 BCMA-08	YTSRLHT
50.	VL CDR3 BCMA-08	QQGNTLPWT
51.	VH BCMA-08	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFNHIIHWVRQAPGQGLEW MGYINPYPGYHAYNEKFQGRATMTSDTSTSTVYMELSSLRSED TAVY YCARDGYRDTDVLDYWGQGT LVTVSS
52.	VL BCMA-08	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPKAPKLL IYYTSRLHTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEPEDIAITYCQQGNTL PWTFGQGTKLEIK
53.	scFv BCMA-08	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFNHIIHWVRQAPGQGLEW MGYINPYPGYHAYNEKFQGRATMTSDTSTSTVYMELSSLRSED TAVY

		YCARDGYRDTDVLDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMT QSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTS RLHTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEPEDIATYYCQQGNTLPWTFG QGTKLEIK
54.	Биспецифическая молекула BCMA-08 xI2C	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNHIIHWVRQAPGQGLEW MGYINPYPGYHAYNEKFQGRATMTSDTSTSTVYMESSLRSEDТАVY YCARDGYRDTDVLDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMT QSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTS RLHTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEPEDIATYYCQQGNTLPWTFG QGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYA MNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT AYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGG GGSGGGSGGGGQTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNY PNWVQKPGQAPRGLIGGKFLAPGTPARFSGSLGGAALTLSGVQ PEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
55.	Биспецифическая молекула scFc BCMA-08 xI2C -scFc	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNHIIHWVRQAPGQGLEW MGYINPYPGYHAYNEKFQGRATMTSDTSTSTVYMESSLRSEDТАVY YCARDGYRDTDVLDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMT QSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTS RLHTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEPEDIATYYCQQGNTLPWTFG QGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYA MNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT AYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGG GGSGGGSGGGGQTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNY PNWVQKPGQAPRGLIGGKFLAPGTPARFSGSLGGAALTLSGVQ PEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGG GGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
56.	Биспецифическая молекула scFc BCMA-08 xI2C -scFc _delGK	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNHIIHWVRQAPGQGLEW MGYINPYPGYHAYNEKFQGRATMTSDTSTSTVYMESSLRSEDТАVY YCARDGYRDTDVLDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMT QSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTS RLHTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEPEDIATYYCQQGNTLPWTFG QGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYA

		MNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGG GGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNY PNWVQQKPGQAPRGLIGGKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQ PEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG GGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
57.	VH (CC) BCMA-08_CC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNHIIHWVRQAPGQCLEW MGYINPYPGYHAYNEKFQGRATMTSDTSTSTVYMESSLRSED TAVY YCARDGYRDTDVLDYWGQGLTVTVSS
58.	VL (CC) BCMA-08_CC	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLL IYYTSRLHTGVP SRFSGSGSGTDFTFTISSLEPEDIATYYCQQGNTL PWTFGCGTKLEIK
59.	scFv (CC) BCMA-08_CC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNHIIHWVRQAPGQCLEW MGYINPYPGYHAYNEKFQGRATMTSDTSTSTVYMESSLRSED TAVY YCARDGYRDTDVLDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMT QSPSSLSASVGRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTS RLHTGVP SRFSGSGSGTDFTFTISSLEPEDIATYYCQQGNTLPWTFG CGTKLEIK
60.	Биспецифическая молекула (CC) BCMA- 08_CCxI2C	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNHIIHWVRQAPGQCLEW MGYINPYPGYHAYNEKFQGRATMTSDTSTSTVYMESSLRSED TAVY YCARDGYRDTDVLDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMT QSPSSLSASVGRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTS RLHTGVP SRFSGSGSGTDFTFTISSLEPEDIATYYCQQGNTLPWTFG CGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYA MNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGG GGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNY PNWVQQKPGQAPRGLIGGKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQ PEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
61.	Биспецифическая молекула scFc (CC) BCMA-08_CC xI2C - scFc	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNHIIHWVRQAPGQCLEW MGYINPYPGYHAYNEKFQGRATMTSDTSTSTVYMESSLRSED TAVY YCARDGYRDTDVLDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMT QSPSSLSASVGRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTS

		RLHTGVP SRFSGSGSGTDFTFTISSLEPEDIATYYCQQGNTLPWTFG CGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYA MNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVSSGG GSGGGGSGGGGSQT VVTQEP SLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNY PNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLGGAALTL SGVQ PEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG GSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
62.	Биспецифическая молекула scFc (CC) BCMA-08_CC xI2C - scFc_delGK	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNHHIHWRQAPGQCLEW MGYINPYPGYHAYNEKFQGRATMTSDTSTSTVYMESSLRSED TAVY YCARDGYRDTDLVDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGSDI QMT QSPSSLSASVGRVTITCQASQDISNYLNWYQKPGKAPKLLIYYS RLHTGVP SRFSGSGSGTDFTFTISSLEPEDIATYYCQQGNTLPWTFG CGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYA MNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVSSGG GSGGGGSGGGGSQT VVTQEP SLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNY PNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLGGAALTL SGVQ PEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG GGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
63.	VH CDR1 BCMA-06	NFDMA
64.	VH CDR2 BCMA-06	SITGGGDTYYADSVKG

65.	VH CDR3 BCMA-06	HGYDGYHLFDY
66.	VL CDR1 BCMA-06	RANQGISNNLN
67.	VL CDR2 BCMA-06	YTSNLQS
68.	VL CDR3 BCMA-06	QQFTSLPYT
69.	VH BCMA-06	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFDMAWVRQAPGKGLVW VSSITTTGGGDTYYADSVKGRFTISRDNASTLYLQMDSLRSSEDTAVY YCVRHGYDGYHLFDYWGGQGLVTVSS
70.	VL BCMA-06	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRANQGISNNLNWYQQKPGKAPKPL IYYTSNLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQFTSL PYTFGGQGTKLEIK
71.	scFv BCMA-06	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFDMAWVRQAPGKGLVW VSSITTTGGGDTYYADSVKGRFTISRDNASTLYLQMDSLRSSEDTAVY YCVRHGYDGYHLFDYWGGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMT QSPSSLSASVGRVTITCRANQGISNNLNWYQQKPGKAPKPLIYYTS NLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQFTSLPYTFG QGTKLEIK
72.	Биспецифическая молекула BCMA-06 xI2C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFDMAWVRQAPGKGLVW VSSITTTGGGDTYYADSVKGRFTISRDNASTLYLQMDSLRSSEDTAVY YCVRHGYDGYHLFDYWGGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMT QSPSSLSASVGRVTITCRANQGISNNLNWYQQKPGKAPKPLIYYTS NLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQFTSLPYTFG QGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNKYA MNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVSSGG GGSGGGSGGGGQTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNY PNWVQQKPGQAPRGLIGGKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQ PEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
73.	Биспецифическая молекула scFc BCMA-06 xI2C -scFc	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFDMAWVRQAPGKGLVW VSSITTTGGGDTYYADSVKGRFTISRDNASTLYLQMDSLRSSEDTAVY YCVRHGYDGYHLFDYWGGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMT QSPSSLSASVGRVTITCRANQGISNNLNWYQQKPGKAPKPLIYYTS NLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQFTSLPYTFG QGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNKYA MNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVSSGG GGSGGGSGGGGQTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNY PNWVQQKPGQAPRGLIGGKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQ PEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCPPCPAPELL

		GGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG GGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
74.	Биспецифическая молекула scFc BCMA-06 xI2C - scFc_delGK	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFDMAWVRQAPGKGLVW VSSITGGGDTYYADSVKGRFTISRDNASTLYLQMDSLRSEDYAVY YCVRHGYDGYHLFDYWGGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMT QSPSSLSASVGRVTITCRANQGISNNLNWYQQKPGKAPKPLIYYTS NLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYYCQQFTSLPYTFG QGKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNKYA MNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT AYLQMNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVSSGG GGGGGGSGGGGQTVTVQEPSTLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNY PNWVQQKPGQAPRGLIGGKFLAPGTPARFSGSLGGAALTLGSGVQ PEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG GGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
75.	VH (CC) BCMA-06_CC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFDMAWVRQAPGKCLVW VSSITGGGDTYYADSVKGRFTISRDNASTLYLQMDSLRSEDYAVY YCVRHGYDGYHLFDYWGGQGLVTVSS
76.	VL (CC) BCMA-06_CC	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRANQGISNNLNWYQQKPGKAPKPL IYYTSNLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYYCQQFTSL PYTFGCGTKLEIK
77.	scFv (CC) BCMA-06_CC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFDMAWVRQAPGKCLVW VSSITGGGDTYYADSVKGRFTISRDNASTLYLQMDSLRSEDYAVY YCVRHGYDGYHLFDYWGGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMT QSPSSLSASVGRVTITCRANQGISNNLNWYQQKPGKAPKPLIYYTS NLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYYCQQFTSLPYTFG

		CGTKLEIK
78.	Биспецифическая молекула (CC) BCMA- 06_CCxI2C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFDMAWVRQAPGKCLVW VSSITTTGGGDTYYADSVKGRFTISRDNASTLYLQMDSLRSSEDTAVY YCVRHGYDGYHFLFDYWQGQTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGGSDIQMT QSPSSLSASVGRVITITCRANQGISNNLNWYQQKPKGAPKPLIYYTS NLQSGVPSRFGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQFTSLPYTFG CGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYA MNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT AYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQTLVTVSSGG GGSGGGSGGGGQTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNY PNWVQQKPGQAPRGLIGGKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGSGVQ PEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
79.	Биспецифическая молекула scFc (CC) BCMA-06_CC xI2C - scFc	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFDMAWVRQAPGKCLVW VSSITTTGGGDTYYADSVKGRFTISRDNASTLYLQMDSLRSSEDTAVY YCVRHGYDGYHFLFDYWQGQTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGGSDIQMT QSPSSLSASVGRVITITCRANQGISNNLNWYQQKPKGAPKPLIYYTS NLQSGVPSRFGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQFTSLPYTFG CGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYA MNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT AYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQTLVTVSSGG GGSGGGSGGGGQTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNY PNWVQQKPGQAPRGLIGGKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGSGVQ PEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYCKKVSNAKLP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSPD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGG GGGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLT VLHQDWLNGKEYCKKVSNAKLPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
80.	Биспецифическая молекула scFc (CC) BCMA-06_CC xI2C - scFc_delGK	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFDMAWVRQAPGKCLVW VSSITTTGGGDTYYADSVKGRFTISRDNASTLYLQMDSLRSSEDTAVY YCVRHGYDGYHFLFDYWQGQTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGGSDIQMT QSPSSLSASVGRVITITCRANQGISNNLNWYQQKPKGAPKPLIYYTS NLQSGVPSRFGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQFTSLPYTFG CGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYA MNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT AYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQTLVTVSSGG GGSGGGSGGGGQTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNY

		PNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQ PEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGKLTVLGGGDKTHTCPPCPAPPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSG GGGSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
81.	VH CDR1 BCMA-14	DYYIN
82.	VH CDR2 BCMA-14	WIYFASGNSEYNQKFTG
83.	VH CDR3 BCMA-14	LYDYDWYFDV
84.	VL CDR1 BCMA-14	KSSQSLVHSNGNTYLH
85.	VL CDR2 BCMA-14	KVSNRFS
86.	VL CDR3 BCMA-14	SQSSIYPWT
87.	VH BCMA-14	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSPFDYYINWVRQAPGQGLEW MGWIYFASGNSEYNQKFTGRVTMTDRTSINTAYMELSSLTSEDVAVY FCASLYDYDWYFDVWGQGTMTVTVSS
88.	VL BCMA-14	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQ SPQLLIYKVSNNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYYCS QSSIYPWTFGQGTKLEIK
89.	scFv BCMA-14	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSPFDYYINWVRQAPGQGLEW MGWIYFASGNSEYNQKFTGRVTMTDRTSINTAYMELSSLTSEDVAVY FCASLYDYDWYFDVWGQGTMTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIVMTQT PLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIY KVSNNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYYCSQSSIYPW TFGQGTKLEIK
90.	Биспецифическая молекула BCMA-14 xI2C	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSPFDYYINWVRQAPGQGLEW MGWIYFASGNSEYNQKFTGRVTMTDRTSINTAYMELSSLTSEDVAVY FCASLYDYDWYFDVWGQGTMTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIVMTQT PLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIY KVSNNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYYCSQSSIYPW TFGQGTKLEIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFN

		KYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVS SGGGSGGGSGGGSGTQVVTQEPSTVSPGGTVTLTCSSTGAVTS GNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLS GVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
91.	Биспецифическая молекула scFc BCMA-14 xI2C -scFc	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSPDYINWVRQAPGQGLEW MGWIYFASGNS EYNQKFTGRVTMTRDTSINTAYMELSSLTSED TAVY FCASLYDYDWYFDVWGQGTMTVTS SGGGSGGGSGGGSDIVMTQT PLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHSGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIY KVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYYCSQSSIYPW TFGQGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFN KYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVS SGGGSGGGSGGGSGTQVVTQEPSTVSPGGTVTLTCSSTGAVTS GNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLS GVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSGGGSGGGSGGGSGGGG GGGGSGGGSGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRT EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSP GK
92.	Биспецифическая молекула scFc BCMA-14 xI2C - scFc_delGK	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSPDYINWVRQAPGQGLEW MGWIYFASGNS EYNQKFTGRVTMTRDTSINTAYMELSSLTSED TAVY FCASLYDYDWYFDVWGQGTMTVTS SGGGSGGGSGGGSDIVMTQT PLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHSGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIY KVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYYCSQSSIYPW TFGQGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFN KYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVS SGGGSGGGSGGGSGTQVVTQEPSTVSPGGTVTLTCSSTGAVTS GNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLS GVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG

		NVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSDKHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
93.	VH (CC) BCMA-14_CC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSPFDYYINWVRQAPGQCLEW MGWIYFASGNSEYNQKFTGRVTMTDRDTSINTAYMELSSLTSED TAVY FCASLYDYDWYFDVWGQGTMTVSS
94.	VL (CC) BCMA-14_CC	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQ SPQLLIYKVS NRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYYCS QSSIYPWTFGCCTKLEIK
95.	scFv (CC) BCMA-14_CC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSPFDYYINWVRQAPGQCLEW MGWIYFASGNSEYNQKFTGRVTMTDRDTSINTAYMELSSLTSED TAVY FCASLYDYDWYFDVWGQGTMTVSSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQT PLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIY KVS NRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYYCSQSSIYPW TFGCCTKLEIK
96.	Биспецифическая молекула (CC) BCMA- 14_CC xI2C	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSPFDYYINWVRQAPGQCLEW MGWIYFASGNSEYNQKFTGRVTMTDRDTSINTAYMELSSLTSED TAVY FCASLYDYDWYFDVWGQGTMTVSSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQT PLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIY KVS NRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYYCSQSSIYPW TFGCCTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSKAASGFTFN KYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQTLTVTS SGGGGSGGGGSGGGGQTVVTQEP SLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTS GNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLS GVQPEDEAEYCYVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
97.	Биспецифическая молекула scFc (CC) BCMA-14_CC xI2C - scFc	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSPFDYYINWVRQAPGQCLEW MGWIYFASGNSEYNQKFTGRVTMTDRDTSINTAYMELSSLTSED TAVY FCASLYDYDWYFDVWGQGTMTVSSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQT PLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIY KVS NRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYYCSQSSIYPW TFGCCTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSKAASGFTFN KYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQTLTVTS SGGGGSGGGGSGGGGQTVVTQEP SLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTS GNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLS GVQPEDEAEYCYVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGDKHTCTPPCPAP ELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK

		ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG GGGSGGGGSDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TVCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMEALHNHYTQKSLSLSP GK
98.	Биспецифическая молекула scFc (CC) BCMA-14_CC xI2C - scFc_delGK	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFPDYYINWVRQAPGQCLEW MGWIYFASGNSSEYNQKFTGRVTMTDRDTSINTAYMELSSLTSEDNAVY FCASLYDYDWYFDVWGQGTMTVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSDIVMTQT PLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHSGNTYLVHLYLQKPGQSPQLLIY KVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYYCSQSSIYPW TFGCGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFN KYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVS SGGGSGGGSGGGSGGTQTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTGSSTGAVTS GNYPNWVQKPGQAPRGLIGGKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLS GVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGDKHTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG GGSGGGGSDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
99.	Шарнир IgG1	DKHTHTCPPCP
100.	Шарнир IgG2	ERKCCVECPPCP
101.	Шарнир IgG3	ELKTPLDTHHTCPRCP
102.	Шарнир IgG4	ESKYGPPCPSCP
103.	Шарнир IgG3	ELKTPLDTHHTCPRCP
104.	Шарнир IgG1	EPKSCDKHTHTCPPCP
105.	Мишень F (cc) x I2C-шарнир-CH2-CH3- линкер-шарнир-CH2- CH3 Биспецифическая молекула HLE (DF9)	QVQLVESGGGVVQSGRSLRLSCAASGFTFRNYGMHWVRQAPGKCLEW VAWIYDGSDDKYADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDNAVY YCARDGYDILTGNPRDFDYWGQGLTVTVSSGGGSGGGSGGGSDT VMTQTPLSHVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPP RLLIYRISRRFSGVDPDRFSGSGAGTDFTLEISRVEAEDVGVYYCMQS THVPRTFGCGTKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS

		GFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGT LVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGTQVVTQEPSTLTVSPGGTTLTCSST GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGGKA ALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGKTLTVLGGGDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKLPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGSGGGGS GGGSGGGSGGGGSDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGST YRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
106.	Мишень F (cc) x I2C-шарнир-CH2-CH3- линкер-CH2-CH3 Биспецифическая молекула HLE (T2G)	QVQLVESGGGVVQSGRSLRLSCAASGFTFRNYGMHWVRQAPGKCLEW VAVIWDGSDKYYADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARDGYDILTGNPRDFDYWGQGT LVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDT VMTQTPLSSHVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPP RLLIYRISRRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLEISRVEAEDVGVYYCMQS THVPRTFGCGTKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS GFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGT LVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGTQVVTQEPSTLTVSPGGTTLTCSST GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGGKA ALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGKTLTVLGGGDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKLPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGSGGGGS GGGSGGGSGGGGSAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
107.	Мишень F (cc) x I2C-шарнир-CH2- линкер-шарнир-CH2- CH3-линкер-CH3 Биспецифическая	QVQLVESGGGVVQSGRSLRLSCAASGFTFRNYGMHWVRQAPGKCLEW VAVIWDGSDKYYADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARDGYDILTGNPRDFDYWGQGT LVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDT VMTQTPLSSHVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPP RLLIYRISRRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLEISRVEAEDVGVYYCMQS

	молекула HLE (D3L)	THVPRTFGCGTKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS GFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGT LVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGTQVVTQEPLTVSPGGTVTLTCSST GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGKFLAPGTPARFSGSLLGGKA ALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGGSGGGSG GGGSGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPDSIAVEWES NGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
108.	Мишень F (cc) x I2C-шарнир-CH2- линкер-CH2-CH3- линкер-CH3 Биспецифическая молекула HLE (T7I)	QVQLVESGGGVVQSGRSLRLSCAASGFTFRNYGMHWVRQAPGKCLEW VAVIWDGSDKYYADSVRGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARDGYDILTGNPRDFDYWGQGT LVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDT VMTQTPLSSHVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPP RLLIYRISRFGVDPDRFSGSGAGTDFTLEISRVEAEDVGVYYCMQS THVPRTFGCGTKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS GFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGT LVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGTQVVTQEPLTVSPGGTVTLTCSST GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGKFLAPGTPARFSGSLLGGKA ALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPDSIAV EWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKT TPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
109.	Мишень F (cc) x I2C-CH2-линкер-CH2- CH3-линкер-CH3	QVQLVESGGGVVQSGRSLRLSCAASGFTFRNYGMHWVRQAPGKCLEW VAVIWDGSDKYYADSVRGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARDGYDILTGNPRDFDYWGQGT LVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDT

	Биспецифическая молекула HLE (K6C)	VMTQTPLSSHVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPP RLLIYRISRRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLEISRVEAEDVGVYYCMQS THVPRTFGCGTKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS GFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGSGGGGSGQTVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCSST GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKA ALTLGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTIKAKGGGSGGGSGGGSGGGGSAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQ YGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHY TQKSLSLSPGKGGGSGGGSGGGSGGGSGGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
--	------------------------------------	--

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Одноцепочечная конструкция антитела, содержащая в порядке от amino-конца к карбокси-концу первый домен, который связывается с ВСМА; пептидный линкер; второй домен, который связывается с внеклеточным эпитопом цепи CD3ε человека и/или Масаса; пептидный линкер; и третий домен, который содержит два полипептидных мономера, каждый из которых содержит шарнир, домен CH2 и домен CH3, причем указанные два полипептидных мономера слиты друг с другом посредством пептидного линкера.
2. Конструкция антитела по п.1, отличающаяся тем, что указанный третий домен содержит в порядке от amino-конца к карбокси-концу шарнир-CH2-CH3-линкер-шарнир-CH2-CH3.
3. Конструкция антитела п.1 или 2, отличающаяся тем, что каждый из указанных полипептидных мономеров имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17-24.
4. Конструкция антитела по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что каждый из указанных полипептидных мономеров имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17-24.
5. Конструкция антитела по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что домен CH2 содержит внутридоменный цистеиновый дисульфидный мостик.
6. Конструкция антитела по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что:
 - (i) первый домен содержит два переменных домена антитела, и второй домен содержит два переменных домена антитела;
 - (ii) первый домен содержит один переменный домен антитела, а второй домен содержит два переменных домена антитела;
 - (iii) первый домен содержит два переменных домена антитела, а второй домен содержит один переменный домен антитела; или
 - (iv) первый домен содержит один переменный домен антитела, и второй домен содержит один переменный домен антитела.
7. Конструкция антитела по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что первый и второй домены слиты с третьим доменом посредством пептидного линкера.
8. Конструкция антитела по любому из предыдущих пунктов, содержащая в порядке от amino-конца к карбокси-концу:
 - (a) первый домен;
 - (b) пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3;
 - (c) второй домен;
 - (d) пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 9, 10, 11 и 12;

- (е) первый полипептидный мономер третьего домена;
- (f) пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 6, 7 и 8; и
- (g) второй полипептидный мономер третьего домена.

9. Конструкция антитела по любому из предыдущих пунктов, содержащая в порядке от аминоконца к карбокси-концу:

- (а) первый домен, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 53, 59, 71, 77, 89 или 95;
- (b) пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3;
- (с) второй домен, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23, 25, 41, 43, 59, 61, 77, 79, 95, 97, 113, 115, 131, 133, 149, 151, 167, 169, 185 или 187 из WO 2008/119567 или SEQ ID NO: 15;
- (d) пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 9, 10, 11 и 12;
- (е) первый полипептидный мономер третьего домена, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17-24;
- (f) пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 6, 7 и 8; и
- (g) второй полипептидный мономер третьего домена, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17-24.

10. Конструкция антитела по любому из предыдущих пунктов, имеющая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 55, 56, 61, 62, 73, 74, 79, 80, 91, 92, 97 и 98.

11. Полинуклеотид, кодирующий конструкцию антитела, определенную в любом из предыдущих пунктов.

12. Экспрессионный вектор, содержащий полинуклеотид, определенный в п.11.

13. Клетка-хозяин, трансформированная или трансфицированная полинуклеотидом, определенным в п.12, или вектором, определенным в п.12.

14. Способ получения конструкции антитела в соответствии с любым из пп.1-10, включающий культивирование клетки-хозяина, определенной в п.13, в условиях, делающих возможной экспрессию конструкции антитела, определенной в любом из пп.1-10, и выделение полученной конструкции антитела из культуры.

15. Фармацевтическая композиция, содержащая конструкцию антитела по любому из пп.1-10 или полученную в соответствии со способом по п.14.

16. Фармацевтическая композиция по п.15, которая является стабильной в течение по меньшей мере четырех недель при около -20°C.

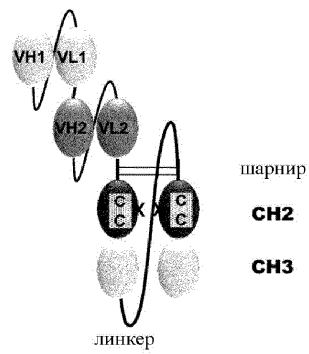
17. Применение конструкции антитела по любому из пп.1-10 или полученной в соответствии со способом по п.14 в предотвращении, лечении или уменьшении интенсивности заболевания, выбранного из В-клеточного нарушения, коррелирующего с экспрессией ВСМА, нарушения, связанного с плазматическими клетками, коррелирующего с экспрессией ВСМА, или аутоиммунного заболевания, коррелирующего с экспрессией ВСМА.

18. Способ лечения или уменьшения интенсивности В-клеточного нарушения, коррелирующего с экспрессией ВСМА, нарушения, связанного с плазматическими клетками, коррелирующего с экспрессией ВСМА, или аутоиммунного заболевания, коррелирующего с экспрессией ВСМА, включающий этап введения нуждающемуся в этом субъекту конструкции антитела в соответствии с любым из пп.1-10 или полученной в соответствии со способом по п.14.

19. Набор для фармацевтического применения, содержащий:

- а) компонент, выбранный из конструкции антитела в соответствии с любым из пп.1-10 или полученной в соответствии со способом по п.14, полинуклеотида, определенного в п.11, вектора, определенного в п.12, и/или клетки-хозяина, определенной в п.13; и
- б) один или несколько приемников, содержащих компонент а), средства для введения компонента а), средства для восстановления компонента а), средства для разведения компонента а) и/или инструкции по применению.

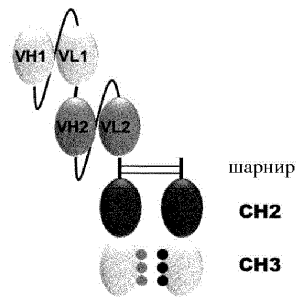
а) Биспецифическая одноцепочечная конструкция антитела на основе Fc



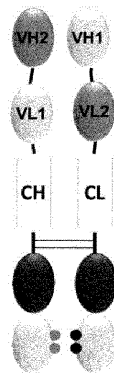
C-C = внутрицепочечная дисульфидная связь

X = Удаленный участок гликозилирования

б) Биспецифическая конструкция антитела на основе гетеро-Fc

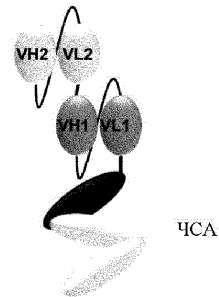


в) Биспецифическая конструкция X-тела



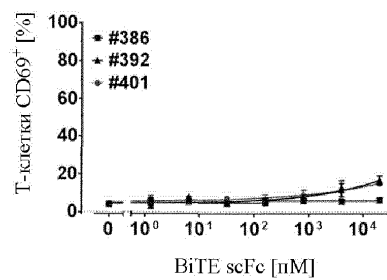
●● = Участки спаривания зарядов

д) Биспецифическая конструкция, слитая с человеческим альбумином

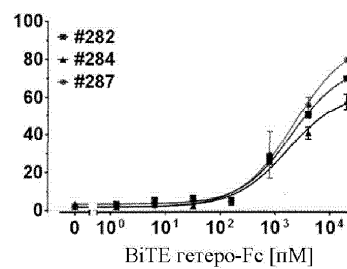


Фиг. 1

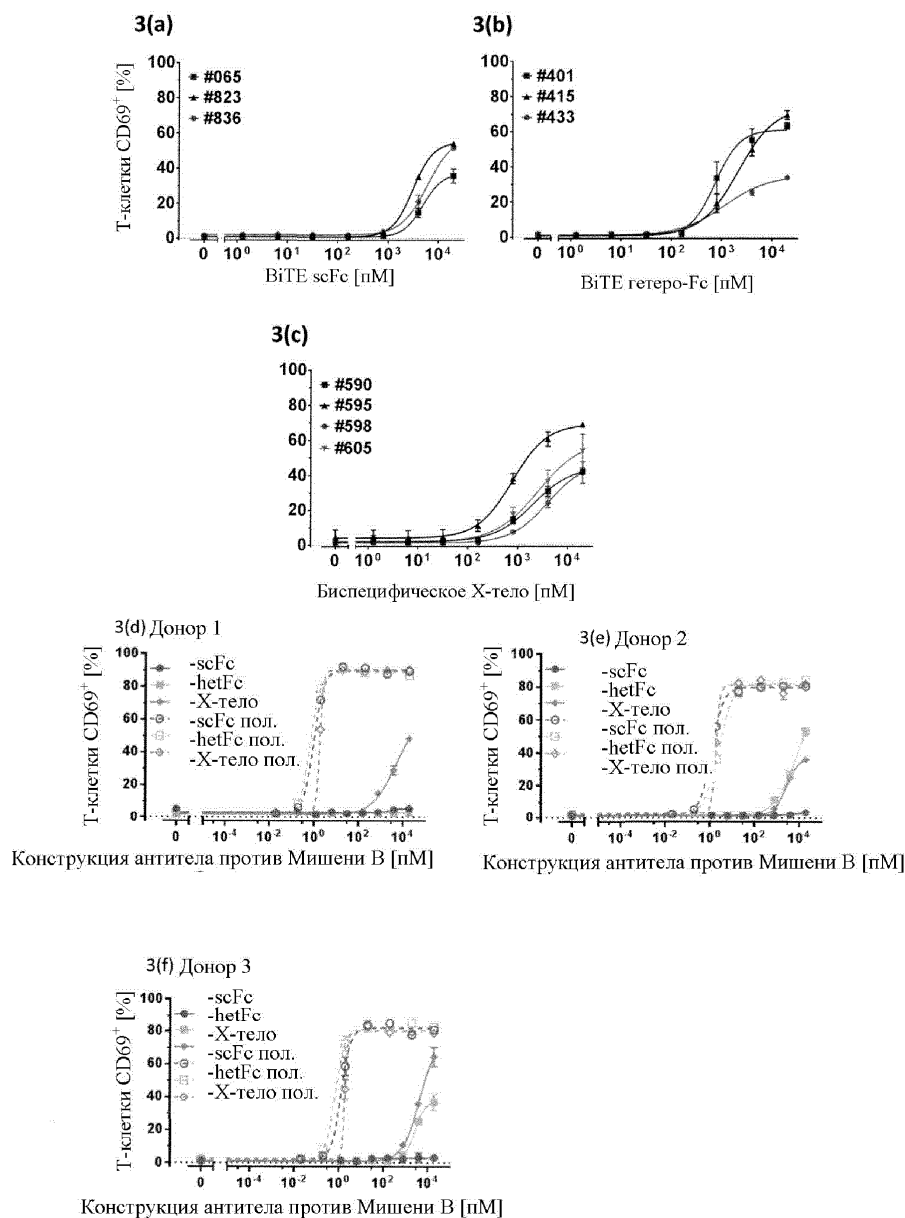
2(a)



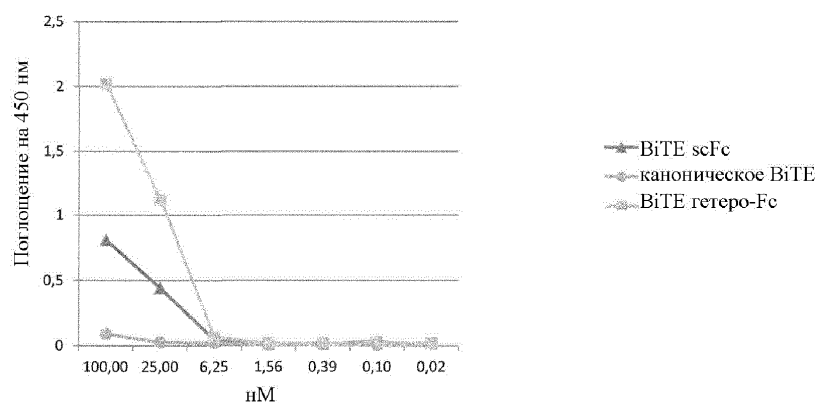
2(b)



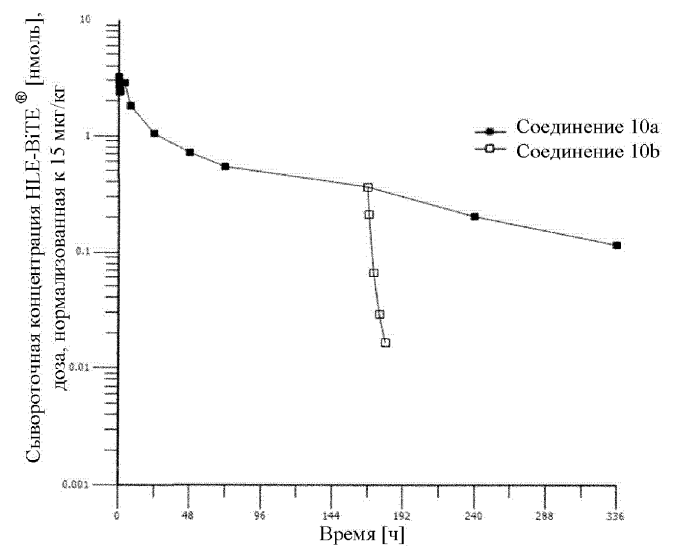
Фиг. 2



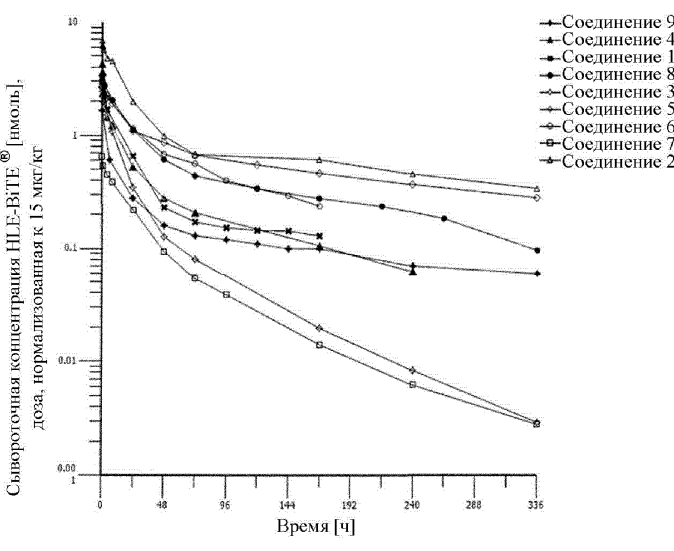
Фиг. 3



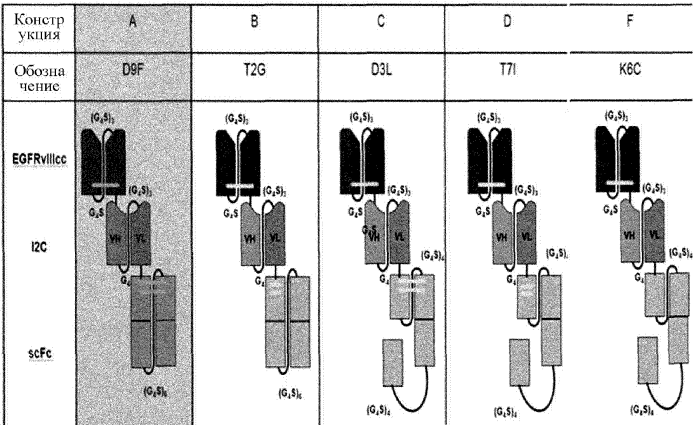
Фиг. 4



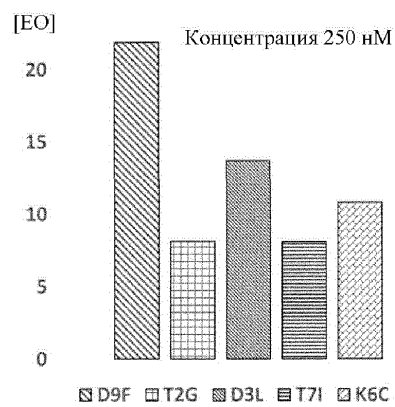
Фиг. 5



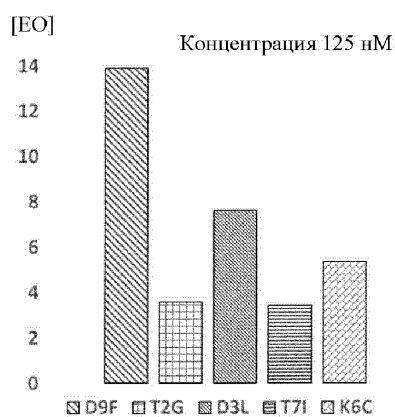
Фиг. 6



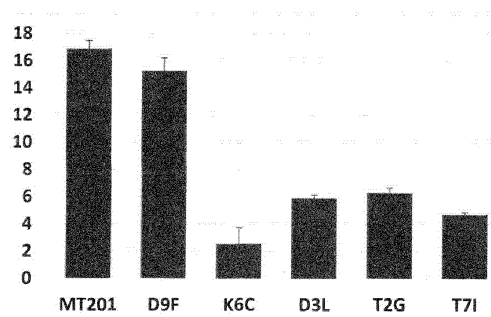
Фиг. 7



Фиг. 8А



Фиг. 8В



Фиг. 9



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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