

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **040031**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2022.04.12**

**(21)** Номер заявки  
**201890360**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2016.07.21**

**(51)** Int. Cl. **A61K 38/20** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**C07K 14/54** (2006.01)  
**C12N 15/24** (2006.01)

---

**(54) СОЕДИНЕНИЕ, НАЦЕЛЕННОЕ НА ИЛ-23А И ФАКТОР АКТИВАЦИИ В-ЛИМФОЦИТОВ (BAFF), И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ**

---

**(31)** 62/196,170; 62/201,067; 62/355,302

**(32)** 2015.07.23; 2015.08.04; 2016.06.27

**(33)** US

**(43)** 2018.06.29

**(86)** PCT/US2016/043267

**(87)** WO 2017/015433 2017.01.26

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ  
ИНТЕРНАЦИОНАЛЬ ГМБХ (DE);  
МЭКРОУДЖЕНИКС, ИНК. (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Сингх Санджайа, Пань Ци, Барретт  
Рейчел Ребекка, Джонсон Лесли С.,  
Гупта Панкадж, Лоу Сара, У Хайся  
(US)**

**(74)** Представитель:  
**Купцова М.В., Фелицына С.Б. (RU)**

**(56)** US-A1-20100303777  
US-A1-20140377269  
LAI KWAN LAM Q. et al. Local BAFF gene silencing suppresses Th17-cell generation and ameliorates autoimmune arthritis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008, Vol. 105, № 39, pp 14993-14998; abstract; page 14995, first column, www.pnas.org/cgi, DOI: 10.1073/pnas.0806044105  
OGANESYAN V. et al. Structural characterization of a human Fc fragment engineered for extended serum half-life. Molecular immunology, 2009, Vol. 46, № 8, pp 1750-1755; abstract, DOI: 10.1016/j.molimm.2009.01.026, Source: PubMed  
US-A1-20140363444  
US-A1-20030059937  
US-A1-20110236388  
US-A1-20100174053  
US-A1-20130129723  
US-A1-20100028359  
US-A1-20130330335  
US-A1-20150017169

---

**(57)** Изобретение относится к соединениям, специфичным к ИЛ23А и ФАВЛ (BAFF), композициям, содержащим указанные соединения, и способам их применения. Также раскрыты нуклеиновые кислоты, клетки и способы получения, связанные с указанными соединениями и композициями.

---

**B1**

**040031**

**040031  
B1**

### Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка испрашивает приоритет по дате подачи в соответствии с 35 U.S.C. §119 по предварительным заявкам США № 62/196170, поданной 23 июля 2015 года; № 62/201067, поданной 4 августа 2015 года; и № 62/355302, поданной 27 июня 2016 года, все озаглавленные как "Соединение, нацеленное на ИЛ-23А и фактор активации В-лимфоцитов (BAFF), и его применение", полное содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки.

### Уровень техники

Воспаление включает врожденный и адаптивный иммунный ответ, необходимый для борьбы с инфекцией. Однако, когда воспаление становится неконтролируемым аутоиммунным или аутовоспалительным заболеванием, может развиться нейродегенеративное заболевание и даже рак. Известно, что провоспалительные цитокины, такие как ИЛ1, ФАВЛ (фактор активации В-лимфоцитов, BAFF), ФНО (фактор некроза опухоли) $\alpha$ , ИЛ6, ИЛ12, ИЛ17, ИЛ18 и ИЛ23, участвуют в воспалении и специфических путях, которые активируют иммунные клетки. Однако неясно, может ли или каким образом может ингибирование одного или нескольких из этих цитокинов повлиять на лечение аутоиммунных или аутоиммунологических заболеваний.

Интерлейкин 23 (ИЛ23) представляет собой гетеродимерный цитокин, состоящий из двух субъединиц, р40 и р19. Субъединицу р19 также называют как ИЛ-23А. Хотя субъединица р19 уникальна для ИЛ23, субъединица р40 используется также цитокином ИЛ12. ИЛ23 становится известным как ключевой регулятор патогенных Т-хелперов 17 (Тх-17 (Th17)),  $\gamma\delta$  Т и врожденных лимфоидных клеток (ВЛК (ILC)), управляющих продуцированием ИЛ17, ИЛ22 и других цитокинов, которые приводят к местному воспалению и повреждению тканей. ИЛ23 способствует усилению экспрессии матриксной металлопротеазы MMP9, увеличивает ангиогенез, уменьшает инфильтрацию Т-клеток CD8<sup>+</sup> и участвует в развитии злокачественных опухолей. Кроме того, ИЛ23 в сочетании с ИЛ6 и TGF $\beta$ 1 стимулирует наивные (naive) Т-лимфоциты CD4<sup>+</sup> дифференцироваться в клетки Тх-17 (Th17). В свою очередь, клетки Тх-17 (Th17) продуцируют ИЛ17, провоспалительный цитокин, который усиливает праймирование (priming) Т-лимфоцитов и стимулирует продуцирование провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ1, ИЛ6, ФНО $\alpha$ , NOS-2, а также индуцирует экспрессию хемокинов, приводящих к воспалению и патогенезу болезни. ИЛ23 проявляет свои эффекты через рецептор на клеточной поверхности, состоящий из субъединицы ИЛ12 $\beta$ 1 рецептора ИЛ12, работающей вместе с уникальной субъединицей ИЛ23R. Экспрессия ИЛ23R ограничивается специфическими популяциями иммунных клеток и встречается в основном на подклассах Т-клеток ( $\alpha\beta$  и  $\gamma\delta$  TCR<sup>+</sup>) и клетках НК (натуральных киллерах).

У мышей генетическая абляция гена ИЛ23р19 приводит к избирательной потере функции ИЛ23, сопровождающейся значительно нарушенными Т-зависимыми иммунными ответами, включая сниженное продуцирование антигенспецифических иммуноглобулинов и нарушенные гиперчувствительные ответы замедленного типа (Ghilardi N. et al. (2004) J. Immunol. 172(5):2827-33). Нокаутные мыши, лишенные или ИЛ23р40, или ИЛ23р19, или любой субъединицы рецептора ИЛ23 (ИЛ23R и ИЛ12 $\beta$ 1), проявляют менее выраженные симптомы рассеянного склероза, артрита и воспалительного заболевания кишечника в животных моделях. Аналогичные результаты были получены с применением антитела, специфичного к ИЛ23р19 в ЭАЭ (экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит), и модели колита, вызванного Т-клетками, дополнительно подтверждает роль ИЛ23 в условиях данных заболеваний (Chen Y. et al. (2006) J. Clin. Invest. 116(5):1317-26; Elson CO. Et al. (2007) Gastroenterology 132(7): 2359-70). Это подчеркивает важность ИЛ23 при хроническом воспалении (Langowski et al. (2006) Nature 442 (7101): 461-5; Kikly K, et al. (2006) Curr. Opin. Immunol. 18(6):670-5). Кроме того, повышенное продуцирование ИЛ23 рассматривается как основной фактор воспалительного артрита и воспалительных аутоиммунных заболеваний (Adamopoulos et al. (2011) J. Immunol. 187: 593-594; и Langris et al. (2005) J. Exp. Med. 201:233-240). Связь между ИЛ23, его нисходящим (в сигнальном пути) цитокином ИЛ22 и образованием костей была опубликована в модельной системе мыши, в которой ИЛ23 чрезмерно экспрессируется (Sherlock et al. (2012) Nat. Med. 18:1069-76).

Фактор активации В-лимфоцитов (ФАВЛ (BAFF)) представляет собой цитокин, который относится к надсемейству лиганда фактора некроза опухолей (ФНО) и действует как лиганд для рецепторов ФАВЛ-Р (BAFF-R (BR3)), ТАЦИ (трансмембранный активатор и кальциевый модулятор, и интерактор циклофилинового лиганда, TACI) и АСВЛ (антиген созревания В-лимфоцитов, BCMA). Взаимодействие между ФАВЛ (BAFF) и его рецепторами вызывает сигналы, необходимые для образования и поддержания В-клеток, которые, в свою очередь, синтезируют иммуноглобулины в ответ на проникновение чужеродного вещества. Соответствующие уровни ФАВЛ (BAFF) у пациента помогают поддерживать нормальные уровни иммунитета, тогда как ненадлежащие уровни могут приводить к иммунодефициту, а чрезмерные уровни могут приводить к аномально высокому уровню продуцирования антител. Когда пациент демонстрирует аутоиммунную реакцию, он продуцирует антитела против тканей или органов собственного тела. Аутоиммунные заболевания, включая красную волчанку и ревматоидный артрит, являются результатом чрезмерных уровней ФАВЛ (BAFF) в организме. Таким образом, важно модулировать продуцирование ФАВЛ (BAFF) для лечения пациентов, страдающих такими заболеваниями.

ФАВЛ (BAFF) может существовать в трех формах: связанной с мембранной (мсФАВЛ (mbBAFF)), тримерной растворимой ФАВЛ (рФАВЛ (sBAFF)) и мультимерной форме, состоящей из 60 мономеров ФАВЛ (ФАВЛ 60мер (BAFF 60mer)). Сравнительная важность различных форм ФАВЛ (BAFF) в нормальной физиологии и физиологии болезни не совсем понятна. Как отмечено, ФАВЛ (BAFF) связывается с тремя рецепторами: ФАВЛР (BAFFR (BR3)), ТАЦИ (TACI) и АСВЛ (BCMA). Показано, что индуцирующий пролиферацию лиганд (ИПЛ (APRIL)), родственный член семейства лигандов ФНО-рецептора, связывается с высоким сродством с ТАЦИ (TACI) и АСВЛ (BCMA). В отличие от высокоаффинного взаимодействия ИПЛ (APRIL):АСВЛ (BCMA), взаимодействие ФАВЛ (BAFF):АСВЛ (BCMA) имеет низкую аффинность (1-2 мкМ) и, как полагают, не играет важной роли *in vivo* (Bossen и Schneider, 2006).

Растворимый ФАВЛ (sBAFF) экспрессируется на высоких уровнях у лиц с системной красной волчанкой (СКВ) и в воспаленных органах-мишенях, таких как почка. Растворимый ФАВЛ (sBAFF) служит критическим фактором для гомеостаза и выживаемости В-лимфоцитов (Kalled et al., 2005; Mackay et al., 2003; Smith and Cancro, 2003; Patke et al., 2004). Образование аутоантител ФАВЛ (BAFF)-зависимыми В-лимфоцитами приводит к появлению клубочковых ИК-отложений (ИК - иммунный комплекс), первоначально на клубочковой базальной мембране (КБМ (GBM)), мезангии и интерстициальной ткани в проксимальных трубчатых эпителиальных клетках (ПТЭК (PTEC)). Такие ИК-отложения приводят к связыванию комплемента и активации нейтрофилов, что приводит к местному повреждению почки. Медиаторы воспаления (например, ИЛ6, ИЛ8, MCP-1), продуцируемые поврежденными почечными клетками (МК (мезангиальными клетками, MC), ПТЭК (PTEC), почечными фибробластами, эндотелиальными клетками), поддерживают воспалительный цикл путем увеличения инфильтрации иммунных клеток (например, В-лимфоцитов, Т-лимфоцитов, дендритных клеток, нейтрофилов и макрофагов).

Анти-ФАВЛ (BAFF)-моноклональное антитело белимуаб (Benlysta®) обладает доказанной способностью уменьшать образование аутоантител и приносит значительную пользу пациентам с системной красной волчанкой (СКВ). Тем не менее, эффективность белимуаб у пациентов с СКВ в лучшем случае умеренная, и есть значительные возможности для улучшения (Furie et al., 2011). Поэтому остается потребность в новых композициях с повышенной эффективностью для лечения и профилактики аутоиммунных или воспалительных болезней. Кроме того, идентификация более эффективных способов лечения должна обеспечивать введение уменьшенных доз, а также более низкие затраты, связанные с лечением.

#### **Краткое описание сущности изобретения**

В данном документе представлены соединения, специфичные к ФАВЛ (BAFF) и ИЛ23А, композиции, содержащие такие соединения, а также способы их применения и их получения.

Аспекты раскрытия изобретения относятся к соединению, содержащему первый полипептид и второй полипептид, причем:

(А) указанный первый полипептид содержит:

(i) вариабельный домен легкой цепи первого иммуноглобулина (VL1), специфичный к первому белку-мишени;

(ii) вариабельный домен тяжелой цепи второго иммуноглобулина (VH2), специфичный к второму белку-мишени; и

(iii) шарнирную область, константную область 2 тяжелой цепи (CH2) и константную область 3 тяжелой цепи (CH3); и

(В) указанный второй полипептид содержит:

(i) вариабельный домен легкой цепи второго иммуноглобулина (VL2), специфичный к указанному второму белку-мишени;

(ii) вариабельный домен тяжелой цепи первого иммуноглобулина (VH1), специфичный к указанному первому белку-мишени; причем:

а) указанные VL1 и VH1 объединяются с образованием сайта связывания, который связывает указанный первый белок-мишень;

б) указанные VL2 и VH2 объединяются с образованием сайта связывания, который связывает указанный второй белок-мишень;

с) указанная константная область 2 тяжелой цепи (CH2) содержит тирозин в позиции 252, треонин в позиции 254 и глутаминовую кислоту в позиции 256, пронумерованные согласно индексу ЕС, как у Кабата; и

д) указанный первый белок-мишень представляет собой ФАВЛ (BAFF), а указанный второй белок-мишень представляет собой ИЛ-23А, или указанный первый белок-мишень представляет собой ИЛ-23А, а указанный второй белок-мишень ФАВЛ (BAFF),

и при этом:

(i) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 2, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 1, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 4 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 3; или

(ii) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 4, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 3, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 2 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 1; или

(iii) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 85, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 84, указанный

VL2 содержит SEQ ID NO: 4 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 4; или  
 (iv) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 4, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 3, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 85 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 84; или  
 (v) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 87, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 86, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 4 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 3; или  
 (vi) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 4, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 3, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 87 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 86; или  
 (vii) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 89, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 88, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 4 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 3; или  
 (viii) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 4, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 3, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 89 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 88; или  
 (ix) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 91, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 90, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 4 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 3; или  
 (x) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 4, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 3, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 91 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 90.

В некоторых вариантах осуществления указанный первый полипептид дополнительно содержит первый линкер между указанным VL1 и указанным VH2, а указанный второй полипептид дополнительно содержит второй линкер между указанным VL2 и указанным VH1. В некоторых вариантах осуществления указанный первый линкер или указанный второй линкер содержит аминокислотную последовательность GGGSGGGG (SEQ ID NO: 69). В некоторых вариантах осуществления указанный первый линкер и указанный второй линкер содержат аминокислотную последовательность GGGSGGGG (SEQ ID NO: 69). В некоторых вариантах осуществления указанный первый полипептид дополнительно содержит третий линкер между указанным VH2 или указанным VL1 и шарнирной областью, а указанный второй полипептид дополнительно содержит четвертый линкер после указанного VH1 (на его С-конце) или указанного VL2 (на его С-конце). В некоторых вариантах осуществления указанный третий линкер указанного первого полипептида содержит аминокислотную последовательность GGCGGGEVAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK (SEQ ID NO: 82), и указанный четвертый линкер указанного второго полипептида содержит аминокислотную последовательность GGCGGGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE (SEQ ID NO: 83). В других вариантах осуществления, указанный третий линкер указанного первого полипептида содержит аминокислотную последовательность GGCGGGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE (SEQ ID NO: 83), и указанный четвертый линкер указанного второго полипептида содержит аминокислотную последовательность GGCGGGEVAACEKEVAALEKEVAALEK (SEQ ID NO: 82). В некоторых вариантах осуществления указанный третий линкер указанного первого полипептида содержит аминокислотную последовательность GGCGGGEVAACEKEVAALEKEVAALEK (SEQ ID NO: 82) или аминокислотную последовательность GGCGGGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE (SEQ ID NO: 83). В других вариантах осуществления, указанный четвертый линкер указанного второго полипептида содержит аминокислотную последовательность GGCGGGEVAACEKEVAALEKEVAALEK (SEQ ID NO: 82) или аминокислотную последовательность GGCGGGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE (SEQ ID NO: 83). В некоторых вариантах осуществления указанный третий линкер содержит аминокислотную последовательность VEPKSC (SEQ ID NO: 72) или аминокислотную последовательность FNRGEC (SEQ ID NO: 71). В некоторых вариантах осуществления указанный четвертый линкер содержит аминокислотную последовательность FNRGEC (SEQ ID NO: 71) или аминокислотную последовательность VEPKSC (SEQ ID NO: 72). В некоторых вариантах осуществления указанный третий линкер содержит аминокислотную последовательность VEPKSC (SEQ ID NO: 72), а указанный четвертый линкер содержит аминокислотную последовательность FNRGEC (SEQ ID NO: 71).

В некоторых вариантах осуществления указанный первый полипептид дополнительно содержит домен константной области 1 тяжелой цепи (CH1) между указанным VH2 или указанным VL1 (в зависимости от конфигурации) и шарнирной областью, а указанный второй полипептид дополнительно содержит домен константной области легкой цепи (CL) на С-конце VH1 или VL2 (в зависимости от конфигурации), при этом указанный CL и указанный CH1 связаны вместе через дисульфидную связь с образованием домена C1. В некоторых вариантах осуществления указанный первый линкер (между указанным VL1 и указанным VH2) или указанный второй линкер (между указанным VL2 и указанным VH1) содержит аминокислотную последовательность GGGSGGGG (SEQ ID NO: 69). В некоторых вариантах осуществления указанный первый линкер и указанный второй линкер содержат аминокислотную последовательность GGGSGGGG (SEQ ID NO: 69). В некоторых вариантах осуществления указанный первый полипептид дополнительно содержит третий линкер между указанным VH2 или указанным VL1 (в зависимости от конфигурации) и указанным CH1, а указанный второй полипептид дополнительно содержит четвертый линкер между указанным VH1 или указанным VL2 (в зависимости от конфигурации) и указанным CL. В некоторых вариантах осуществления указанный третий линкер или указанный четвертый линкер содержит аминокислотную последовательность LGGGSG (SEQ ID NO: 70). В некоторых вариантах осуществления указанный третий линкер и указанный четвертый линкер содержит аминокислотную



и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42; или (xx) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44; или (xxi) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46; или (xxii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48; или (xxiii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50; или (xxiv) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52; или (xxv) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54; или (xxvi) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56; или (xxvii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58; или (xxviii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60; или (xxix) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; или (xxx) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64; или (xxxi) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66; или (xxxii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68.

В некоторых вариантах осуществления, в которых указанное соединение содержит два указанных первых полипептида и два указанных вторых полипептида, указанные два первых полипептида связаны вместе посредством по меньшей мере одной дисульфидной связи.

В некоторых вариантах осуществления указанное соединение содержит два указанных первых полипептида и два указанных вторых полипептида, и при этом шарнир, СН2 и СН3 одного из первых полипептидов объединяется с шарниром, СН2 и СН3 другого первого полипептида с образованием тетравалентной молекулы. В некоторых вариантах осуществления указанное соединение содержит два указанных первых полипептида и два указанных вторых полипептида, причем каждый из указанных первых полипептидов содержит СН1, шарнир, СН2 и СН3, и каждый из указанных вторых полипептидов содержит СL, и при этом шарнир, СН2 и СН3 одного из первых полипептидов объединяется с шарниром, СН2 и СН3 другого из первых полипептидов, а СН1 каждого из указанных первых полипептидов объединяется с СL одного из указанных вторых полипептидов с образованием тетравалентной молекулы (например, мономера, мономерного антителя, как описано в разделе "Примеры") (например, соединения E и V). В некоторых вариантах осуществления указанное соединение содержит два указанных первых полипептида и два указанных вторых полипептида, причем каждый из указанных первых полипептидов содержит третий линкер, шарнир, СН2 и СН3, и каждый из указанных вторых полипептидов содержит четвертый линкер, и при этом шарнир, СН2 и СН3 одного из первых полипептидов объединяется с шарниром, СН2 и СН3 другого из первых полипептидов, а третий линкер каждого из указанных первых полипептидов объединяется с четвертым линкером одного из указанных вторых полипептидов с образованием тетравалентной молекулы (например, мономера, мономерного антителя, как описано в разделе "Примеры") (например, соединения U и T).

Другие аспекты раскрытия изобретения относятся к первому соединению, которое конкурирует со вторым соединением за связывания с ИЛ-23А и ФАВЛ (BAFF), причем указанное первое соединение содержит третий полипептид и четвертый полипептид, при этом:

(А) указанный третий полипептид содержит:

(i) вариабельный домен легкой цепи первого иммуноглобулина (VL1), специфичный к первому белку-мишени;

(ii) вариабельный домен тяжелой цепи второго иммуноглобулина (VH2), специфичный к второму белку-мишени; и

(iii) шарнирную область, константную область 2 тяжелой цепи (СН2) и константную область 3 тяжелой цепи (СН3); и (В) указанный четвертый полипептид содержит:

(i) вариабельный домен легкой цепи второго иммуноглобулина (VL2), специфичный к указанному второму белку-мишени;

(ii) вариабельный домен тяжелой цепи первого иммуноглобулина (VH1), специфичный к указанному первому белку-мишени; и при этом:



(xxviii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60; или (xxix) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; или (xxx) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64; или (xxxii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66; или (xxxiii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68.

Другие аспекты раскрытия изобретения относятся к соединению, содержащему два первых полипептида и два вторых полипептида,

причем указанные два первых полипептида связаны вместе посредством по меньшей мере одной дисульфидной связи, и при этом каждый указанный первый полипептид связан с одним указанным вторым полипептидом посредством по меньшей мере одной дисульфидной связи,

при этом каждый из указанных первых полипептидов содержит:

(i) вариабельный домен легкой цепи первого иммуноглобулина (VL1), специфичный к первому белку-мишени;

(ii) вариабельный домен тяжелой цепи второго иммуноглобулина (VH2), специфичный к второму белку-мишени;

(iii) константную область 1 тяжелой цепи (CH1), шарнирную область, константную область 2 тяжелой цепи (CH2) и константную область 3 тяжелой цепи (CH3); и при этом каждый из указанных вторых полипептидов содержит:

(i) вариабельный домен легкой цепи второго иммуноглобулина (VL2), специфичный к указанному второму белку-мишени;

(ii) вариабельный домен тяжелой цепи первого иммуноглобулина (VH1), специфичный к указанному первому белку-мишени;

(iii) домен константной области легкой цепи (CL);

причем шарнир, CH2 и CH3 одного из первых полипептидов объединяется с шарниром, CH2 и CH3 другого из первых полипептидов, и CH1 каждого из указанных первых полипептидов объединяется с CL каждого из вторых полипептидов с образованием тетравалентной молекулы; при этом:

а) указанные VL1 и VH1 объединяются с образованием сайта связывания, который связывает указанный первый белок-мишень;

б) указанные VL2 и VH2 объединяются с образованием сайта связывания, который связывает указанный второй белок-мишень;

с) указанная константная область 2 тяжелой цепи (CH2) содержит тирозин в позиции 252, треонин в позиции 254 и глутаминовую кислоту в позиции 256, пронумерованные согласно индексу ЕС, как у Кабата; и

д) указанный первый белок-мишень представляет собой ФАВЛ (BAFF), а указанный второй белок-мишень представляет собой ИЛ-23А, или указанный первый белок-мишень представляет собой ИЛ-23А, а указанный второй белок-мишень ФАВЛ (BAFF),

и при этом:

(i) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 2, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 1, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 4 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 3; или

(ii) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 4, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 3, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 2 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 1; или

(iii) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 85, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 84, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 4 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 4; или

(iv) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 4, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 3, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 85 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 84; или

(v) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 87, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 86, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 4 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 3; или

(vi) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 4, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 3, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 87 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 86; или

(vii) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 89, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 88, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 4 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 3; или

(viii) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 4, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 3, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 89 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 88; или

(ix) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 91, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 90, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 4 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 3; или

(x) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 4, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 3, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 91 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 90.



В некоторых вариантах осуществления, относящихся к вышеуказанному аспекту, каждый из указанных первых полипептидов дополнительно содержит первый линкер между указанным VL1 и указанным VH2, и каждый из указанных вторых полипептидов дополнительно содержит второй линкер между указанным VL2 и указанным VH1. В некоторых вариантах осуществления указанный первый линкер или указанный второй линкер содержит аминокислотную последовательность GGGSGGGG (SEQ ID NO: 69). В некоторых вариантах осуществления указанный первый линкер и указанный второй линкер содержат аминокислотную последовательность GGGSGGGG (SEQ ID NO: 69). В некоторых вариантах осуществления каждый из указанных первых полипептидов дополнительно содержит третий линкер между указанным VH2 (или указанным VL1) и указанным CH1, и каждый из указанных вторых полипептидов дополнительно содержит четвертый линкер между указанным VH1 (или указанным VL2) и указанным CL. В некоторых вариантах осуществления указанный третий линкер или указанный четвертый линкер содержит аминокислотную последовательность LGGSGG (SEQ ID NO: 70). В некоторых вариантах осуществления указанный третий линкер и указанный четвертый линкер содержат аминокислотную последовательность LGGSGG (SEQ ID NO: 70). В некоторых вариантах осуществления указанный третий линкер и/или указанный четвертый линкер содержат необязательный остаток цистеина. В некоторых вариантах осуществления указанный третий линкер и/или указанный четвертый линкер содержат аминокислотную последовательность GGCGGG (SEQ ID NO: 135) или LGGCGGGS (SEQ ID NO: 136). В некоторых вариантах осуществления указанная константная область 2 тяжелой цепи (CH2) содержит аланин в позициях 234 и аланин в позиции 235, пронумерованные в соответствии с индексом ЕС, как у Кабата. В некоторых вариантах осуществления аминокислотную последовательность указанной шарнирной области, указанной константной области 2 тяжелой цепи (CH2) или указанной константной области 3 тяжелой цепи (CH3) получают из IgG1 или из IgG4. В некоторых вариантах осуществления указанная шарнирная область содержит аминокислотную последовательность EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 76), аминокислотную последовательность LEPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 130) или аминокислотную последовательность ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO: 134).

В некоторых вариантах осуществления изобретения:

(i) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; или

(ii) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; или

(iii) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; или

(iv) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; или

(v) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; или

(vi) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; или

(vii) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30; или

(viii) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34; или

(ix) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38; или

(x) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42; или

(xi) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46; или

(xii) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50; или



(xii) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50; или

(xiii) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54; или

(xiv) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55, и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56; или

(xv) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57, и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58; или

(xvi) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60; или

(xvii) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; или

(xviii) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63, и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64; или

(xix) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66; или

(xx) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68.

Другие аспекты раскрытия изобретения относятся к соединению, содержащему два первых полипептида и два вторых полипептида,

причем указанные два первых полипептида связаны вместе посредством по меньшей мере одной дисульфидной связи, и при этом каждый указанный первый полипептид связан с одним указанным вторым полипептидом посредством по меньшей мере одну дисульфидной связи,

при этом каждый из указанных первых полипептидов содержит:

(iv) варибельный домен легкой цепи первого иммуноглобулина (VL1), специфичный к первому белку-мишени; (v) варибельный домен тяжелой цепи второго иммуноглобулина (VH2), специфичный к второму белку-мишени; (vi) шарнирную область, константную область 2 тяжелой цепи (CH2) и константную область 3 тяжелой цепи (CH3); и при этом каждый из указанных вторых полипептидов содержит:

(i) варибельный домен легкой цепи второго иммуноглобулина (VL2), специфичный к указанному второму белку-мишени; и

(ii) варибельный домен тяжелой цепи первого иммуноглобулина (VH1), специфичный к указанному первому белку-мишени,

при этом шарнир, CH2 и CH3 одного из первых полипептидов объединяется с шарниром, CH2 и CH3 другого из первых полипептидов и; при этом

e) указанные VL1 и VH1 объединяются с образованием сайта связывания, который связывает указанный первый белок-мишень;

f) указанные VL2 и VH2 объединяются с образованием сайта связывания, который связывает указанный второй белок-мишень;

g) указанная константная область 2 тяжелой цепи (CH2) содержит тирозин в позиции 252, треонин в позиции 254 и глутаминовую кислоту в позиции 256, пронумерованные согласно индексу ЕС, как у Кабата; и

h) указанный первый белок-мишень представляет собой ФАВЛ (BAFF), а указанный второй белок-мишень представляет собой ИЛ-23А, или указанный первый белок-мишень представляет собой ИЛ-23А, а указанный второй белок-мишень ФАВЛ (BAFF), и при этом:

(i) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 2, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 1, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 4 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 3; или

(ii) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 4, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 3, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 2 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 1; или

(iii) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 85, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 84, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 4 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 4; или

(iv) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 4, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 3, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 85 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 84; или

- (v) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 87, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 86, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 4 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 3; или
- (vi) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 4, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 3, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 87 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 86; или
- (vii) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 89, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 88, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 4 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 3; или
- (viii) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 4, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 3, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 89 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 88; или
- (ix) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 91, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 90, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 4 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 3; или
- (x) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 4, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 3, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 91 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 90.

В некоторых вариантах осуществления, относящихся к вышеуказанному аспекту, каждый из указанных первых полипептидов дополнительно содержит первый линкер между указанным VL1 и указанным VH2, и каждый из указанных вторых полипептидов дополнительно содержит второй линкер между указанным VL2 и указанным VH1. В некоторых вариантах осуществления указанный первый линкер или указанный второй линкер содержит аминокислотную последовательность GGGSGGGG (SEQ ID NO: 69). В некоторых вариантах осуществления указанный первый линкер и указанный второй линкер содержат аминокислотную последовательность GGGSGGGG (SEQ ID NO: 69). В некоторых вариантах осуществления каждый из указанных первых полипептидов дополнительно содержит третий линкер между указанным VH2 или указанным VL1 и указанной шарнирной областью, и каждый из указанных вторых полипептидов дополнительно содержит четвертый линкер на С-конце указанного VH1 или указанного VL2. В некоторых вариантах осуществления указанный третий линкер указанного первого полипептида содержит аминокислотную последовательность GGCGGGEVAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK (SEQ ID NO: 82), и указанный четвертый линкер указанного второго полипептида содержит аминокислотную последовательность GGCGGGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE (SEQ ID NO: 83). В других вариантах осуществления, указанный третий линкер указанного первого полипептида содержит аминокислотную последовательность GGCGGGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE (SEQ ID NO: 83), и указанный четвертый линкер указанного второго полипептида содержит аминокислотную последовательность GGCGGGEVAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK (SEQ ID NO: 82). В некоторых вариантах осуществления указанный третий линкер указанного первого полипептида содержит аминокислотную последовательность GGCGGGEVAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK (SEQ ID NO: 82) или аминокислотную последовательность GGCGGGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE (SEQ ID NO: 83). В других вариантах осуществления указанный четвертый линкер указанного второго полипептида содержит аминокислотную последовательность GGCGGGEVAACEKEVAALEKEVAALEK (SEQ ID NO: 82) или аминокислотную последовательность GGCGGGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE (SEQ ID NO: 83). В некоторых вариантах осуществления указанный третий линкер содержит аминокислотную последовательность VEPKSC (SEQ ID NO: 72) или аминокислотную последовательность FNRGEC (SEQ ID NO: 71). В некоторых вариантах осуществления указанный четвертый линкер содержит аминокислотную последовательность FNRGEC (SEQ ID NO: 71) или аминокислотную последовательность VEPKSC (SEQ ID NO: 72). В некоторых вариантах осуществления указанный третий линкер содержит аминокислотную последовательность VEPKSC (SEQ ID NO: 72), а указанный четвертый линкер содержит аминокислотную последовательность FNRGEC (SEQ ID NO: 71). В некоторых вариантах осуществления указанная константная область 2 тяжелой цепи (CH2) содержит аланин в позициях 234 и аланин в позиции 235, пронумерованные в соответствии с индексом ЕС, как у Кабата. В некоторых вариантах осуществления аминокислотную последовательность указанной шарнирной области, указанной константной области 2 тяжелой цепи (CH2) или указанной константной области 3 тяжелой цепи (CH3) получают из IgG1 или из IgG4. В некоторых вариантах осуществления указанная шарнирная область содержит аминокислотную последовательность EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 76), аминокислотную последовательность LEPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 130) или аминокислотную последовательность ESKYGPCCPPCP (SEQ ID NO: 134). В некоторых вариантах осуществления:

- (i) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; или
- (ii) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; или
- (iii) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; или
- (iv) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность

SEQ ID NO: 19, и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; или

(v) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24; или

(vi) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; или

(vii) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32; или

(viii) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36; или

(ix) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39, и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; или

(x) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44; или

(xi) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47, и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48; или

(xii) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52.

Однако другие аспекты раскрытия изобретения относятся к фармацевтической композиции, содержащей описанное в данном документе соединение, такое как соединение, описанное выше.

Другие аспекты раскрытия изобретения относятся к способу лечения аутоиммунного или воспалительного заболевания, включающего введение субъекту описанного в данном документе соединения, такого как соединение, описанное выше, или фармацевтической композиции, содержащей указанное соединение.

Однако другие аспекты раскрытия изобретения относятся к описанному в данном документе соединению, такому как соединение, описанное выше, для применения в медицине. В некоторых вариантах осуществления указанное применение относится к лечению аутоиммунного или воспалительного заболевания.

Другие аспекты раскрытия изобретения относятся к фармацевтической композиции, содержащей описанное в данном документе соединение, такое как соединение, описанное выше, для применения в медицине. В некоторых вариантах осуществления указанное применение относится к лечению аутоиммунного или воспалительного заболевания.

Однако другие аспекты раскрытия изобретения относятся к нуклеиновой кислоте, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую описанный в данном документе полипептид, такой как описанный выше полипептид. Другие аспекты раскрытия изобретения относятся к вектору, содержащему указанную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит промотор, функционально связанный с указанной нуклеиновой кислотой. Другие аспекты раскрытия изобретения относятся к клетке, содержащей указанную нуклеиновую кислоту или указанный вектор.

Другие аспекты раскрытия изобретения относятся к способу получения соединения или полипептида, как описано в данном документе, такого как описанный выше полипептид, включающему получение описанной в данном документе клетки, такой как клетка, описанная выше, и экспрессию нуклеиновой кислоты, как описано в данном документе, в указанной клетке. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает выделение и очистку указанного полипептида или соединения.

Подробности одного или больше вариантов осуществления изобретения изложены в описании ниже. Другие признаки или преимущества настоящего раскрытия изобретения будут очевидны из следующих рисунков и подробного описания нескольких вариантов осуществления, а также из прилагаемой формулы изобретения.

#### **Краткое описание рисунков**

Следующие рисунки являются частью данного описания и включены для дополнительной демонстрации определенных аспектов настоящего раскрытия изобретения, которые могут быть лучше поняты посредством ссылки на один или несколько из этих рисунков в сочетании с подробным описанием конкретных вариантов осуществления, представленных в данном документе.

Фиг. 1А представляет собой рисунок иллюстративного соединения, специфичного к ФАВЛ (BAFF) и ИЛ23А. Первая полипептидная цепь содержит домены CH3, CH2, VH<sub>2</sub> (VH<sub>II</sub>) и VL<sub>1</sub> (VL<sub>I</sub>). Вторая поли-

пептидная цепь содержит домены  $VH_1$  ( $VH_{1I}$ ) и  $VL_2$  ( $VL_{2II}$ ).  $VL_1$  и  $VH_1$  специфичны к первому белку-мишени (ФАВЛ (BAFF) или ИЛ23А), а  $VL_2$  и  $VH_2$  специфичны к второму белку-мишени (ИЛ23А или ФАВЛ (BAFF)). Верхняя панель показывает каждую полипептидную цепь отдельно. Нижняя панель показывает тетравалентное соединение (например, мономер, мономерное антитело, как описано в разделе "Примеры"), сформированное путем объединения доменов  $CH_2$  и  $CH_3$  одного первого полипептида с доменами  $CH_2$  и  $CH_3$  другого первого полипептида. Связывающие домены для первого и второго белков-мишеней формируются посредством объединения  $VH_1$  и  $VL_1$ , и посредством объединения  $VH_2$  и  $VL_2$  соответственно;

фиг. 1В - рисунок другого иллюстративного соединения, специфичного к ФАВЛ (BAFF) и ИЛ23А. Первая полипептидная цепь содержит домены  $CH_3$ ,  $CH_2$ ,  $CH_1$ ,  $VH_2$  ( $VH_{2II}$ ) и  $VL_1$  ( $VL_{1I}$ ). Вторая полипептидная цепь содержит домены  $CL$ ,  $VH_1$  ( $VH_{1I}$ ) и  $VL_2$  ( $VL_{2II}$ ).  $VL_1$  и  $VH_1$  специфичны к первому белку-мишени (ФАВЛ (BAFF) или ИЛ23А), а  $VL_2$  и  $VH_2$  специфичны к второму белку-мишени (ИЛ23А или ФАВЛ (BAFF)). Верхняя панель показывает каждую полипептидную цепь отдельно. Нижняя панель показывает тетравалентное соединение (например, мономер, мономерное антитело, как описано в разделе "Примеры"), сформированное путем объединения доменов  $CH_2$  и  $CH_3$  одного первого полипептида с доменами  $CH_2$  и  $CH_3$  другого первого полипептида. Связывающие домены для первого и второго белков-мишеней формируются посредством объединения  $VH_1$  и  $VL_1$ , и посредством объединения  $VH_2$  и  $VL_2$  соответственно. Соединение дополнительно объединяется посредством взаимодействий между доменами  $CL$  и  $CH_1$ ;

фиг. 2 - график, показывающий сывороточные концентрации (среднее  $\pm$  СО) для соединения А (закрашенные квадраты), соединение В (незакрашенные квадраты), соединение С (закрашенные треугольники) и соединение D (незакрашенные треугольники) у самцов яванского макака после одной внутривенной дозы 1 мкг/кг, как описано в примере 10;

фиг. 3 демонстрирует предсказанную кривую зависимости концентрации соединения В от времени в сыворотке человека после дозы 100 мг подкожно, вводимой один раз каждые две недели, как описано в примере 11. Пунктирная линия представляет целевую  $C_{min}$  (30 нМ);

фиг. 4 - графические сводные данные процентного содержания мономера по отношению к концентрации соединения В, как описано в примере 14;

фиг. 5 показывает, что соединение В поддерживает функциональную активность против анти-ФАВЛ *in vivo*. Мышей дозировали эквивалентно или анти-ФАВЛ (BAFF), или соединением В, и подвергали воздействию мини-кольцевой ФАВЛ (BAFF) человека, чтобы вызвать размножение В-клеток. На 14-й день селезенки собирали и анализировали с помощью проточной цитометрии на наличие мышинных B220+ В-лимфоцитов в качестве меры функциональной блокады ФАВЛ (BAFF);

фиг. 6 показывает, что соединение В поддерживает функциональную активность против анти-ИЛ23 *in vivo*. Оценивание соединения В в ИЛ23-индуцированном цитокининовом анализе. Мышей дозировали эквивалентно или анти-ИЛ23, или соединением В, и подвергали воздействию человеческого ИЛ23 дважды, чтобы вызвать воспаление уха. Спустя двадцать четыре часа после заключительной инъекции уши собирали и анализировали по ИЛ17А мыши и ИЛ22 мыши в качестве меры функциональной блокады ИЛ23.

#### Подробное описание сущности изобретения

В данном документе описаны соединения, которые связываются как с ФАВЛ (BAFF), так и с ИЛ-23А (также называемым ИЛ23p19 или ИЛ23А). На сегодняшний день нет разрешенных для использования в медицине соединений, нацеленных как на ФАВЛ (BAFF), так и на ИЛ23А. Существуют ограниченные исследования с одновременной нейтрализацией двух/более ключевых медиаторов воспаления применяя биотерапевтический подход, и в этих исследованиях не было показано улучшение клинических исходов, которые были оценены при ревматоидном артрите (РА). Кроме того, такие комбинации могут увеличивать побочные эффекты, такие как риск заражения (см., например, Genovese M.C., Cohen S., Moreland L., Lium D., Robbins S. et al. (2004). *Arth. Rheum.* 50, 1412-9; Genovese M.C., Cohen S., Moreland L., Lium D., Robbins S., et al. (2004). *Arth. Rheum.* 50, 1412-9; and Weinblatt M., Schiff M., Goldman A. Kremer J, Luggen M. et al. (2007). *Ann. Rheum. Dis.* 66, 228-34). Кроме того, такие биспецифические соединения трудно разрабатывать из-за проблем, связанных с растворимостью (например, агрегацией) и стабильностью (например, плохая фармакокинетика).

Неожиданно было обнаружено, что некоторые из соединений, описанных в данном документе, которые связываются с ФАВЛ (BAFF) и ИЛ-23А, имеют сходные или улучшенные свойства по сравнению с отдельными антителами, которые нацелены или на ИЛ-23А, или на ФАВЛ (BAFF). Было также обнаружено, что некоторые соединения имеют подходящую фармакокинетику и являются растворимыми в подходящих для дозирования диапазонах. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления, существуют преимущества однократного введения перед серийным введением единичной дозы с точки зрения побочных эффектов индивидуальной терапии, и более низкой дозы. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления, свойства СМС (Connection Map for Compounds (СМС)) соединений показали, что некоторые соединения имеют высокие температуры плавления ( $T_m$ ) и низкую агрегацию. В одном аспекте, одно иллюстративное соединение показало особенно низкую агрегацию при высоких концентрациях.

Считается, что соединения, описанные в данном документе, обладают одним или несколькими полезными свойствами, например уменьшенными побочными эффектами, повышенной легкостью и безопасностью введения, увеличенным периодом полувыведения, повышенной аффинностью связывания или повышенной ингибирующей активностью, по сравнению со стандартными молекулами антител, например, молекулой IgG или антигенсвязывающим фрагментом (например, Fab).

Соответственно, аспекты раскрытия изобретения относятся к соединениям, специфичным как к ФАВЛ (BAFF), так и к ИЛ-23А, а также к способам использования и получения таких соединений. В одном аспекте, рассматриваемая технология относится к композициям с повышенной эффективностью для лечения и профилактики аутоиммунных или воспалительных заболеваний, таких как системная красная волчанка (СКВ (SLE)), системная красная волчанка с поражением почек/волчаночным нефритом (ВН (LN)), ассоциированный с АНЦА (антинейтрофильное цитоплазматическое антитело, ANCA) васкулит (ААВ (AAV)), первичный синдром Шегрена (ПСШ (pSS)), хроническая болезнь "трансплантат против хозяина" (ХБТПХ (cGVHD)), системный склероз (СС (SSc)), ревматоидный артрит (РА (RA)), псориаз (Пс (Ps)), анкилозирующий спондилоартрит (АС (AS)) и псориатический артрит (ПА (PA)). Двойной антагонист ФАВЛ (BAFF)/ИЛ23А будет ингибировать как аутоантитело/иммунный комплекс, так и опосредованное каскадом ИЛ23 конечное повреждение органов, и может обеспечить лучшую индукцию и поддержание клинического ответа, в сравнении с текущим "Стандартом лечения" для лечения СКВ (SLE) и ВН (LN). По сравнению с совместным введением антитела ФАВЛ (BAFF) и антитела ИЛ-23 для одновременного ингибирования обоих путей, двойной антагонист ФАВЛ (BAFF)/ИЛ23А более удобен для пациента, что может привести к улучшению степени соблюдения предписанного режима терапии и уменьшению боли. Двойной антагонист ФАВЛ (BAFF)/ИЛ23А позволит вводить уменьшенные дозы, а также снизить затраты, связанные с лечением. Кроме того, антагонист ФАВЛ (BAFF)/ИЛ23А также может быть полезен при лечении группы заболеваний, связанных с неправильно регулируемым В-клетками/аутоантителом и опосредованным ИЛ23 повреждением ткани, включая первичный синдром Шегрена (ПСШ), хроническую болезнь "трансплантат против хозяина" (ХБТПХ), системный склероз (СС) и ассоциированный с АНЦА васкулит (ААВ).

Трудно разработать терапевтическую молекулу двойного нацеливания, которая объединяет две фармакологические сущности и поддерживает функциональную эффективность каждого компонента, и в то же время обладает биофизическими свойствами, подходящими для крупномасштабного производства. Разработка молекул двойного нацеливания была затруднена многими проблемами, связанными с устойчивостью *in vitro* и *in vivo*, такими как плохая экспрессия, агрегация, ограниченный срок хранения, слабая стабильность сыворотки и плохие фармакокинетические свойства *in vivo* (Demarest S.J., Glaser S.M. (2008). *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 11, 675-87).

Здесь мы раскрываем способ создания молекул двойного нацеливания, которые ингибируют как функцию ФАВЛ (BAFF), так и ИЛ23. Молекулы двойного нацеливания рассматриваемой технологии обладают полезными и неожиданными свойствами, такими как высокие температуры плавления ( $T_m$ ), низкая агрегация при высоких концентрациях и прогнозируемые свойства ФК человека, которые делают возможным подкожное введение раз в две недели или менее часто.

#### Соединения.

Аспекты раскрытия изобретения относятся к соединению, специфичному как к ФАВЛ (BAFF), так и к ИЛ23А. Иллюстративная белковая последовательность для ФАВЛ (BAFF) и иллюстративная белковая последовательность для ИЛ23А показаны ниже

```
>sp|Q9Y275|B-cell Activating Factor (BAFF) - TN13B_HUMAN Tumor necrosis factor ligand
superfamily member 13B OS=Homo sapiens GN=TNFSF13B PE=1 SV=1
```

```
MDDSTEREQSRLTSCLKKREEMKLKECVSILPRKESPSVRSSKDGKLLAATLLLALLSCC
LTVVSFYQVAALQGDLASLRAELQGHHAEKLPAGAGAPKAGLEEAPVAVTAGLKIFEP
APGEGNSSQNSRNKRAVQGPEETVTQDCLQLIADSETPTIQKGSYTFVPWLLSFKRGSAL
EEKENKILVKETGYFFIYGQVLYTDKTYAMGHLIQRKKVHVFGDELSLVTLFRCIQNMP
ETLPNNSCYSAGIAKLEEGDELQLAIPRENAQISLDGDTVFFGALKLL(SEQ ID NO:80)
```

```
>NP_057668.1 – ИЛ23А [Homo sapiens]
```

```
MLGSRVAVMLLLLLPWTAQGRAVPGGSSPAWTQCQQLSJKLCTLAWSAHPVGHMDL
REEGDEETNDVPHIQCGDGDPOGLRDNSQFCLQRHQGLIFYEKLLGSDIFTGEPSSLP
DSPVGQLHASLLGLSLLQPEGHNWETQQIPSLSPSQPWQRLLLLRFKILRSLQAFVAVAA
RVFAHGAATLSP (аминокислоты 1-19 представляют собой предсказанную сигнальную
последовательность)(SEQ ID NO:81)
```

В некоторых вариантах осуществления соединение содержит первый полипептид и второй полипептид. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит: (i) переменный домен

легкой цепи первого иммуноглобулина (VL1), специфичный к первому белку-мишени; (ii) переменный домен тяжелой цепи второго иммуноглобулина (VH2), специфичный к второму белку-мишени; и (iii) шарнирную область, константную область 2 тяжелой цепи (CH2) и константную область 3 тяжелой цепи (CH3). В некоторых вариантах осуществления первый полипептид дополнительно содержит константную область 1 тяжелой цепи (CH1). В некоторых вариантах осуществления второй полипептид содержит: (i) переменный домен легкой цепи второго иммуноглобулина (VL2), специфичный к второму белку-мишени; (ii) переменный домен тяжелой цепи первого иммуноглобулина (VH1), специфичный к первому белку-мишени. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид дополнительно содержит константную область легкой цепи (CL).

Следует понимать, что переменные домены и константные домены/области первого полипептида могут быть в любом порядке и переменные домены и константные домены/области (если они есть) второго полипептида могут быть в любом порядке. Ниже приведены несколько иллюстративных конфигураций для доменов/областей на первом и втором полипептидах от N-конца до C-конца.

Конфигурация 1 первого полипептида: N-VL1-VH2-шарнир-CH2-CH3-C.

Конфигурация 2 первого полипептида: N-VH2-VL1-шарнир-CH2-CH3-C.

Конфигурация 3 первого полипептида: N-VL1-VH2-CH1-шарнир-CH2-CH3-C.

Конфигурация 4 первого полипептида: N-VH2-VL1-CH1-шарнир-CH2-CH3-C.

Конфигурация 1 второго полипептида: N-VL2-VH1-C.

Конфигурация 2 второго полипептида: N-VH1-VL2-C.

Конфигурация 3 второго полипептида: N-VL2-VH1-CL-C.

Конфигурация 4 второго полипептида: N-VH1-VL2-CL-C.

Иллюстративные конфигурации соединения показаны на фиг. 1A и 1B.

В некоторых вариантах осуществления переменные области первого полипептида и второго полипептида связываются друг с другом с образованием сайта связывания для первого белка-мишени и сайта связывания для второго белка-мишени. В некоторых вариантах осуществления VL1 первого полипептида и VH1 второго полипептида связываются с образованием сайта связывания, который связывает первый белок-мишень, и VL2 второго полипептида и VH2 первого полипептида связываются с образованием сайта связывания, который связывает второй белок-мишень. В некоторых вариантах осуществления первый белок-мишень представляет собой ФАВЛ (BAFF), а второй белок-мишень представляет собой ИЛ23А. В других вариантах осуществления, первый белок-мишень представляет собой ИЛ23А, а второй представляет собой белок-мишень ФАВЛ (BAFF). Следует понимать, что термины "первый" и "второй" не обозначают указание на степень важности любого из белков-мишеней.

Иллюстративные комбинации последовательностей для каждого из VL1, VH1, VL2 и VH2 приведены ниже в табл. 1, а также в табл. 2 в примере 1.

Таблица 1. Иллюстративные комбинации последовательностей для VL1, VH1, VL2 и VH2

Номер комбинации	Последовательность VL1	Последовательность VH1	Последовательность VL2	Последовательность VH2
1	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:3
2	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:1
3	SEQ ID NO:85	SEQ ID NO:84	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:3
4	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:85	SEQ ID NO:84
5	SEQ ID NO:87	SEQ ID NO:86	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:3
6	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:87	SEQ ID NO:86
7	SEQ ID NO:89	SEQ ID NO:88	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:3
8	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:89	SEQ ID NO:88
9	SEQ ID NO:91	SEQ ID NO:90	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:3
10	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:91	SEQ ID NO:90

В некоторых вариантах осуществления соединение содержит последовательность VL1, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 первой легкой цепи, и последовательность VH1, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 первой тяжелой цепи, последовательность VL2, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 второй легкой цепи, и последовательность VH2, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 второй тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления CDR представляют собой CDR одной или больше последовательностей VL1, VH1, VL2 и VH2, представленных в табл. 1. Иллюстративные последовательности CDR легкой цепи и тяжелой цепи для последовательностей VL1, VH1, VL2 и VH2, представленные в табл. 1, показаны ниже

SEQ ID NO: 1 CDR: GGTFNNAIN (SEQ ID NO:92) (CDR1), GIPMFGTAKYSQNFQG (SEQ ID NO:93) (CDR2), SRDLLLFPNHALSP (SEQ ID NO:94) (CDR3)  
SEQ ID NO: 2 CDR: QGDSLRSYYAS (SEQ ID NO:95) (CDR1), GKNNRPS (SEQ ID NO:96) (CDR2), SSRDSSGNHWV (SEQ ID NO:97) (CDR3)  
SEQ ID NO: 3 CDR: GYTFTDQTIH (SEQ ID NO:98) (CDR1), YIYPRDDSPKYENFKG (SEQ ID NO:99) (CDR2), PDRSGYAWFIY (SEQ ID NO:100) (CDR3)



SEQ ID NO: 4 CDR: KASRDVAIAVA (SEQ ID NO:101) (CDR1), WASTRHT (SEQ ID NO:102) (CDR2), HQYSSYPFT (SEQ ID NO:103) (CDR3)

SEQ ID NO: 84 CDR: DHIFSIHWMQ (SEQ ID NO:104) (CDR1), EIFPGSGTTDYNEKFKG (SEQ ID NO:105) (CDR2), GAFDY (SEQ ID NO:106) (CDR3)

SEQ ID NO: 85 CDR: RASQDIGNRLS (SEQ ID NO:107) (CDR1) ATSSLDS (SEQ ID NO:108) (CDR2), LQYASSPFT (SEQ ID NO:109) (CDR3)

SEQ ID NO: 86 CDR: DHIFSIHWMQ (SEQ ID NO:110) (CDR1), EIFPGSGTTDYNEKFKG (SEQ ID NO:111) (CDR2), GAFDY (SEQ ID NO: 112) (CDR3)

SEQ ID NO: 87 CDR: RASQDIGNRLN (SEQ ID NO:112) (CDR1) ATSSLDS (SEQ ID NO:113) (CDR2), LQYASSPFT (SEQ ID NO:114) (CDR3)

SEQ ID NO: 88 CDR: GYSFSTFFIH (SEQ ID NO:115) (CDR1), RIDPNSGATKYNEKFES (SEQ ID NO:116) (CDR2), GEDLLIRTDALDY (SEQ ID NO:117) (CDR3)

SEQ ID NO: 89 CDR: KASQNAGIDVA (SEQ ID NO:118) (CDR1), SKSNRYT (SEQ ID NO: 119) (CDR2), LQYRSYPRT (SEQ ID NO:120) (CDR3)

SEQ ID NO: 90 CDR: GYSFSTFFIH (SEQ ID NO:121) (CDR1), GRIDPNSGATKYNEKFES (SEQ ID NO:122) (CDR2), GEDLLIRTDALDY (SEQ ID NO:123) (CDR3)

SEQ ID NO: 91 CDR: KASQNAGIDVA (SEQ ID NO:124) (CDR1), SKSNRYT (SEQ ID NO:125) (CDR2), LQYRSYPRT (SEQ ID NO:126) (CDR3)

В некоторых вариантах осуществления соединение содержит VH1, VL1, VH2 и/или VL2, который содержит последовательность, которая по меньшей мере на 80% (например, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентична (остаток к остатку по всей длине последовательности) последовательности, описанной в табл. 1. "Процент идентичности" двух аминокислотных последовательностей определяется с использованием алгоритма Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68, 1990, измененном как в Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77, 1993. Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST (версия 2.0) Altschul et al. J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990. BLAST-белковые поиски могут быть выполнены с помощью программы XBLAST, оценка равна 50, длина слова равна 3 для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных белковым молекулам интереса. Может быть использован Gapped BLAST там, где существуют пробелы в выравнивании двух последовательностей, как описано в Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402, 1997. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST могут применяться параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST).

В некоторых вариантах осуществления соединение содержит VH1, VL1, VH2 и/или VL2, который содержит последовательность, содержащую одну или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более) мутацию в последовательности, описанной в табл. 1. Такие мутации могут быть консервативными аминокислотными заменами. Как применяется в данном документе, термин "консервативная аминокислотная замена" относится к аминокислотной замене, которая не изменяет относительные характеристики заряда или размера белка, в котором происходит аминокислотная замена. Консервативные замены аминокислот включают, например, замены, сделанные между аминокислотами среди следующих групп: а) М, I, L, V; б) F, Y, W; в) K, R, H; г) A, G; д) S, T; е) Q, N; и ё) E, D.

Аминокислотные последовательности шарнирной области, CH2 и CH3 соединения (и в качестве варианта CH1 и CL, если соединение содержит такие области) могут быть получены из любого подходящего источника, например, константной области антитела, такого как IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Аминокислотные последовательности константных областей легкой и тяжелой цепей антитела хорошо известны в данной области техники, например, такие последовательности предлагаются в базе данных IMGT ([www.imgt.org](http://www.imgt.org)) или [www.vbase2.org/vbstat.php](http://www.vbase2.org/vbstat.php)., обе включены в данный документ посредством ссылки. Кроме того, в некоторых системах экспрессии С-концевой остаток лизина домена CH3 может быть удален после трансляции. Соответственно, С-концевой остаток лизина домена CH3 является необязательным аминокислотным остатком. Именно в настоящем изобретении предложены молекулы, не имеющие С-концевого остатка лизина домена CH3. Также настоящим изобретением охвачены именно такие конструкции, содержащие С-концевой остаток лизина домена CH3. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные последовательности CH2 и CH3 получены из IgG1 (например, SEQ ID NO: 75) или IgG4 (например, SEQ ID NO: 73). В некоторых вариантах осуществления CL содержит аминокислотную последовательность каппа CL или лямбда CL. В некоторых вариантах осуществления шарнирная область содержит аминокислотную последовательность EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 76). Шарнирная область SEQ ID NO: 76 присутствует, например, в полипептиде SEQ ID NO: 5. В других вариантах осуществления, шарнирная область содержит аминокислотную последовательность LEPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 130). Шарнирная область SEQ ID NO: 130 присутствует, например, в полипептиде SEQ ID

NO: 9. Шарнирная область SEQ ID NO: 130 также присутствует в начале домена Fc SEQ ID NO: 129. В еще других вариантах осуществления шарнирная область содержит аминокислотную последовательность ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO: 134). Шарнирная область SEQ ID NO: 134 присутствует, например, в полипептиде SEQ ID NO: 13. Шарнирная область SEQ ID NO: 134 также присутствует в начале домена Fc SEQ ID NO: 127.

В некоторых вариантах осуществления CH2 и/или CH3 соединения (и в качестве варианта CH1 и CL, если соединение содержит такие области) могут содержать одну или более аминокислотных замен, отличающихся от CH2 или CH3 дикого типа, например, одну или более аминокислотных замен в CH2 или CH3 IgG1 дикого типа, или одну или более аминокислотных замен в CH2 или CH3 IgG4 дикого типа (SEQ ID NO: 39 предлагается в качестве примера IgG1 дикого типа). Такие замены известны в данной области техники (см., например, US 7704497, US 7083784, US 6821505, US 8323962, US 6737056 и US 7416727).

В некоторых вариантах осуществления CH2 содержит аминокислотную замену в 234, 235, 252, 254 и/или 256, пронумерованные в соответствии с индексом ЕС как у Кабата для обычного антитела (Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1991, которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки). Следует понимать, что все аминокислотные позиции, описанные в данном документе, пронумерованные в соответствии с индексом ЕС как у Кабата для обычных антител. В некоторых вариантах осуществления CH2 содержит аминокислотную замену в позиции 252, 254 и/или 256. В некоторых вариантах осуществления аминокислота в позиции 252 это тирозин, фенилаланин, серин, триптофан, или треонин. В некоторых вариантах осуществления аминокислота в позиции 254 это треонин. В некоторых вариантах осуществления аминокислота в позиции 254 это серин, аргинин, глутамин, глутаминовая кислота или аспарагиновая кислота. В некоторых вариантах осуществления CH2 содержит тирозин в позиции 252, треонин в позиции 254 и глутаминовую кислоту в позиции 256 (далее упоминается в настоящем документе как мутант YTE). В некоторых вариантах осуществления CH2 содержит аминокислотную замену в позиции 234 и/или 235. В некоторых вариантах осуществления CH2 содержит аланин в позиции 234 и аланин в позиции 235, также далее упоминается в настоящем документе как мутант КО. В некоторых вариантах осуществления CH2 содержит тирозин в позиции 252, треонин в позиции 254, глутаминовую кислоту в позиции 256, аланин в позиции 234, и аланин в позиции 235, также упоминается в настоящем документе как мутант КО-YTE.

В некоторых вариантах осуществления один или более линкер может быть применен для того, чтобы соединить домены/области вместе на первом и/или втором полипептиде. Например, первый полипептид может содержать линкер между VL1 и VH2. Первый полипептид дополнительно содержит линкер между VL1 или VH2 (в зависимости от конфигурации, как обсуждалось выше) и шарниром (например, -VL1-линкер-шарнир или -VH2-линкер-шарнир). Если первый полипептид содержит CH1, например, первый полипептид может содержать линкер между VL1 или VH2 (в зависимости от конфигурации, как обсуждалось выше) и CH1 (например, -VL1-линкер-CH1 или -VH2-линкер-CH1), В другом примере второй полипептид может содержать линкер между VL2 и VH1. Второй полипептид может дополнительно содержать линкер после VL2 или VH1 (в зависимости от конфигурации, как обсуждалось выше, например, -VL2-линкер или -VH1-линкер) на С-конце полипептидной цепи. Если второй полипептид дополнительно содержит CL, второй полипептид может дополнительно содержать линкер между VL2 или VH1 (в зависимости от конфигурации, как обсуждалось выше) и CL (как, например, в -VL2-линкер-CL или -VH1-линкер-CL). Следует понимать, что любое количество линкеров может быть применено для соединения любого домена или области с любым другим доменом или областью на первом полипептиде, и/или любое количество линкеров может быть применено для соединения любого домена или области с любым другим доменом или областью на втором полипептиде.

Предусмотрено применение любого подходящего линкера, известного в данной области техники, в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления линкер является пептидным линкером. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер содержит по меньшей мере две аминокислоты, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер имеет не более 50, 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, или 2 аминокислот в длину. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер имеет длину в пределах 2 и 50, 2 и 40, 2 и 30, 2 и 20, 2 и 10, 2 и 9, 2 и 8, 2 и 7 или 2 и 6 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность GGGSGGGG (SEQ ID NO: 69), LGGGSG (SEQ ID NO: 70), FNRGEC (SEQ ID NO: 71), VEPKSC (SEQ ID NO: 72), GGCGGGEVAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK (SEQ ID NO: 82), GGCGGGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE (SEQ ID NO: 83) или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер может содержать множественные копии линкерной последовательности, например, множественные копии последовательности GGGSGGGG (SEQ ID NO: 69), LGGGSG (SEQ ID NO: 70), FNRGEC (SEQ ID NO: 71), VEPKSC (SEQ ID NO: 72), или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды имеют следующие конфигурации.

Конфигурация 1 первого полипептида: N-VL1-VH2-шарнир-CH2-CH3-C.

Конфигурация 2 первого полипептида: N-VH2-VL1-шарнир-CH2-CH3-C.

Конфигурация 1 второго полипептида: N-VL2-VH1-C.

Конфигурация 2 второго полипептида: N-VH1-VL2-C,

причем первый линкер между VL1 и VH2 первого полипептида или второй линкера между VL2 и VH1 второго полипептида содержит аминокислотную последовательность GGGSGGGG (SEQ ID NO: 69). В некоторых вариантах осуществления указанный первый линкер и указанный второй линкер содержат аминокислотную последовательность GGGSGGGG (SEQ ID NO: 69). В некоторых вариантах осуществления первый полипептид дополнительно содержит третий линкер между VH2 или VL2 и указанной шарнирной областью, а второй полипептид дополнительно содержит четвертый линкер после указанных VH1 или VL2 (на его С-конце). В некоторых вариантах осуществления указанный третий линкер указанного первого полипептида содержит аминокислотную последовательность GGCGGGEVAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK (SEQ ID NO: 82), и указанный четвертый линкер указанного второго полипептида содержит аминокислотную последовательность GGCGGGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE (SEQ ID NO: 83). В других вариантах осуществления, указанный третий линкер указанного первого полипептида содержит аминокислотную последовательность GGCGGGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE (SEQ ID NO: 83), и указанный четвертый линкер указанного второго полипептида содержит аминокислотную последовательность GGCGGGEVAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK (SEQ ID NO: 82). В некоторых вариантах осуществления указанный третий линкер указанного первого полипептида содержит аминокислотную последовательность GGCGGGEVAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK (SEQ ID NO: 82) или аминокислотную последовательность GGCGGGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE (SEQ ID NO: 83). В других вариантах осуществления, указанный четвертый линкер указанного второго полипептида содержит аминокислотную последовательность GGCGGGEVAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK (SEQ ID NO: 82) или аминокислотную последовательность GGCGGGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE (SEQ ID NO: 83). В некоторых вариантах осуществления указанный третий линкер содержит аминокислотную последовательность VEPKSC (SEQ ID NO: 72) или аминокислотную последовательность FNRGEC (SEQ ID NO: 71). В некоторых вариантах осуществления указанный четвертый линкер содержит аминокислотную последовательность FNRGEC (SEQ ID NO: 71) или аминокислотную последовательность VEPKSC (SEQ ID NO: 72). В некоторых вариантах осуществления указанный третий линкер содержит аминокислотную последовательность VEPKSC (SEQ ID NO: 72), а указанный четвертый линкер содержит аминокислотную последовательность FNRGEC (SEQ ID NO: 71). Аминокислотная последовательность FNRGEC (SEQ ID NO: 71) представляет собой последние шесть аминокислотных остатков CL-домена (SEQ ID NO: 77), а аминокислота VEPKSC (SEQ ID NO: 72) включает последнюю аминокислоту CH1 и первые пять аминокислотных остатков шарнирной области SEQ ID NO: 76 (как в SEQ ID NO: 5).

В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды имеют следующие конфигурации.

Конфигурация 3 первого полипептида: N-VL1-VH2-CH1-шарнир-CH2-CH3-C.

Конфигурация 4 первого полипептида: N-VH2-VL1-CH1-шарнир-CH2-CH3-C.

Конфигурация 3 второго полипептида: N-VL2-VH1-CL-C.

Конфигурация 4 второго полипептида: N-VH1-VL2-CL-C,

причем первый линкер между указанным VL1 и указанным VH2 первого полипептида, или указанный второй линкер между указанным VL2 и указанным VH1 второго полипептида содержит аминокислотную последовательность GGGSGGGG (SEQ ID NO: 69). В некоторых вариантах осуществления указанный первый линкер и указанный второй линкер содержат аминокислотную последовательность GGGSGGGG (SEQ ID NO: 69). В некоторых вариантах осуществления указанный первый полипептид дополнительно содержит третий линкер между указанным VH2 или VL1 и указанным CH1, а указанный второй полипептид дополнительно содержит четвертый линкер между указанным VH1 или указанным VL2 и указанным CL. В некоторых вариантах осуществления указанный третий линкер или указанный четвертый линкер содержит аминокислотную последовательность LGGGSG (SEQ ID NO: 70). В некоторых вариантах осуществления указанный третий линкер и указанный четвертый линкер содержит аминокислотную последовательность LGGGSG (SEQ ID NO: 70). В некоторых вариантах осуществления указанный третий линкер и/или указанный четвертый линкер содержат необязательный остаток цистеина. В некоторых вариантах осуществления указанный третий линкер и/или указанный четвертый линкер содержат аминокислотную последовательность GGCGGG (SEQ ID NO: 135) или LGCGGGGS (SEQ ID NO: 136).

В некоторых вариантах осуществления указанная константная область 2 тяжелой цепи (CH2) содержит аланин в позициях 234 и аланин в позиции 235, пронумерованные в соответствии с индексом ЕС, как у Кабата, для типичного антитела.

В некоторых вариантах осуществления соединение содержит два первых полипептида и два вторых полипептида. В некоторых вариантах осуществления шарнир, CH2 и CH3 одного из первых полипептидов объединяются с шарниром, CH2 и CH3 другого из первых полипептидов, образуя тетравалентную молекулу (например, два первых полипептиды димеризуются через связи между их соответствующими

шарниром, доменами СН2 и СН3, чтобы сформировать тетравалентную молекулу, содержащую два сайта связывания, специфические к первому целевому белку, и два сайта связывания, специфические ко второму целевому белку), мономер или мономерное антитело, как описано в разделе Примеры. Если первый полипептид дополнительно содержит домен СН1, и другой полипептид дополнительно содержит домен СL, домены СН1 и СL также могут участвовать в образовании тетравалентной молекулы (например, два первых полипептида димеризуются через связи между их соответствующими шарниром, доменами СН2 и СН3, и СН1 каждого указанного из первых полипептидов объединяются с СL одного из указанных вторых полипептидов чтобы сформировать тетравалентную молекулу, содержащую два сайта связывания к первому целевому белку, и два сайта связывания ко второму целевому белку), мономер, мономерное антитело, как описано в разделе Примеры. В некоторых вариантах осуществления два первых полипептиды объединены вместе с помощью по меньшей мере одной дисульфидной связи. В некоторых вариантах осуществления указанное соединение содержит два указанных первых полипептида и два указанных вторых полипептида, причем каждый из указанных первых полипептидов содержит третий линкер, шарнир, СН2 и СН3, и каждый из указанных вторых полипептидов содержит четвертый линкер, и при этом шарнир, СН2 и СН3 одного из первых полипептидов объединяется с шарниром, СН2 и СН3 другого из первых полипептидов, а третий линкер каждого из указанных первых полипептидов объединяется с четвертым линкером одного из указанных вторых полипептидов с образованием тетравалентной молекулы (например, мономера, мономерного антитела, как описано в разделе "Примеры") (например, соединения U и T).

В некоторых вариантах осуществления раскрытие изобретения относится к соединению, содержащему два первых полипептида и два вторых полипептида,

причем указанные два первых полипептида связаны вместе посредством по меньшей мере одной дисульфидной связи, и при этом каждый указанный первый полипептид связан с одним указанным вторым полипептидом посредством по меньшей мере одну дисульфидной связи,

при этом каждый из указанных первых полипептидов содержит:

(i) переменный домен легкой цепи первого иммуноглобулина (VL1), специфичный к первому белку-мишени;

(ii) переменный домен тяжелой цепи второго иммуноглобулина (VH2), специфичный к второму белку-мишени;

(iii) константную область 1 тяжелой цепи (СН1), шарнирную область, константную область 2 тяжелой цепи (СН2) и константную область 3 тяжелой цепи (СН3); и при этом каждый из указанных вторых полипептидов содержит:

(i) переменный домен легкой цепи второго иммуноглобулина (VL2), специфичный к указанному второму белку-мишени;

(ii) переменный домен тяжелой цепи первого иммуноглобулина (VH1), специфичный к указанному первому белку-мишени;

(iii) домен константной области легкой цепи (СL),

причем шарнир, СН2 и СН3 одного из первых полипептидов объединяется с шарниром, СН2 и СН3 другого из первых полипептидов, и СН1 каждого из указанных первых полипептидов объединяется с СL каждого из вторых полипептидов с образованием тетравалентной молекулы; при этом

а) указанные VL1 и VH1 объединяются с образованием сайта связывания, который связывает указанный первый белок-мишень;

б) указанные VL2 и VH2 объединяются с образованием сайта связывания, который связывает указанный второй белок-мишень;

в) указанная константная область 2 тяжелой цепи (СН2) содержит тирозин в позиции 252, треонин в позиции 254 и глутаминовую кислоту в позиции 256, пронумерованные согласно индексу ЕС, как у Кабата; и

д) указанный первый белок-мишень представляет собой ФАВЛ (BAFF), а указанный второй белок-мишень представляет собой ИЛ-23А, или указанный первый белок-мишень представляет собой ИЛ-23А, а указанный второй белок-мишень ФАВЛ (BAFF), и при этом:

(i) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 2, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 1, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 4 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 3; или

(ii) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 4, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 3, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 2 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 1; или

(iii) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 85, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 84, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 4 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 4; или

(iv) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 4, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 3, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 85 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 84; или

(v) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 87, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 86, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 4 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 3; или

(vi) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 4, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 3, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 87 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 86; или

(vii) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 89, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 88, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 4 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 3; или

(viii) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 4, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 3, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 89 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 88; или

(ix) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 91, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 90, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 4 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 3; или

(x) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 4, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 3, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 91 и указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 90.

В некоторых вариантах осуществления относящихся к вышеуказанному аспекту, каждый из указанных первых полипептидов дополнительно содержит первый линкер между указанным VL1 и указанным VH2, и каждый из указанных вторых полипептидов дополнительно содержит второй линкер между указанным VL2 и указанным VH1. В некоторых вариантах осуществления указанный первый линкер или указанный второй линкер содержит аминокислотную последовательность GGGSGGGG (SEQ ID NO: 69). В некоторых вариантах осуществления указанный первый линкер и указанный второй линкер содержат аминокислотную последовательность GGGSGGGG (SEQ ID NO: 69). В некоторых вариантах осуществления каждый из указанных первых полипептидов дополнительно содержит третий линкер между указанным VH2 или указанным VL1 и указанным CH1, и каждый из указанных вторых полипептидов дополнительно содержит четвертый линкер между указанным VH1 или указанным VL2 и указанным CL. В некоторых вариантах осуществления указанный третий линкер или указанный четвертый линкер содержит аминокислотную последовательность LGGGSG (SEQ ID NO: 70). В некоторых вариантах осуществления указанный третий линкер и указанный четвертый линкер содержат аминокислотную последовательность LGGGSG (SEQ ID NO: 70). В некоторых вариантах осуществления указанный третий линкер и/или указанный четвертый линкер содержат необязательный остаток цистеина. В некоторых вариантах осуществления указанный третий линкер и/или указанный четвертый линкер содержат аминокислотную последовательность GGCGGG (SEQ ID NO: 135) или LGCGGGG (SEQ ID NO: 136). В некоторых вариантах осуществления указанная константная область 2 тяжелой цепи (CH2) содержит аланин в позициях 234 и аланин в позиции 235, пронумерованные в соответствии с индексом ЕС, как у Кабага. В некоторых вариантах осуществления аминокислотную последовательность указанной шарнирной области, указанной константной области 2 тяжелой цепи (CH2) или указанной константной области 3 тяжелой цепи (CH3) получают из IgG1 или из IgG4. В некоторых вариантах осуществления указанная шарнирная область содержит аминокислотную последовательность EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 76), аминокислотную последовательность LEPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 130) или аминокислотную последовательность ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO: 134). В некоторых вариантах осуществления (i) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; или

(ii) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; или

(iii) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; или

(iv) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; или

(v) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; или

(vi) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; или

(vii) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29 и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30; или

(viii) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33 и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34; или

(ix) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37 и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38; или

(x) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41 и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42; или



SEQ ID NO: 41 и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42; или

(xi) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45 и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46; или

(xii) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49 и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50; или

(xiii) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53 и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54; или

(xiv) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55 и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56; или

(xv) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57 и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58; или

(xvi) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59 и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60; или

(xvii) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61 и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; или

(xviii) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63 и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64; или

(xix) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65 и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66; или

(xx) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67 и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68.

Также в этом документе предусмотрены другие соединения, которые конкурируют за связывание с соединением, как описано в данном документе, например, исследуемое соединение, которое конкурирует с соединением, как описано в данном документе, за связывание с ФАВЛ (BAFF) и ИЛ23А. В некоторых вариантах осуществления испытуемое соединение может иметь по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности последовательности (аминокислота к аминокислоте по всей длине последовательности) с соединением, как описано в данном документе. Конкурентное связывание может быть определено с помощью любого анализа, известного в данной области техники, например, равновесного связывания, ELISA, поверхностного плазмонного резонанса, или спектроскопии.

В некоторых вариантах осуществления описанное в данном документе соединение специфически связывается как с ФАВЛ (BAFF), так и с ИЛ23А. Соединение, которое "специфически связывается" с антигеном или эпитопом обозначает термин, хорошо известный в данной области техники, и способы определения такого специфического связывания также хорошо известны в данной области техники. Говорят, что молекула показывает "специфическое связывание", если она реагирует или связывается чаще, быстрее, с большей продолжительностью и/или с большей аффинностью с особым целевым антигеном, чем с альтернативными целями. Соединение "специфически связывается" с целевым антигеном или эпитопом, если оно связывается с большей аффинностью, авидностью, более быстро, и/или с большей продолжительностью, чем оно связывается с другими веществами. Например, соединение, которое специфически (или селективно) связывается с антигеном (например, ФАВЛ (BAFF) или ИЛ23А) или антигенным эпитопом в этом антигене, представляет собой вещество, которое связывается с этим целевым антигеном с большей аффинностью, авидностью, легче и/или с большей продолжительностью, чем оно связывается с другими антигенами или другими эпитопами в этом же антигене. Читая это определение следует также понимать, что, например, соединение, которое специфически связывается с первым целевым антигеном, может, или не может специфически или селективно связываться со вторым целевым антигеном. Таким образом, "специфическое связывание" или "избирательное связывание" не обязательно требует (хотя оно может включать) исключительное связывание. В целом, как правило, но не обязательно, отсылка к связыванию означает селективное связывание. В некоторых примерах, соединение, которое "специфически связывается" с целевым антигеном, или эпитопом этого антигена, может не связываться с другими антигенами или другими эпитопами в том же антигене.

В некоторых вариантах осуществления соединения, как описано в данном документе, имеет соответствующее средство к ФАВЛ (BAFF) или ИЛ23А, или их антигенным эпитомам. Как применяется в

настоящем документе, "аффинность связывания" относится к условной константе связывания или  $K_A$ .  $K_A$  это противоположные константы диссоциации ( $K_D$ ). Соединения, которые описаны в данном документе, могут иметь аффинность связывания ( $K_D$ ) по меньшей мере  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-12}$  М или меньше для одного, или обоих целевых антигенов или антигенных эпитопов. Повышенная аффинность связывания соответствует уменьшенному  $K_D$ . В некоторых вариантах осуществления соединения, которые описаны в данном документе имеют аффинность связывания ( $K_D$ ) по меньшей мере  $10^{-11}$  М или меньше, для одного или обоих целевых антигенов или антигенных эпитопов. Высокая аффинность связывания соединения для первого антигена и второго антигена по отношению к третьему антигену может быть обозначена с помощью более высокой  $K_A$  (или меньшего числового значения  $K_D$ ) для связывания первого и второго антигена, чем  $K_A$  (или числового значения  $K_D$ ) для связывания третьего антигена. В таких случаях, соединение имеет специфичность к первому антигену и второму антигену (например, первому белку в первой конформации или ему подобному, и второму белку в первой конформации или ему подобному) по отношению к третьему антигену (например, тот же первый или второй белок во второй конформации или ему подобный, или третий белок). Отличие в аффинности связывания (например, по специфичности или другими показателями) может составлять по меньшей мере 1,5, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 37,5, 50, 70, 80, 91, 100, 500, 1000, 10000 или  $10^5$  раз.

Аффинность связывания (или специфичность связывания) может быть определена различными способами, в том числе равновесным связыванием, ELISA, поверхностным плазмонным резонансом, или спектроскопией (например, применяя флуоресцентный анализ). Типичными условиями для оценки аффинности связывания является HBS-P буфер (10 мМ HEPES pH 7,4, 150 мМ NaCl, 0,005% (об./об.) Surfactant P20). Данные методы могут быть применены для измерения концентрации связанного связывающего белка как функции концентрации целевого белка. Концентрация связанного связывающего белка, ([Bound]) зависит от концентрации свободного целевого белка ([Free]) и концентрации сайтов связывания для связывающего белка на цели, где (N) - число сайтов связывания на одну целевую молекулу, описывается следующим уравнением:

$$[\text{Bound}] = [\text{N}][\text{Free}]/(K_D + [\text{Free}])$$

Не всегда необходимо точно определять  $K_A$ , однако, так как иногда достаточно получить количественную оценку аффинности, например, рассчитанную с помощью такого способа, как ELISA или СКВФ (сортировка клеток с возбуждением флуоресценции, FACS) анализа, которая пропорциональна  $K_A$ , и, следовательно, может быть применена для сравнений, таких как: определение, является ли аффинность выше, например в 2 раза выше, для получения качественной оценки аффинности, или для того, чтобы предсказать аффинность, например, по активности в функциональном анализе, например, в анализах *in vitro* или *in vivo*.

В некоторых вариантах осуществления соединения содержит первый и второй полипептид, как определено в табл. 2А. В некоторых вариантах осуществления изобретения соединения содержит:

- (i) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; или
- (ii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; или
- (iii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; или
- (iv) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; или
- (v) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; или
- (vi) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; или
- (vii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; или
- (viii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; или
- (ix) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; или
- (x) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24; или
- (xi) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; или
- (xii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; или
- (xiii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30; или
- (xiv) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31,



и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32; или (xv) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34; или (xvi) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36; или (xvii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38; или (xviii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; или (xix) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42; или (xx) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44; или (xxi) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46; или (xxii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48; или (xxiii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50; или (xxiv) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52; или (xxv) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54; или (xxvi) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56; или (xxvii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58; или (xxviii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60; или (xxix) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; или (xxx) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64; или (xxxi) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66; или (xxxii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68.

Способы получения соединений, нуклеиновых кислот, векторов и клеток.

Аспекты раскрытия изобретения также включают нуклеиновые кислоты, кодирующие соединения, описанные в данном документе, или полипептиды, которые описаны в данном документе (например, первый или второй полипептиды, которые описаны в данном документе), которые могут быть закодированы вместе или по отдельности. Полинуклеотиды, кодирующие соединения, описанные в данном документе, или полипептиды, описанные в данном документе, могут быть получены, а нуклеотидные последовательности полинуклеотидов определены любым способом, известным в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержится в векторе, таком как вектор экспрессии. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит промотор, который функционально соединен с нуклеиновой кислотой.

Могут быть применены различные промоторы для экспрессии соединений, описанных в данном документе, или полипептидов, которые описаны в данном документе, которые включают, но не ограничиваются только этими: ранний промежуточный промотор цитомегаловируса (ЦМВ), вирусный LTR, такой как LTR вируса саркомы Рауса, HIV-LTR, HTLV-1 LTR, ранний промотор обезьяньего вируса 40 (SV40), лак промотор UV5 *E.coli* и промотор tk вируса простого герпеса.

Также могут быть использованы регулируемые промоторы. Такие регулируемые промоторы включают те, которые используют *lac* репрессор с *E.coli* как модулятор транскрипции для регулирования транскрипции с промоторов клеток млекопитающих, которые несут *lac* оператор [Brown M. et al., *Cell*, 49: 603-612 (1987)], и те, которые используют тетрациклиновый репрессор (tetR) [Gossen M., and Bujard H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5547-5551 (1992); Yao F. et al., *Human Gene Therapy*, 9: 1939-1950 (1998); Shockelt P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 6522-6526 (1995)]. Другие системы включают димер FK506, VP 16 или р65 с применением астрадиола, RU486, дифенол мурислерона, или рапамицина. Индукционные системы можно получить в Invitrogen, Clontech и Ariad.

Могут быть использованы регулируемые промоторы, которые содержат репрессор с опероном. В одном варианте реализации изобретения лак-репрессор с *Escherichia coli* может функционировать как

транскрипционный модулятор для того, чтобы регулировать транскрипцию через промоторы клеток млекопитающих, которые несут lac оператор [M. Brown et al., Cell, 49: 603-612 (1987)]; Госсен и Буджарт (1992) [M. Gossen et al., Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5547-5551 (1992)] объединили тетрациклиновый репрессор (tetR) с транскрипционным активатором (VP 16) для того, чтобы создать гибридный белок tetR-активатор транскрипции клетки млекопитающего, tTa (tetR-VP 16), с tetO-несущим минимальным промотором, полученным из главного промежуточного-раннего промотора цитомегаловируса человека (чЦМВ (hCMV)) для того, чтобы создать a tetR-tet операторную систему для контроля генной экспрессии в клетках млекопитающих. В одном варианте реализации изобретения, применяется индуцибельный тетрациклиновый переключатель (Yao et al., Human Gene Therapy; Gossen et al., Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5547-5551 (1992); Shockett et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 6522-6526 (1995)).

Дополнительно, вектор может содержать, например, некоторые или все из следующих: селективный маркерный ген, такой как ген неомидина, для селекции стабильных или временных трансфектантов в клетках млекопитающих; энхансерные/промоторные последовательности с немедленного раннего гена ЦМВ человека для высоких уровней транскрипции; сигналы терминации транскрипции и процессинга РНК с SV40 для стабильности мРНК; точки начала репликации SV40 и ColE1 для правильной эпизомальной репликации; внутренние сайты связывания рибосомы (BCCP), полилинкер; и РНК промоторы T7 и SP6 для *in vitro* транскрипции смысловой и антисмысловой РНК. Подходящие векторы и способы продуцирования векторов, содержащих трансгены хорошо известны и доступны в данной области техники.

Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, может быть перенесен в клетку-хозяина с помощью обычных методов (например, электропорации, липосомной трансфекции и преципитации с фосфатом кальция), и трансфицированные клетки затем культивируют с помощью общепринятых методов получения соединений, которые описаны в данном документе. В некоторых вариантах осуществления экспрессия соединений, описанных в данном документе, регулируется с помощью конститутивных, индуцибельных или ткань-специфических промоторов.

Клетки-хозяева, применяемые для экспрессии соединений, описанных в данном документе, или полипептидов, описанных в данном документе, могут быть как бактериальными клетками, так и клетками *Escherichia coli*, или, желателно, эукариотическими клетками. В частности, клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомячка (CHO), в сочетании с вектором, таким как основной промоторный элемент промежуточного раннего гена из человеческого цитомегаловируса, является эффективной системой экспрессии для иммуноглобулинов (Foelking et al. (1986) "Powerful And Versatile Enhancer-Promoter Unit For Mammalian Expression Vectors," Gene 45:101-106; Cockett et al. (1990) "High Level Expression Of Tissue Inhibitor Of Metalloproteinases In Chinese Hamster Ovary Cells Using Glutamine Synthetase Gene Amplification," Biotechnology 8:662-667).

Для экспрессии соединений, описанных в данном документе, или полипептидов, описанных в данном документе, может быть применено множество хозяин-экспрессирующих векторных систем. Такие хозяин-экспрессирующие системы представляют собой переносчики, с помощью которых кодирующие последовательности соединений, описанные в данном документе, или полипептиды, описанные в данном документе, могут быть продуцированы и впоследствии очищены, но также представляют собой клетки, которые могут, когда трансформированы или трансфицированы с помощью соответствующих кодирующих нуклеотидных последовательностей, экспрессировать соединения, описанные в данном документе, *in situ*. Они включают, но не ограничиваются только этими: микроорганизмы, такие как бактерии, (например, *E. coli* и *B. subtilis*) трансформированные рекомбинантными бактериофаговыми ДНК, плазмидными ДНК или космидными ДНК векторами экспрессии, содержащими кодирующие последовательности соединений, описанных в данном документе; дрожжи (например, *Saccharomyces pichia*), трансформированные рекомбинантными дрожжевыми векторами экспрессии, содержащими последовательности, кодирующие соединения, описанные в данном документе; клеточные системы насекомых, инфицированные рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, baculovirus), содержащими последовательности, кодирующие соединения, описанные в данном документе; клеточные системы растений, инфицированные рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, вирусом мозаики цветной капусты (CaMV) и вирусом табачной мозаики (VTM)) или трансформированные рекомбинантными плазмидными векторами экспрессии (например, Те плазмиды), содержащими последовательности, кодирующие молекулы соединений, описанных в данном документе; или клеточные системы млекопитающих (например, клетки COS, CHO, ВНК, 293, 293T, 3T3, лимфоцитарные клетки (см. патент США № 5807715), клетки Per C.6 (человеческие клетки сетчатки, разработанные Stucell) несущие рекомбинантные конструкции экспрессии, содержащие промоторы, полученные из генома клеток млекопитающих (например, промотора металотионеина) или вирусов млекопитающих (например, поздний аденовирусный промотор; промотор 7,5 К вируса осповакцины).

В бактериальных системах может быть с большим преимуществом отобран ряд векторов экспрессии в зависимости от применения, предназначенного для соединения, которое экспрессируется. Например, когда должно быть произведено большое количество такого белка, для получения фармацевтических композиций соединений, описанных в данном документе, могут быть желательными векторы, управляющие экспрессией высоких уровней легко очищаемых гибридных белковых продуктов. Такие

векторы включают, но не ограничиваются только этими: вектор экспрессии pUR278 *E. coli* (Ruther et al. (1983) "Easy Identification Of cDNA Clones," *EMBO J.* 2: 1791-1794), в котором кодирующая последовательность может быть лигирована отдельно в вектор в рамке с *lac Z* кодирующей областью, таким образом, что продуцируется гибридный белок; векторы pIN (Inouye et al. (1985) "Up-Promoter Mutations In The *lpp* Gene Of *Escherichia Coli*," *Nucleic Acids Res.* 13: 3101-3110; Van Heeke et al. (1989) "Expression Of Human Asparagine Synthetase In *Escherichia Coli*," *J. Biol. Chem.* 24: 5503-5509) и тому подобное. Могут также быть применены векторы pGEX для того, чтобы экспрессировать полипептиды как гибридные белки с глутатион S-трансферазой (GST). В общем, такие гибридные белки являются растворимыми и могут быть легко очищены с лизированных клеток путем адсорбции и связывания с матриксными глутатион-агарозными шариками, с последующим элюированием в присутствии свободного глутатиона. Векторы pGEX предназначены для включения тромбиновых или Ха протеазных сайтов расщепления, таким образом, клонированный целевой генный продукт может быть освобожден от GST-части.

В системах насекомых вирус ядерного полиэдроа *Autographa californica* (AcNPV) применяется в качестве вектора для экспрессии чужеродных генов. Вирус размножается в клетках *Spodoptera frugiperda*. Кодирующая последовательность может быть клонирована отдельно в несущественные области (например, ген полиедрина) вируса и размещена под контролем промотора AcNPV (например, промотором полиедрина).

В клетках-хозяевах млекопитающих может быть применен ряд систем экспрессии на основе вирусов. В тех случаях, когда аденовирус применяется как вектор экспрессии, кодирующая последовательность интереса может быть лигирована с комплексом контроля транскрипции/трансляции, например поздним промотором и трехсторонней лидерной последовательностью. Этот химерный ген может быть вставлен в геном аденовируса с помощью *in vitro* или *in vivo* рекомбинации. Вставка в несущественную область вирусного генома (например, область E1 или E3) приведет к получению рекомбинантного вируса, который является жизнеспособным и способным экспрессировать молекулу иммуноглобулина в инфицированных хозяевах (например, см. Logan et al. (1984) "Adenovirus Tripartite Leader Sequence Enhances Translation Of mRNAs Late After Infection," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3655-3659). Также могут потребоваться специфические сигналы инициации, для эффективной трансляции встроенных последовательностей, кодирующих антитело(a). Эти сигналы включают ATG иницирующий кодон и смежные последовательности. Кроме этого, кодон инициации должен быть в фазе с рамкой считывания желаемой кодирующей последовательности для того, чтобы обеспечить трансляцию всей вставки. Эти экзогенные сигналы контроля трансляции и кодоны инициации могут быть различного происхождения, как природного, так и синтетического. Эффективность экспрессии может быть увеличена путем включения соответствующих элементов транскрипции, энхансерных элементов, терминаторов транскрипции и т.д. (см. Bitter et al. (1987) "Expression And Secretion Vectors For Yeast," *Methods in Enzymol.* 153: 516-544).

Кроме этого, может быть избран штамм клетки-хозяина, который модулирует экспрессию вставленных последовательностей, или модифицирует и обрабатывает генный продукт желаемым специфическим образом. Такие модификации (например, гликозилирование) и обработка (например, расщепление) белковых продуктов могут быть важны для функции белка. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения соединения, которые описаны в данном документе, могут быть экспрессированы как один генный продукт (например, как единственная полипептидная цепь, то есть как полибелковый прекурсор), который требует протеолитического расщепления с помощью нативных или рекомбинантных клеточных механизмов для того, чтобы образовать отдельные полипептиды соединений, описанных в данном документе. Таким образом, раскрытие изобретения охватывает проектирование нуклеотидной последовательности для кодирования прекурсорной полибелковой молекулы, содержащей полипептиды соединений, описанных в данном документе, содержащей кодирующие последовательности, способные направлять пост-трансляционное расщепление указанного полибелкового прекурсора. Пост-трансляционное расщепление полибелкового прекурсора приводит к образованию полипептидов соединений, описанных в данном документе. Пост-трансляционное расщепление молекулы прекурсора, содержащей полипептиды соединений, описанных в данном документе, может происходить *in vivo* (то есть внутри клетки-хозяина с помощью нативных или рекомбинантных клеточных систем/механизмов, например фуринового расщепления в соответствующем сайте) или может происходить *in vitro* (например, инкубация указанной полипептидной цепи в композиции, содержащей протеазы или пептидазы с известной активностью, и/или в композиции, содержащей условия или реагенты, известные тем, что способствуют желаемой протеолитической активности). Очистка и модификация рекомбинантных белков хорошо известны в данной области техники, и таким образом дизайн полибелкового прекурсора может включать в себя ряд вариантов осуществления изобретения, которые легко могут быть распознаны квалифицированным специалистом. Любые известные протеазы или пептидазы, которые известны в данной области техники, могут быть применены для описанной модификации молекулы прекурсора, например тромбин или фактор Ха (Nagai et al. (1985) "Oxygen Binding Properties Of Human Mutant Hemoglobins Synthesized In *Escherichia Coli*," *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 82: 7252-7255, и их обзор выполнен в Jenny et al. (2003) "A Critical Review Of The Methods For Cleavage Of Fusion Proteins With Thrombin And Factor Xa," *Protein Expr. Purif* 31: 1-11, каждый из которых включен в данный документ в полном объеме посредством ссыл-

ки)), энтерокиназы (Collins-Racie et al. (1995) "Production Of Recombinant Bovine Enterokinase Catalytic Subunit In Escherichia Coli Using The Novel Secretory Fusion Partner DsbA," *Biotechnology* 13: 982-987 этим включен в данный документ в полном объеме посредством ссылки)), фурин, и AcTEV (Parks et al. (1994) "Release Of Proteins And Peptides From Fusion Proteins Using A Recombinant Plant Virus Proteinase," *Anal. Biochem.* 216: 413-417 этим включен в данный документ в полном объеме посредством ссылки)) и протеаза С3 яшура.

Различные клетки-хозяева имеют характерные и специфические механизмы посттрансляционного процессинга и модификации белков и генных продуктов. Могут быть выбраны соответствующие клеточные линии или хозяйские системы для обеспечения правильной модификации и процессинга чужеродного экспрессирующегося белка. С этой целью могут быть применены эукариотические клетки-хозяева, которые обладают клеточной машинерией для правильного процессинга первичного транскрипта, гликозилирования и фосфорилирования генного продукта. Такие клетки-хозяева млекопитающих включают, но не ограничиваются только этими: CHO, VERY, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 293T, 3T3, WI38, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 и T47D, CRL7030 и Hs578Bst.

Стабильная экспрессия является желательной для долгосрочного, высокоурожайного продуцирования рекомбинантных белков. Например, могут быть разработаны клеточные линии, стабильно экспрессирующие соединения, описанные в данном документе. Вместо того чтобы применять векторы экспрессии, содержащие вирусные точки начала репликации, клетки-хозяева могут быть трансформированы ДНК, что контролируется соответствующим контролирующими элементами экспрессии (например, промотор, энхансерные последовательности, терминаторы транскрипции, сайты полиаденилирования и т.д.), и маркером селекции. После введения чужеродной ДНК, спроектированным клеткам могут позволить расти в течение 1-2 дней в обогащенной среде, а затем их переключают на селективную среду. Маркер селекции в рекомбинантной плазмиде придает устойчивость к веществу, с помощью которого проводят отбор, и позволяет клеткам стабильно интегрировать плазмиду в их хромосомы и расти образуя очаги, которые, в свою очередь, могут быть клонированы и расширены в клеточные линии. Данный способ может быть с преимуществом использован для разработки клеточных линий, экспрессирующих соединения, описанные в данном документе. Такие сконструированные клеточные линии могут быть особенно полезными для скрининга и оценки соединений, взаимодействующих непосредственно или косвенно с соединениями, которые описаны в данном документе.

Может быть применен ряд систем отбора, включая, но не ограничиваясь только этими: ген тимидинкиназы вируса простого герпеса (Wigler et al. (1977) "Transfer Of Purified Herpes Virus Thymidine Kinase Gene To Cultured Mouse Cells," *Cell* 11: 223-232), ген гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансферазы (Szybalska et al. (1992) "Use Of The HPRT Gene And The HAT Selection Technique In DNA-Mediated Transformation Of Mammalian Cells First Steps Toward Developing Hybridoma Techniques And Gene Therapy," *Bioessays* 14: 495-500), и ген аденин фосфорибозилтрансферазы (Fowey et al. (1980) "Isolation Of Transforming DNA: Cloning The Hamster aprt Gene," *Cell* 22: 817-823) могут быть применены в tk-, hprt- или aprt- клетках, соответственно. Кроме того, антиметаболитная устойчивость может быть использована в качестве основы отбора для следующих генов: dhfr, придающий устойчивость к метотрексату (Wigler et al. (1980) "Transformation Of Mammalian Cells With An Amplifiable Dominant-Acting Gene," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 3567-3570; O'Hare et al. (1981) "Transformation Of Mouse Fibroblasts To Methotrexate Resistance By A Recombinant Plasmid Expressing A Prokaryotic Dihydrofolate Reductase," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 1527-1531); gpt, придающий устойчивость к микофеноловой кислоте (Mulligan et al. (1981) "Selection For Animal Cells That Express The Escherichia coli Gene Coding For Xanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 2072-2076); neo, придающий устойчивость к аминогликозиду G-418 (Tolstoshev (1993) "Gene Therapy, Concepts, Current Trials And Future Directions," *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 573-596; Mulligan (1993), "The Basic Science Of Gene Therapy," *Science* 260: 926-932; и Morgan et al. (1993), "Human Gene Therapy," *Ann. Rev. Biochem.* 62: 191-217) и hygro, придающий устойчивость к гиромоцину (Santerre et al. (1984) "Expression Of Prokaryotic Genes For Hygromycin B And G418 Resistance As Dominant-Selection Markers In Mouse L Cells," *Gene* 30: 147-156). Способы, широко известные в данной области рекомбинантной ДНК технологии, и которые могут быть применены, описаны в Ausubel et al. (Eds.), 1993, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY; Krieglner, 1990, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY; and in Chapters 12 and 13 Dracopoli et al. (Eds), 1994, *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY; Colberre-Garapin et al. (1981) "A New Dominant Hybrid Selective Marker for Higher Eukaryotic Cells," *J. Mol. Biol.* 150: 1-14.

Уровни экспрессии соединений, описанных в данном документе, или полипептидов, описанных в данном документе, могут быть увеличены с помощью вектора амплификации (для ознакомления см. Bebbington and Hentschel, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, Vol. 3 (Academic Press, New York, 1987). Когда маркер в векторной системе, экспрессирующей соединение, описанное в данном документе, может быть амплифицирован, увеличение уровня ингибитора, присутствующего в культуре клетки-хозяина позволит увеличить количество копий маркерного гена. Поскольку область амплификации связана с нуклеотидной последовательностью соединения, описанного в данном документе, или полипептида, описанного в данном документе,

производство полипептида также возрастет (Crouse et al. (1983) "Expression And Amplification Of Engineered Mouse Dihydrofolate Reductase Minigenes," Mol. Cell. Biol. 3: 257-266).

Клетка-хозяин может быть совместно трансфицирована двумя векторами экспрессии, первым вектором, кодирующим первый полипептид соединения, которое описано в данном документе, и вторым вектором, кодирующим второй полипептид соединения, которое описано в данном документе. Два вектора могут содержать идентичные маркеры селекции, делающие возможным одинаковую экспрессию обоих полипептидов. В альтернативном варианте, может быть применен единственный вектор, кодирующий оба полипептиды. Кодированные последовательности полипептидов соединений, описанных в данном документе, могут содержать кДНК или геномную ДНК.

Как только соединение, описанное в данном документе, или полипептид, описанный в данном документе, было (был) рекомбинантно экспрессировано(о), он(оно) может быть очищен(о) любым способом, известным в данной области техники для очистки полипептидов, полибелков или антител (например, аналогичный схемам очистки антител, основанным на антигенной селективности), например, хроматографией (например, ионообменной, аффинной, в частности аффинной к специфическому антигену (при необходимости после отбора при помощи белка А, где соединение содержит Fc домен (или его часть)), и эксклюзионной хроматографией), центрифугированием, дифференциальной растворимостью, или любым другим стандартным методом для очистки полипептидов или антител.

Другие аспекты изобретения связаны с клеткой, содержащей нуклеиновую кислоту, описанную в данном документе, или вектор, описанный в данном документе. Клетка может быть прокариотической или эукариотической клеткой. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка является клеткой млекопитающего. Приведенные в качестве примера типы клеток описаны в данном документе.

Еще другие аспекты изобретения связаны с способом продуцирования соединения, описанного в данном документе, или полипептида, описанного в данном документе (например, первого полипептида или второго полипептида), способом, включающим получение клеток, описанных в данном документе, и экспрессию нуклеиновой кислоты, описанной в данном документе, в указанной клетке. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ дополнительно включает выделение и очистку соединения, описанного в данном документе, или полипептида, описанного в данном документе.

Способы лечения и композиций для применения в медицине.

Другие аспекты раскрытия изобретения связаны со способами лечения и композициями для применения в медицине. Не ограничивающими примерами соединений, для применения в таких способах, и композиции являются те, что содержат:

- (i) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; или
- (ii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; или
- (iii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; или
- (iv) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; или
- (v) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; или
- (vi) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; или
- (vii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; или
- (viii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; или
- (ix) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; или
- (x) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24; или
- (xi) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; или
- (xii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; или
- (xiii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30; или
- (xiv) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32; или
- (xv) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34; или
- (xvi) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35,

и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36; или (xvii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38; или (xviii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; или (xix) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42; или (xx) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44; или (xxi) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46; или (xxii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48; или (xxiii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50; или (xxiv) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52; или (xxv) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54; или (xxvi) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56; или (xxvii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58; или (xxviii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60; или (xxix) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; или (xxx) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64; или (xxxi) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66; или (xxxii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68.

В некоторых вариантах осуществления способ лечения или применение является способом лечения аутоиммунного или воспалительного заболевания, или применением в таком способе. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение соединения, описанного в данном документе, или фармацевтической композиции, содержащей указанное соединение, субъекту, например, субъекту, который имеет или находится под риском приобрести аутоиммунное или воспалительное заболевание.

Субъект, подвергающийся лечению с помощью способов, описанных в данном документе, может быть млекопитающим, более желательно человеком. Млекопитающие включают, но не ограничены только этими: сельскохозяйственных животных, спортивных животных, домашних животных, приматов, лошадей, собак, кошек, мышей и крыс. Человеческий субъект, требующий лечения, может быть человеческим субъектом, имеющим, или находящимся под риском приобрести заболевание, или у него подозревают наличие заболевания. Субъект, имеющий заболевания, может быть обнаружен с помощью обычного медицинского осмотра, например физического обследования, лабораторного тестирования, функциональной проверки органа, КТ сканирование или УЗИ. Субъект, который подозревается в наличии любого такого заболевания, может демонстрировать один или несколько симптомов заболевания. Признаки и симптомы заболеваний, например аутоиммунных и воспалительных заболеваний, хорошо известны специалистам в данной области техники. Субъект с риском приобретения заболевания может быть субъектом, имеющим один или более факторов риска данного заболевания.

Не ограничивающие примеры аутоиммунных заболеваний включают волчаночный нефрит (ВН (LN)) (системная красная волчанка (СКВ (SLE)) с поражением почек), системную красную волчанку (СКВ (SLE)), первичный синдром Шегрена (ПСШ (pSS)), болезнь Шегрена, болезнь "трансплантат против хозяина" (БТПХ) (например, хроническая болезнь "трансплантат против хозяина" (ХБТПХ (cGVHD))), системный склероз (СС (SSc)), ассоциированный с антинейтрофильным цитоплазматическим антителом (АНЦА (ANCA)) васкулит (ААВ (AAV)), ревматоидный артрит, псориаз, диабет 1 типа, системную красную волчанку, отторжение трансплантата, аутоиммунное заболевание щитовидной железы (болезнь Хашимото), саркоидоз, склеродермию, гранулематозный васкулит, болезнь Крона, неспецифический язвенный колит, болезнь Шегрена, анкилозирующий спондилоартрит, псориазический артрит, полимиозит дерматомиозит, узелковый периартериит, иммунологически-опосредованное пузырчатое заболевание кожи, синдром Бехчета, рассеянный склероз, системную склеродермию, болезнь Гудпасчера, или иммунологически-опосредованный гломерулонефрит.

Не ограничивающие примеры воспалительных заболеваний включают ревматоидный артрит, системную красную волчанку, очаговую алопецию, анколизующий спондилит, антифосфолипидный синдром, аутоиммунную болезнь Аддисона, аутоиммунную гемолитическую анемию, аутоиммунный гепатит, аутоиммунное заболевание внутреннего уха, аутоиммунный лимфопрлиферативный синдром (АЛПС), аутоиммунную тромбоцитопеническую пурпуру (АТП), болезнь Бехчета, буллезный пемфигид, кардиомиопатию, брюшной спру дерматит, синдром хронической усталости, иммунодефицит (CFIDS), хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию, рубцовый пемфигус, холодовую лектиновую болезнь, синдром Тибержа-Вейсенбаха, болезнь Крона, болезнь Дего, дерматомиозит, ювенильный дерматомиозит, дискоидную волчанку, существенную смешанную криоглобулинемию, фибромиалго-фибромиозит, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре, тиреодит Хашимото, идиопатический легочный фиброз, болезнь Верльгофа (ИТП), IgA нефропатию, инсулинозависимый сахарный диабет (тип I), инсулин-зависимый диабет (тип I), ювенильный артрит, болезнь Меньера, смешанное заболевание соединительной ткани, рассеянный склероз, миастению, пузырчатку обычную, пернициозную анемию, узелковый периартериит, полихондрит, пльоригландулярные синдромы, ревматическую полимиалгию, полимиозит и дерматомиозит, первичную агаммаглобулинемию, первичный билиарный цирроз печени, псориаз, феномен Рейно, синдром Рейтера, ревматическую лихорадку, саркоидоз, склеродермию, синдром Шегрена, синдром мышечной скованности, артериит Такаясу, височный артериит/гигантоклеточный артериит, неспецифический язвенный колит, увеит, васкулит, витилиго, и гранулематоз Вегенера. В некоторых вариантах осуществления аутоиммунное или воспалительное заболевание является болезнью Крона, анкилозирующим спондилитом или псориазическим артритом.

Чтобы практиковать способ, описанный в данном документе, эффективное количество соединения или фармацевтической композиции, что описаны в данном документе, может быть введено субъекту (например, человеку), что требует лечения. Известны различные системы доставки и могут применяться для введения соединений данной технологии. Способы введения включают, но не ограничиваются только этими: внутрикожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и оральный пути. Соединения данной технологии можно вводить, например, путем инфузии, боллуса или инъекции, и их можно вводить вместе с другими биологически активными агентами, такими как противовоспалительные средства. Введение может быть системным или местным. В желаемых вариантах реализации изобретения, введение выполняют подкожной инъекцией. Лекарственное средство для подобных инъекций может быть приготовлено в, например, предварительно заполненных шприцах, которые можно вводить один раз каждые две недели.

"Эффективное количество", как применяется в данном документе, относится к количеству каждого соединения, которое необходимо, чтобы предоставить терапевтический эффект субъекту, либо самостоятельно, либо в комбинации с одним или более другими соединениями. Эффективные количества могут быть разными, как определено специалистами в данной области техники, в зависимости от конкретного состояния, подлежащего лечению, тяжести состояния, индивидуальных параметров субъекта, включая возраст, физическое состояние, размер, пол, вес, продолжительность лечения, характер сопутствующей терапии (если таковая имеется), конкретный путь введения и подобные факторы, которые находятся в пределах знаний и опыта врача. Эти факторы являются хорошо известными специалистам в данной области техники и могут быть обнаружены с помощью не более чем рутинных экспериментов. Желательно, в целом, как правило, чтобы применялась максимальная доза отдельных компонентов или их комбинаций, то есть, самая высокая безопасная доза с медицинской точки зрения. Специалистам в данной области техники будет понятно, что субъект может настаивать на более низкой дозе или допустимой дозе по медицинским причинам, психологических причинам или по любым другим причинам.

Эмпирические факторы, такие как период полувыведения, как правило, будут способствовать определению дозировки. Например, соединения, совместимые с иммунной системой человека, такие как соединения содержащие области с гуманизованных антител или полностью человеческих антител, могут быть применены, чтобы продлить период полувыведения соединения и предотвратить, чтобы соединение было атаковано иммунной системой хозяина. Частота введения может быть определена и скорректирована в ходе лечения, обычно, но не обязательно, основанная на лечении и/или угнетении и/или улучшении и/или замедлении заболевания. В альтернативном варианте могут быть целесообразными лекарственные препараты с непрерывным замедленным высвобождением соединения. В данной области техники известны различные лекарственные формы и устройства для достижения замедленного высвобождения.

В некоторых вариантах осуществления дозировка происходит ежедневно, каждые два дня, каждые три дня, каждые четыре дня, каждые пять дней, или каждые шесть дней. В некоторых вариантах осуществления частота дозирования составляет раз в неделю, каждые 2 недели, каждые 4 недели, каждые 5 недель, каждые 6 недель, каждые 7 недель, каждые 8 недель, каждые 9 недель, или 10 недель, или раз в месяц, каждые 2 месяца или каждые 3 месяца или дольше. Прогресс данной терапии можно легко контролировать с помощью обычных методов и анализов. Режим дозирования (в том числе применяемых соединений) может изменяться с течением времени.

В некоторых вариантах осуществления взрослому субъекту с нормальным весом могут быть введе-

ны дозы, которые варьируют от около 0,01 до 1000 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления доза составляет от 1 до 200 мг. Конкретная схема приема лекарственного средства, то есть доза, время и повторение, будет зависеть от конкретного субъекта и истории болезни этого субъекта, а также от свойств соединения (например, периода полувыведения соединения и других факторов, которые хорошо известны специалистам в данной области техники).

В контексте данного изобретения, соответствующая доза соединения, как описано в данном документе, будет зависеть от конкретного вовлеченного соединения (или композиции на его основе), состава и пути введения, типа и тяжести заболевания, от того соединение вводится с профилактическими или лечебными целями, предшествующей терапии, клинической истории субъекта и ответы на антагонист, и по усмотрению лечащего врача. Как правило, врач будет управлять введением соединения до тех пор, пока не будет достигнута установленная доза, позволяющая достичь желаемого результата. Введение одного или более соединений может быть непрерывными или периодическим, в зависимости, например, от физиологического состояния реципиента, в зависимости от того цель введения является терапевтической или профилактической, так и других факторов, известных опытным специалистам. Введение соединения может быть по сути непрерывным в течение заранее выбранного периода времени или может быть разбито на ряд разделенных промежутками времени доз, например до, во время или после проявления заболевания.

Как применяется в настоящем документе, термин "лечение" относится к применению или введению соединения, или композиции, содержащей соединение, субъекту, имеющему заболевание, симптомы заболевания или предрасположенность к заболеванию, с целью вылечить, заживить, смягчить, облегчить, изменить, исправить, улучшить или повлиять на болезнь, симптом заболевания или предрасположенность к заболеванию.

Облегчение заболевания включает в себя замедление развития или прогрессирования заболевания или снижения тяжести заболевания. Облегчение болезни не обязательно требует лечебных результатов. Как применяется в настоящем документе, "замедлить" развитие заболевания означает задержать, помешать, замедлить, стабилизировать и/или отсрочить прогрессирование заболевания. Данное замедление может быть различной продолжительности в зависимости от истории болезни и/или лиц, которых лечат. Способ "замедление" или облегчения развития заболевания, или задержки начала заболевания - это способ, который снижает вероятность развития одного или более симптомов заболевания в данный конкретный период времени и/или снижает степень симптомов в течение определенного периода времени, по сравнению с ситуацией, когда способ не применяется. Такие сравнения обычно основаны на клинических исследованиях с использованием ряда субъектов, достаточного для получения статистически значимого результата.

"Развитие" или "прогрессирование" заболевания означает начальные проявления и/или последующее прогрессирование заболевания. Развитие заболевания может быть обнаружено и оценено с помощью стандартных клинических методов, которые хорошо известны в данной области техники. Однако, развитие также относится к прогрессированию, что может быть незаметным. Для целей настоящего раскрытия изобретения развитие или прогрессирование относится к биологическому течению симптомов. "Развитие" включает в себя возникновение, рецидив и начало. Как применяется в настоящем документе, "начало" или "возникновения" болезни включает первоначальное начало и/или рецидив.

В некоторых вариантах осуществления соединения, описанное в данном документе, вводят субъекту, который нуждается в лечении, в объеме, достаточном для ингибирования активности одного, или обоих ФАВЛ (BAFF) или ИЛ23А минимум на 20% (например, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% или более) *in vivo* или *in vitro*. Способы определения ингибирующей способности соединения известны в данной области техники. Приведенные в качестве примера анализы ингибирования ФАВЛ (BAFF) или ИЛ23А предлагаются в примерах.

Общепринятые способы, известные специалистам в данной области медицины, могут быть применены для введения соединения или фармацевтической композиции субъекту в зависимости от типа заболевания, которое будет лечиться, или места заболевания. Данная композиция также может быть введена с помощью других общепринятых путей, например введена перорально, парентерально, путем вдыхания спрея, местно, ректально, назально, трансбуккально, вагинально или через имплантированный резервуар. Термин "парентерально", как применяется в данном документе, включает подкожное, внутрисуставное, внутривенное, внутримышечное, внутрисуставное, внутриартериальное, внутрисиновиальное введение, введение в полость позвоночного канала, введение в очаг поражения и внутрочерепной впрыск или инфузионные методы. Кроме этого, она может быть введена субъекту путем введения вещества медленного всасывания, как применяют 1-, 3- или 6-месячные вещества медленного всасывания или биоразлагаемые материалы и способы.

Фармацевтические композиции.

Еще другие аспекты раскрытия изобретения связаны с фармацевтической композицией, содержащей соединение, описанное в данном документе. Композиция, содержащая соединение рассматриваемой технологии (например, соединение, которое является специфическим как к ФАВЛ (BAFF), так и ИЛ23А), может быть введена субъекту, имеющему или находящемуся под риском приобрести аутоиммунное или





(ххix) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; или (ххх) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64; или (ххxi) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66; или (ххxii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, и указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68.

Как применяется в настоящем документе, термин "фармацевтическая композиция" относится в составу соединения, описанного в данном документе, в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем. Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать дополнительные вещества (например, для специфической доставки, увеличение периода полувыведения, или другие терапевтические соединения).

Как применяется в настоящем документе, термин "фармацевтически приемлемый носитель" означает фармацевтически приемлемое вещество, композицию или переносчик, такие как жидкий или твердый наполнитель, растворитель, наполнитель, вспомогательные вещества (например, смазывающее вещество, тальк, стеарат кальция или цинка, или стеариновая кислота), или материал для инкапсулирования растворителя, которые участвуют в переносе или транспортировке соединения с одного участка тела (например, участки введения), в другой участок (например, орган, ткань или часть тела). Фармацевтически приемлемый носитель является "приемлемым" в смысле совместимости с другими компонентами лекарственного средства и не вредит тканям субъекта (например, является физиологически совместимым, стерильным, имеет физиологический pH и т.д.). Некоторые примеры веществ, которые могут служить в качестве фармацевтически-приемлемых носителей, включают: 1) сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; 2) крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; 3) целлюлозу и ее производные, такие как натрий карбоксиметилцеллюлоза, метилцеллюлоза, этилцеллюлоза, микрокристаллическая целлюлоза и ацетат целлюлозы; 4) порошкообразный трагакант; 5) солод; 6) желатин; 7) смазочные вещества, такие как магния стеарат, лаурилсульфат натрия и тальк; 8) наполнители, такие как масло какао и воски суппозитория; 9) масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; 10) гликоли, такие как пропиленгликоль; 11) полиолы, такие как глицерин, сорбит, манит и полиэтиленгликоль (ПЭГ); 12) сложные эфиры, такие как этил-олеат и этил-лауринат; 13) агар; 14) буферные вещества, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; 15) альгиновую кислоту; 16) апирогенную воду; 17) изотонический физиологический раствор; 18) раствор Рингера; 19) этиловый спирт; 20) растворы с забуференным pH; 21) полиэфиры, поликарбонаты и/или полиангидриды; 22) объемосоздающие вещества, такие как полипептиды и аминокислоты; 23) компонент сыворотки, такой как сывороточный альбумин, ЛПВП и ЛПНП; 24) C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> спирты, такие как этанол; и 25) другие нетоксичные совместимые вещества, применяемые в фармацевтических лекарственных препаратах. Также в состав могут входить: смачивающие вещества, окрашивающие вещества, антиадгезивы, покрывающие вещества, подсластители, вкусовые добавки, ароматизаторы, консерванты и антиоксиданты. Такие термины, как "наполнитель", "носитель", "фармацевтически приемлемый носитель" или подобные применяются как взаимозаменяемые в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления соединения рассматриваемой технологии в композиции вводят путем инъекции, с помощью катетера, с помощью суппозитория или с помощью имплантата, при этом имплантат может быть пористым, непористым, или желеобразным веществом, включая мембрану, такую как резиновая мембрана или волокно. Как правило, при введении композиции используют материалы, на которых соединение исследуемой технологии не абсорбируется.

В других вариантах осуществления соединения данной технологии поставляются в системе с контролируемым высвобождением. В одном варианте реализации изобретения может быть применен насос (см., например, Langer, 1990, Science 249: 1527-1533; Sefton, 1989, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14: 201; Buchwald et al., 1980, Surgery 88: 507; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321: 574). В другом варианте реализации изобретения могут быть использованы полимерные материалы. (См., например, Medical Applications of Controlled Release (Langer and Wise eds., CRC Press, Boca Raton, Fla., 1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance (Smolen and Ball eds., Wiley, New York, 1984); Ranger and Peppas, 1983, Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61. See also Levy et al., 1985, Science 228: 190; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25: 351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71: 105). Другие системы контролируемого высвобождения обсуждаются, например, в Langer, выше.

Соединения исследуемой технологии можно вводить в виде фармацевтических композиций, содержащих терапевтически эффективное количество связывающего агента, и одного или нескольких фармацевтически совместимых ингредиентов.

В типичных вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция изготовлена в соответствии с рутинными процедурами в качестве фармацевтической композиции, адаптированной для внутривенного или подкожного введения субъекту, например, человеку. Как правило, композиции для введения путем инъекций представляют собой растворы в стерильном изотоническом водном буфере. В

случае необходимости, фармкомпозиция также может содержать вещество, которое повышает растворимость, и местный анестетик, такой как лидокаин, для облегчения боли в месте инъекции. В целом, как правило, компоненты поставляются либо отдельно, либо в смеси в дозированном виде, например, в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметично закрытом контейнере, таком как ампула или сашет, с указанием количества активного вещества. Когда фармкомпозиция должна быть введена вливанием, она может быть приготовлена в виде флакона для вливания, содержащего стерильную фармацевтически чистую воду или физиологический раствор. Когда фармкомпозицию вводят с помощью инъекции, может быть предоставлена ампула со стерильной водой для инъекций или физиологическим раствором, таким образом компоненты могут быть смешаны перед введением.

Фармацевтическая композиция для системного введения может быть жидкостью, например стерильным физиологическим раствором, раствором Рингера с лактозой или раствором Хэнка. Кроме этого, фармацевтическая композиция может быть в твердой форме, и повторно растворена или ресуспендирована сразу перед применением. Также рассматриваются лиофилизированные формы.

Фармацевтическая композиция может содержать внутри липидных частиц или везикул, таких как липосомы или микрокристаллы, которые также подходят для парентерального введения. Частицы могут иметь любую подходящую структуру, например, однослойную или многослойную, если только композиции содержатся в них. Соединения могут быть захваченными в стабилизированные плазмидлипидные частицы (СПЛЧ), которые содержат липид слияния диолеоилфосфатидилэтаноламин (ДОФЕ), низкие уровни (5-10 мл%) катионного липида, и которые стабилизированы с помощью полиэтиленгликолевого (ПЭГ) покрытия (Zhang Y.P. et al., *Gene Ther.* 1999, 6: 1438-47). Положительно заряженные липиды, такие как N-[1-(2,3-диолеоилокси)пропил]-N,N,N-триметиламонийметилсульфат, или "ДОТАП," особенно желательны для таких частиц и везикул. Приготовление таких липидных частиц является хорошо известным. См., например, патенты США № 4880635; 4906477; 4911928; 4917951; 4920016 и 4921757.

Фармацевтические композиции данного изобретения могут быть введены или упакованы, например, в качестве однократной дозы. Термин "однократная доза", когда применяется по отношению к фармацевтической композиции данного раскрытия изобретения, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичного дозирования для субъекта, каждая единица содержит заданное количество активного вещества, рассчитанное для создания желаемого терапевтического эффекта, в сочетании с необходимым растворителем, например, носителем или переносчиком.

В некоторых вариантах осуществления соединение, описанное в данном документе, может быть соединено с терапевтической частью, например противовоспалительным средством. Методы для соединения таких терапевтических частей с полипептидами, включая, например, Fc домены, хорошо известны; см. например, Amon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (Eds.), 1985, pp. 243-56, Alan R. Liss, Inc.); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery (2nd Ed.)*, Robinson et al. (Eds.), 1987, pp. 623-53, Marcel Dekker, Inc.); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (Eds.), 1985, pp. 475-506) "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (Eds.), 1985, pp. 303-16, Academic Press; и Thorpe et al. (1982) "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates," *Immunol. Rev.*, 62: 119-158.

Дополнительно, фармацевтическая композиция может быть предложена в качестве фармацевтического набора, который содержит: а) контейнер, содержащий соединение по настоящему изобретению в лиофилизированной форме; и б) второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый растворитель (например, стерильную воду) для инъекций. Фармацевтически приемлемый растворитель может быть применен для восстановления или разведения лиофилизированного соединения рассматриваемой технологии. При необходимости, к такому контейнеру(рам) может быть присоединено сообщение в форме, определенной правительственным агентством, регулирующим производство, применение или продажу фармацевтических, или биологических продуктов, для которых сообщение отражает одобрение органом производства, применения или продажи для введения человеку.

В другом аспекте реализации изобретения включено промышленное изделие, содержащее материалы, полезные для лечения описанных выше заболеваний. В некоторых вариантах осуществления промышленное изделие содержит контейнер и этикетку. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы и пробирки. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик. В некоторых вариантах осуществления контейнер содержит композицию, которая является эффективной при лечении заболеваний, описанных в данном документе, и может иметь стерильный порт доступа. Например, контейнер может представлять собой пакет для внутривенного раствора или флакон, имеющий пробку, которая пробивается иглой для подкожных инъекций. Активное вещество в композиции представляет собой соединение по данной технологии. В некоторых вариантах осуществления этикетка на контейнере, или которая присоединена к контейнеру, указывает, что композиция применяется для лечения заболевания по выбору. Промышленное изделие может дополнительно содержать второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как фосфатно-

солевой буферный раствор, раствор Рингера или раствор глюкозы. Оно может дополнительно содержать другие материалы, желательные с коммерческой точки зрения пользователя, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и вкладыши с инструкцией по применению.

Не вдаваясь в подробности, считается, что специалист в данной области техники, опираясь на приведенное выше описание изобретения, использует данное раскрытие изобретения в полном объеме. Вследствие этого, следующие конкретные варианты осуществления рассматриваться только как иллюстративные, а не как такие, что ограничивают остальное раскрытие изобретения в любой форме. Все публикации, цитируемые в данном документе, включены путем ссылки для целей или объекта изобретения, которые упоминаются в данном документе.

#### **Примеры**

Пример 1. Конструирование иллюстративных соединений, нацеленных на ИЛ23А и ФАВЛ (BAFF).

Соединения данной технологии получали рекомбинантными методами, известными в данной области техники (см., например, публикации РСТ WO 2006/113665, WO 2008/157379 и WO 2010/080538, содержание которых включено в настоящее в данный документ посредством ссылки). В табл. 2А приведены иллюстративные соединения, которые связываются как с ИЛ23А, так и с ФАВЛ (BAFF), используемыми в примерах ниже. Если коротко, плазмиды, кодирующие первый и второй полипептиды для каждого соединения, были трансфицированы вместе в клетки CHO-S, применяя FreeStyle MAX Reagent (CHO). Клетки культивировали в течение 13-14 дней, и соединения, которые были продуцированы клетками, очищали, используя Белок-А хроматографию. Соединения были дополнительно очищены с помощью эксклюзионной хроматографии.

Таблица 2А. Иллюстративные соединения, связывающие ИЛ23А и ФАВЛ (BAFF)

Идентификатор соединения	vL большой цепи	vH большой цепи	vL малой цепи	vH малой цепи	3-й и/или 4-й типы линкера	Изотип константного домена	SEQ ID NO: (1-й/2-й полипептиды)
Соединение E	ФАВЛ (BAFF) (1) VL (SEQ ID NO:2)	ИЛ23А(1) VH (SEQ ID NO:3)	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO:4)	ФАВЛ (BAFF) (1) VH (SEQ ID NO:1)	LGGGSG (SEQ ID NO:70)	IgG1KO-YTE (SEQ ID NO:128)	5/6
Соединение V	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO:4)	ФАВЛ (BAFF)(1) VH (SEQ ID NO:1)	ФАВЛ (BAFF) (1) VL (SEQ ID NO:2)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO:3)	LGGGSG (SEQ ID NO:70)	IgG1KO-YTE (SEQ ID NO:128)	7/8
Соединение U	ФАВЛ (BAFF) (1) VL (SEQ ID NO:2)	ИЛ23А(1) VH (SEQ ID NO:3)	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO:4)	ФАВЛ (BAFF) (1) VH (SEQ ID NO:1)	Е(С-1) (SEQ ID NO:82), К-спираль (С-1) (SEQ ID NO:83)	Fc-IgG1KO-YTE (SEQ ID NO:129)	9/10
Соединение Т	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO:4)	ФАВЛ (BAFF)(1) VH (SEQ ID NO:1)	ФАВЛ (BAFF) (1) VL (SEQ ID NO:2)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO:3)	Е(С-1) (SEQ ID NO:82), К-спираль(С-1) (SEQ ID NO:83)	Fc-IgG1KO-YTE (SEQ ID NO:129)	11/12
Соединение Х	ФАВЛ (BAFF) (1) VL (SEQ ID NO:2)	ИЛ23А(1) VH (SEQ ID NO:3)	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO:4)	ФАВЛ (BAFF) (1) VH (SEQ ID NO:1)	LGGGSG (SEQ ID NO: 70)	IgG4-Pro-YTE (SEQ ID NO: 74)	13/14
Соединение F	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO:4)	ФАВЛ (BAFF)(1) VH (SEQ ID NO:1)	ФАВЛ (BAFF) (1) VL (SEQ ID NO:2)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO:3)	LGGGSG (SEQ ID NO: 70)	IgG4-Pro-YTE (SEQ ID NO: 74)	15/16
Соединение W	ФАВЛ (BAFF) (1) VL (SEQ ID NO:2)	ИЛ23А(1) VH (SEQ ID NO:3)	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO:4)	ФАВЛ (BAFF) (1) VH (SEQ ID NO:1)	Е(С-1) (SEQ ID NO:82), К-спираль(С-1) (SEQ ID NO:83)	Fc-IgG4-Pro-YTE (SEQ ID NO:127)	17/18
Соединение S	ИЛ23А(1) VL (SEQ ID NO:4)	ФАВЛ (BAFF)(1) VH (SEQ ID NO:1)	ФАВЛ (BAFF) (1) VL (SEQ ID NO:2)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO:3)	Е(С-1) (SEQ ID NO:82), К-спираль(С-1) (SEQ ID NO:83)	Fc-IgG4-Pro-YTE (SEQ ID NO:127)	19/20
Соединение G	ИЛ23А(1) VL (SEQ ID NO:4)	ФАВЛ (BAFF) (4) VH	ФАВЛ (BAFF) (4) VL	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID	LGGGSG (SEQ ID NO: 70)	IgG1KO-YTE (SEQ ID	21/22

		(SEQ ID NO:84)	(SEQ ID NO: 85)	NO:3)		NO:128)	
Соединение AA	ИЛ23А(1) VL (SEQ ID NO:4)	ФАВЛ (BAFF) (4) VH (SEQ ID NO:84)	ФАВЛ (BAFF) (4) VL (SEQ ID NO: 85)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO:3)	Е(С-1) (SEQ ID NO:82), К-спираль(С-1) (SEQ ID NO:83)	Fc-IgG1КО-YTE (SEQ ID NO:129)	23/24
Соединение I	ИЛ23А(1) VL (SEQ ID NO:4)	ФАВЛ (BAFF) (4) VH (SEQ ID NO:84)	ФАВЛ (BAFF) (4) VL (SEQ ID NO: 85)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO:3)	LGGGSG (SEQ ID NO: 70)	IgG4-Pro-YTE (SEQ ID NO: 74)	25/26
Соединение АВ	ИЛ23А(1) VL (SEQ ID NO:4)	ФАВЛ (BAFF) (4) VH (SEQ ID NO:84)	ФАВЛ (BAFF) (4) VL (SEQ ID NO: 85)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO:3)	Е(С-1) (SEQ ID NO:82), К-спираль (С-1) (SEQ ID NO:83)	Fc-IgG1КО-YTE (SEQ ID NO:129)	27/28
Соединение К	ИЛ23А(1) VL (SEQ ID NO:4)	ФАВЛ (BAFF) (5) VH (SEQ ID NO:86)	ФАВЛ (BAFF) (5) VL (SEQ ID NO:87)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO:3)	LGGGSG (SEQ ID NO: 70)	IgG1КО-YTE (SEQ ID NO:128)	29/30
Соединение АС	ИЛ23А(1) VL (SEQ ID NO:4)	ФАВЛ (BAFF) (5) VH (SEQ ID NO:86)	ФАВЛ (BAFF) (5) VL (SEQ ID NO:87)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO:3)	Е(С-1) (SEQ ID NO:82), К-спираль (С-1) (SEQ ID NO:83)	Fc-IgG1КО-YTE (SEQ ID NO:129)	31/32
Соединение М	ИЛ23А(1) VL (SEQ ID NO:4)	ФАВЛ (BAFF) (5) VH (SEQ ID NO:86)	ФАВЛ (BAFF) (5) VL (SEQ ID NO:87)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO:3)	LGGGSG (SEQ ID NO: 70)	IgG4-Pro-YTE (SEQ ID NO: 74)	33/34
Соединение AD	ИЛ23А(1) VL (SEQ ID NO:4)	ФАВЛ (BAFF) (5) VH (SEQ ID NO:86)	ФАВЛ (BAFF) (5) VL (SEQ ID NO:87)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO:3)	Е(С-1) (SEQ ID NO:82), К-спираль (С-1) (SEQ ID NO:83)	Fc-IgG4-Pro-YTE (SEQ ID NO:127)	35/36
Соединение С	ИЛ23А(1) VL (SEQ ID NO:4)	ФАВЛ (BAFF) (6) VH (SEQ ID NO:88)	ФАВЛ (BAFF) (6) VL (SEQ ID NO:89)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO:3)	LGGGSG (SEQ ID NO: 70)	IgG1КО-YTE (SEQ ID NO:128)	37/38
Соединение АЕ	ИЛ23А(1) VL (SEQ ID NO:4)	ФАВЛ (BAFF) (6) VH (SEQ ID NO:88)	ФАВЛ (BAFF) (6) VL (SEQ ID NO:89)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO:3)	Е(С-1) (SEQ ID NO:82), К-спираль(С-1) (SEQ ID NO:83)	Fc-IgG1КО-YTE (SEQ ID NO:129)	39/40

Соединение D	ИЛ23А(1) VL (SEQ ID NO:4)	ФABЛ (BAFF) (6) VH (SEQ ID NO:88)	ФABЛ (BAFF) (6) VL (SEQ ID NO:89)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO:3)	LGGGSG (SEQ ID NO: 70)	IgG4-Pro- YTE (SEQ ID NO: 74)	41/42
Соединение AF	ИЛ23А(1) VL (SEQ ID NO:4)	ФABЛ (BAFF) (6) VH (SEQ ID NO:88)	ФABЛ (BAFF) (6) VL (SEQ ID NO:89)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO:3)	E(C-1) (SEQ ID NO:82), К- спираль( C-1) (SEQ ID NO:83)	Fc-IgG4- Pro-YTE (SEQ ID NO:127)	43/44
Соединение A	ИЛ23А(1) VL (SEQ ID NO:4)	ФABЛ (BAFF) (7) VH (SEQ ID NO:90)	ФABЛ (BAFF) (7) VL (SEQ ID NO:91)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO:3)	LGGGSG (SEQ ID NO: 70)	IgG1KO- YTE (SEQ ID NO:128)	45/46
Соединение AG	ИЛ23А(1) VL (SEQ ID NO:4)	ФABЛ (BAFF) (7) VH (SEQ ID NO:90)	ФABЛ (BAFF) (7) VL (SEQ ID NO:91)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO:3)	E(C-1) (SEQ ID NO:82), К- спираль( C-1) (SEQ ID NO:83)	Fc- IgG1KO- YTE (SEQ ID NO:129)	47/48
Соединение B	ИЛ23А(1) VL (SEQ ID NO:4)	ФABЛ (BAFF) (7) VH (SEQ ID NO:90)	ФABЛ (BAFF) (7) VL (SEQ ID NO:91)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO:3)	LGGGSG (SEQ ID NO: 70)	IgG4-Pro- YTE (SEQ ID NO:74)	49/50
Соединение AH	ИЛ23А(1) VL (SEQ ID NO:4)	ФABЛ (BAFF) (7) VH (SEQ ID NO:90)	ФABЛ (BAFF) (7) VL (SEQ ID NO:91)	ИЛ23А (1) VH (SEQ ID NO:3)	E(C-1) (SEQ ID NO:82), К- спираль( C-1) (SEQ ID NO:83)	Fc-IgG4- Pro-YTE (SEQ ID NO:127)	51/52
Соединение H	ФABЛ (BAFF) (4) VL (SEQ ID NO:85)	ИЛ23А(1) VH (SEQ ID NO:3)	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO:4)	ФABЛ (BAFF) (4) VH (SEQ ID NO:84)	LGGGSG (SEQ ID NO: 70)	IgG1KO- YTE (SEQ ID NO:128)	53/54
Соединение J	ФABЛ (BAFF) (4) VL (SEQ ID NO: 85)	ИЛ23А(1) VH (SEQ ID NO:3)	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO:4)	ФABЛ (BAFF) (4) VH (SEQ ID NO:84)	LGGGSG (SEQ ID NO: 70)	IgG4-Pro- YTE (SEQ ID NO:74)	55/56
Соединение L	ФABЛ (BAFF) (5) VL (SEQ ID NO:87)	ИЛ23А(1) VH (SEQ ID NO:3)	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO:4)	ФABЛ (BAFF) (5) VH (SEQ ID NO:86)	LGGGSG (SEQ ID NO: 70)	IgG1KO- YTE (SEQ ID NO:128)	57/58
Соединение N	ФABЛ (BAFF) (5) VL (SEQ ID NO:87)	ИЛ23А(1) VH (SEQ ID NO:3)	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO:4)	ФABЛ (BAFF) (5) VH (SEQ ID NO:86)	LGGGSG (SEQ ID NO: 70)	IgG4-Pro- YTE (SEQ ID NO:74)	59/60
Соединение O	ФABЛ (BAFF) (6) VL	ИЛ23А(1) VH (SEQ ID NO:3)	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID	ФABЛ (BAFF) (6) VH	LGGGSG (SEQ ID NO: 70)	IgG1KO- YTE (SEQ ID	61/62

	(SEQ ID NO:89)		NO:4)	(SEQ ID NO:88)		NO:128)	
Соединение P	ФАВЛ (BAFF) (6) VL (SEQ ID NO:89)	ИЛ23А(1) VH (SEQ ID NO:3)	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO:4)	ФАВЛ (BAFF) (6) VH (SEQ ID NO:88)	LGGGSG (SEQ ID NO: 70)	IgG4-Pro-YTE (SEQ ID NO:74)	63/64
Соединение Q	ФАВЛ (BAFF) (7) VL (SEQ ID NO:91)	ИЛ23А(1) VH (SEQ ID NO:3)	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO:4)	ФАВЛ (BAFF) (7) VH (SEQ ID NO:90)	LGGGSG (SEQ ID NO: 70)	IgG1KO-YTE (SEQ ID NO:128)	65/66
Соединение R	ФАВЛ (BAFF) (7) VL (SEQ ID NO:91)	ИЛ23А(1) VH (SEQ ID NO:3)	ИЛ23А (1) VL (SEQ ID NO:4)	ФАВЛ (BAFF) (7) VH (SEQ ID NO:90)	LGGGSG (SEQ ID NO: 70)	IgG4-Pro-YTE (SEQ ID NO:74)	67/68

VL - вариабельный домен легкой цепи, VH - вариабельный домен тяжелой цепи, каждая цепь содержит линкер GGGSGGG (SEQ ID NO: 69) между VL и VH.

Контрольные антитела также были применены для целей сравнения. Контролем служили моноклональные антитела, нацеленные или на ФАВЛ (BAFF) или на ИЛ23.

Таблица 2В. Контрольные антитела/антагонист

Контрольные соединения	Последовательность
Контрольное антитело 1 (моноклональное антитело к ФАВЛ (BAFF)) (ФАВЛ (BAFF) (1))	ФАВЛ (BAFF)(1) VH (SEQ ID NO:1)   ФАВЛ (BAFF)(1) VL (SEQ ID NO:2)
Контрольный гибридный белок антагонист 2 (селективный антагонист ФАВЛ (BAFF) без антитела) (ФАВЛ (BAFF) (2))	ФАВЛ (BAFF)(2) (SEQ ID NO:131)
Контрольное антитело 3 (моноклональное антитело к ФАВЛ (BAFF)) (ФАВЛ (BAFF) (3))	ФАВЛ (BAFF)(3) VH (SEQ ID NO:132)   ФАВЛ (BAFF)(3) VL (SEQ ID NO:133)
Контрольное антитело 4 (моноклональное антитело к ИЛ-23А) (ИЛ-23А (1))	ИЛ23А(1) VH (SEQ ID NO:3)   ИЛ23А(1) VL (SEQ ID NO:4)

Пример 2. Термическая стабильность соединений.

Способы.

Отслеживали термическое разворачивания и агрегацию 2 мг/мл растворов соединений в фосфатном буфере от 20 до 110°C при темпе сканирования 60°C/ч с помощью автоматического капиллярного дифференциального сканирующего калориметра (ДСК) (MicroCal, LLC, Бостон). Было выполнено два сканирования с соответствующим буфером для того, чтобы настроить термическую историю прибора и получить базовую линию для каждого образца, при этом среднее этих сканирований вычитается из следующей белковой термограммы для получения настоящей теплоемкости.

Нормированные результаты сканирования впоследствии анализировали с помощью Origin 7.0. Базовые линии до начала перехода отнимали для каждой результирующей термограммы теплоемкости для того, чтобы получить результирующую избыточную теплоемкость (Cp, ex) как функцию от температуры. Указанные значения температур перехода (Тм) представляют позиции пиковых максимумов, определенных при визуальном осмотре экспериментальных термограмм.

Результаты.

Результаты приведены в табл. 3. Данные показывают, что иллюстративные соединения, нацеленные на ИЛ23А и ФАВЛ (BAFF), имеют диапазон температур перехода для первого пика (Т<sub>ml</sub>), варьирующий от 51,59 до 71,25°C. Результаты являются неожиданными, поскольку иллюстративные соединения все имеют одинаковую общую структуру и содержат те же генные последовательности VH и VL, нацеленные на ИЛ-23А. Соединения с более высокими температурами перехода более стабильны и, как ожидается, имеют длительный срок хранения.



Таблица 3. Температуры перехода теплового разворачивания для соединений

Идентификатор соединения	T <sub>m1</sub> (°C)	T <sub>m2</sub> (°C)
Соединение А	69,35	83,63
Соединение В	65,87	--
Соединение С	67,89	82,36
Соединение D	64,93	--
Соединение E	51,59	68,8
Соединение F	52,75	64,48
Соединение G	70,88	83,21
Соединение H	71,25	83,62
Соединение I	67,83	--
Соединение J	68,26	--
Соединение K	68,33	83,23
Соединение L	68,3	82,58
Соединение M	64,98	--
Соединение N	65,52	--
Соединение O	67,79	83,85
Соединение P	65,09	--
Соединение Q	69,19	81,9
Соединение R	65,97	--
Соединение X	52,36	64,53

Пример 3. Поверхностный плазмонный резонанс (НИР) аффинности иллюстративных соединений.

Тестируемые соединения были проанализированы с помощью НИР, чтобы определить сродство к ФАВЛ (BAFF) и ИЛ23А.

Материалы и способы.

НИР эксперименты были выполнены на приборе ProteOn XPR36 (Bio Rad). GLM-чип был предварительно обработан с помощью последовательных впрыскиваний 60 с 0,5% ДСН (додецилсульфат натрия, SDS), 50 мМ раствора NaOH, и 100 мМ HCl при скорости потока 30 мкл/мин как в вертикальном, так и в горизонтальном направлениях. Предварительно обработанный GLM-чип был активирован с помощью впрыскивания смеси EDC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид) (76,7 мг/мл) и сулфо-NHS (N-гидроксисульфосукцинимид) (21,7 мг/мл) с соотношением 1:1 в 6 горизонтальных каналов. IgG коза-анти-человек (GANA) Fc  $\gamma$  (Invitrogen) в концентрации 30 мкг/мл в 10 мМ, pH 5,0 натрий-ацетатном буфере был иммобилизован до 8,000 резонансных единиц на активированном GLM чипе в 6 горизонтальных каналах. Чип был окончательно деактивирован с помощью 1М этаноламин-HCl в 6 горизонтальных каналах. Подготовленный чип GANA был возвращен в вертикальное положение для захвата исследуемых соединений по 5 вертикальным каналам, и последний канал был использован в качестве референсной колонки.

Чип захвата был снова размещен в горизонтальной плоскости для связывания. Связанный человеческий ИЛ-23 (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc) в пяти концентрациях, 10,0, 5,00, 2,50, 1,25 и 0,625 нМ, был введен горизонтально по поверхности исследуемых соединений в течение 10 мин со скоростью потока 40 мкл/мин в следующем буфере пробег (Bio Rad): фосфатно-солевой буфер (pH 7,4), 0,005% Tween 20. Была разрешена диссоциация в течение 2 ч. Поверхность GANA была восстановлена с помощью короткого импульсного впрыска (18 с) 0,85% фосфорной кислоты (Bio Rad) при скорости потока 100 мкл/мин в горизонтальном и вертикальном направлениях после 10 мин ассоциации и 2 ч диссоциации. Восстановленный GANA был готов к еще одному циклу связывания. Связывание соединений с ИЛ23 яванского макака, ФАВЛ (BAFF) человека или ФАВЛ (BAFF) яванского макака проводили аналогичным образом, но концентрации титрования для связывания с ФАВЛ (BAFF) человека или ФАВЛ (BAFF) яванского макака составляли 6,25, 3,12, 1,56, 0,78 и 0,39 нМ.

Результаты.

Результаты в табл. 4 показывают, что оба исследуемых соединения были способны связывать ФАВЛ (BAFF) и ИЛ23 с константой диссоциации ( $K_d$ ) в пикомолярном диапазоне.

Таблица 4. Аффинность соединений, связывающихся с ФАВЛ (BAFF) и ИЛ23

Идентификатор соединения	$K_d$ для ФАВЛ (BAFF) человека (пМ)	$K_d$ для ФАВЛ (BAFF) яванского макака (пМ)	$K_d$ для ИЛ23 человека (пМ)	$K_d$ для ИЛ23 яванского макака (пМ)
Соединение А	меньше чем 15	меньше чем 15	меньше чем 15	меньше чем 15
Соединение В	меньше чем 15	меньше чем 15	меньше чем 15	меньше чем 15
Соединение С	меньше чем 15	меньше чем 15	меньше чем 15	меньше чем 15
Соединение D	меньше чем 15	меньше чем 15	меньше чем 15	меньше чем 15
Соединение E	меньше чем 15	меньше чем 15	меньше чем 15	меньше чем 15
Соединение F	меньше чем 15	меньше чем 15	меньше чем 15	меньше чем 15

Пример 4. Ингибирование активации NF $\kappa$ B, индуцированной тримером ФАВЛ (BAFF) человека или яванского макака в клетках ФАВЛР (BAFFRVCHO с люциферазным репортером).

Материалы/способы.

Вкратце, человеческие клетки NF $\kappa$ B CHO ФАВЛР (BAFFR) с люциферазным репортером собирали, промывали, подсчитывали и ресуспендировали до концентрации  $1,6 \times 10^6$  клеток на мл в аналитической среде (AM) (об./об.) 1% пенициллина/стрептомицина в X-VIV015, химически определённой бессывороточной среде (Lonza). Рекombинантный тример ФАВЛ (BAFF) человека или яванского макака (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc.) был приготовлен при одной концентрации (52 пМ) в AM и предварительно инкубирован с AM отдельно, или с последовательными титрованиями испытуемого соединения в течение 30 мин при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в инкубаторе с увлажнением. После предварительной инкубации ФАВЛ (BAFF) плюс испытуемое соединение, 50 мкл смеси(ей) добавляли к 50 мкл клеток и тестовую плашку дополнительно инкубировали при 37°C (как описано) в течение 24 ч. Контрольные образцы получали или AM (нестимулированные контроли), или рекombинантный тример ФАВЛ (BAFF), разведенный в AM (стимулированные контроли). После 24-часовой инкубации клеточную суспензию обрабатывали 100 мкл STEADY-Glo реагента (Promega), следуя инструкциям производителя, и анализировали на экспрессию люциферазы. Результирующие "Относительные единицы люминесценции" (ОЕЛ) были нанесены на график против Log 10 наномолярной концентрации тестируемого соединения, причем значения IC<sub>50</sub> и IC<sub>90</sub> были рассчитаны с применением 4-параметрической логистической модели, поддерживаемой надстройкой Excel Xlfit (ID Business Solutions Limited). Значения IC<sub>50</sub> и IC<sub>90</sub> тестируемого соединения рассчитывали, как описано выше, и геометрические средние были рассчитаны в нескольких экспериментах, и показаны в табл. 5 и 6.

Результаты.

Тестируемые соединения зависимым от дозы образом ингибировали активацию NF $\kappa$ B, индуцированную тримером ФАВЛ (BAFF) человека или яванского макака в клетках ФАВЛР (BAFFR)-CHO с люциферазным репортером. Результаты, проиллюстрированные в табл. 5 и 6, показывают, что геометрические средние значения IC<sub>50</sub> и IC<sub>90</sub> для тестируемых соединений были сопоставимыми или более высокими, чем для контрольных антагонистов ФАВЛ (BAFF).

Таблица 5. Геометрические средние значения IC<sub>50</sub> и IC<sub>90</sub> для ингибирования тримера ФАВЛ (BAFF) человека в репортерных клетках ФАВЛР (BAFFR)-CHO

Идентификатор соединения	IC <sub>50</sub> (пМ)	IC <sub>90</sub> (пМ)
Соединение А	43	180
Соединение В	39	256
Соединение С	35	110
Соединение D	34	172
Соединение F	72	293
Соединение O	27	119
Соединение P	19	88
Соединение Q	26	108
Соединение R	30	139
Соединение X	106	361
Контрольное антитело 1 (ФАВЛ (BAFF) (1))	232	743
Контрольный гибридный белок антагонист 2 (ФАВЛ (BAFF) (2))	173	914
Контрольное антитело 3 (ФАВЛ (BAFF) (3))	70	417

Таблица 6. Геометрические средние значения IC<sub>50</sub> и IC<sub>90</sub> для ингибирования тримера ФАВЛ (BAFF) яванского макака в ФАВЛР (BAFFR)-СНО репортерных клетках

Идентификатор соединения	IC <sub>50</sub> Геометрическое среднее пМ	IC <sub>90</sub> Геометрическое среднее пМ
Соединение А	132	191
Соединение В	132	295
Соединение D	118	248
Контрольное антитело 1 (ФАВЛ (BAFF) (1))	288	635
Контрольный гибридный белок антагонист 2 (ФАВЛ (BAFF) (2))	602	1089
Контрольное антитело 3 (ФАВЛ (BAFF) (3))	257	588

Пример 5. Ингибирование активации NFκB, индуцированной тримером ФАВЛ (BAFF) человека в клетках ТАЦИ (TACI)-СНО с люциферазным репортером.

Материалы/способы.

Вкратце, человеческие клетки NFκB СНО ТАЦИ (TACI) с люциферазным репортером собирали, промывали, подсчитывали и ресуспендировали до концентрации  $1,6 \times 10^6$  клеток на мл в аналитической среде (AM) (об./об.) 1% пенициллина/стрептомицина в X-VIV015, химически определённой бессывороточной среде (Lonza). Рекombинантный тример ФАВЛ (BAFF) человека (Boynringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc.) был приготовлен при одной концентрации (222 пМ) в AM и предварительно инкубирован с AM отдельно, или с последовательными титрованиями испытуемого соединения в течение 30 минут при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в инкубаторе с увлажнением. После предварительной инкубации ФАВЛ (BAFF) плюс испытуемое соединение, 50 мкл смеси(ей) добавляли к 50 мкл клеток и тестовую плашку дополнительно инкубировали при 37°C (как описано) в течение 24 ч. Контрольные образцы получали либо AM (нестимулированные контроли), либо рекombинантный тример ФАВЛ (BAFF) человека, разведенный в AM (стимулированные контроли). После 24-часовой инкубации клеточную суспензию обрабатывали 100 мкл реагента STEADY-Glo (Promega), следуя инструкциям производителя, и анализировали на экспрессию люциферазы. Результирующие "Относительные единицы люминесценции" (ОЕЛ) были нанесены на график против Log<sub>10</sub> наномолярной концентрации тестируемого соединения, причем значения IC<sub>50</sub> и IC<sub>90</sub> были рассчитаны с применением 4-параметрической логистической модели, поддерживаемой надстройкой Excel Xlfit (ID Business Solutions Limited). Значения IC<sub>50</sub> и IC<sub>90</sub> тестируемого соединения рассчитывали, как описано выше, и геометрические средние были рассчитаны в нескольких экспериментах, и показаны в табл. 7.

Результаты.

Тестируемые соединения зависимым от дозы образом ингибировали активацию NFκB, индуцированную тримером ФАВЛ (BAFF) человека в клетках ТАЦИ (TACI)-СНО с люциферазным репортером. Результаты, проиллюстрированные в табл. 7, показывают, что геометрические средние значения IC<sub>50</sub> и IC<sub>90</sub> для тестируемого соединения были сопоставимыми или более высокими, чем для контрольных антагонистов ФАВЛ (BAFF).

Таблица 7. Геометрические средние значения IC<sub>50</sub> и IC<sub>90</sub> для ингибирования тримера ФАВЛ (BAFF) человека в репортерных клетках ТАЦИ (TACI)-СНО

Идентификатор соединения	IC <sub>50</sub> Геометрическое среднее пМ	IC <sub>90</sub> Геометрическое среднее пМ
Соединение А	159	417
Соединение В	159	510
Соединение D	163	436
Контрольное антитело 1 (ФАВЛ (BAFF) (1))	273	576
Контрольный гибридный белок антагонист 2 (ФАВЛ (BAFF) (2))	829	1945
Контрольное антитело 3 (ФАВЛ (BAFF) (3))	241	618

Пример 6. Ингибирование активации NFκB, индуцированной 60-мером ФАВЛ (BAFF) в клетках ФАВЛР (BAFFR)-СНО с люциферазным репортером.

Материалы/способы.

Вкратце, человеческие клетки NFκB СНО ФАВЛР (BAFFR) с люциферазным репортером собирали, промывали, подсчитывали и ресуспендировали до концентрации  $1,6 \times 10^6$  клеток на мл в аналитической среде (AC (AM)) (об./об.) 1% пенициллина/стрептомицина в X-VIV015, химически определённой бессывороточной среде (Lonza). Рекombинантный 60-мер ФАВЛ (BAFF) человека (Boynringer Ingelheim Phar-

maceuticals, Inc.) был приготовлен при одной концентрации (4,2 пМ) в АС (АМ) и предварительно инкубирован с АС (АМ) отдельно, или с последовательными титрованиями испытуемого соединения в течение 30 мин при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в инкубаторе с увлажнением. После предварительной инкубации ФАВЛ (BAFF) плюс испытуемое соединение, 50 мкл смеси(ей) добавляли к 50 мкл клеток и тестовую плашку дополнительно инкубировали при 37°C (как описано) в течение 24 ч. Контрольные образцы получали или АС (АМ) (нестимулированные контроли), или рекомбинантный человеческий 60-мер ФАВЛ (BAFF), разбавленный в АС (АМ) (стимулированные контроли). После 24-часовой инкубации клеточную суспензию обрабатывали 100 мкл реагента STEADY-Glo (Promega), следуя инструкциям производителя, и анализировали на экспрессию люциферазы. Результирующие относительные единицы люминесценции (ОЕЛ) были нанесены на график против Log<sub>10</sub> наномолярной концентрации тестируемого соединения, причем значения IC<sub>50</sub> и IC<sub>90</sub> были рассчитаны с применением 4-параметрической логистической модели, поддерживаемой надстройкой Excel Xlfit (ID Business Solutions Limited). Значения IC<sub>50</sub> и IC<sub>90</sub> тестируемого соединения рассчитывали, как описано выше, и геометрические средние были рассчитаны в нескольких экспериментах, и показаны в табл. 8.

Результаты.

Тестируемые соединения зависимым от дозы образом ингибировали активацию NFκB, индуцированную 60-мером ФАВЛ (BAFF) человека в клетках ФАВЛР (BAFFR)-СНО с люциферазным репортером. Результаты, проиллюстрированные в табл. 8, показывают, что геометрические средние значения IC<sub>50</sub> и IC<sub>90</sub> для тестируемых соединений А, В, С, D, O, P, Q и R были более высокими, чем для контрольных антагонистов ФАВЛ (BAFF).

Таблица 8. Геометрические средние значения IC<sub>50</sub> и IC<sub>90</sub> для ингибирования 60-мера ФАВЛ (BAFF) человека в репортерных клетках ФАВЛР (BAFFR)-СНО

Идентификатор соединения	IC <sub>50</sub> (пМ)	IC <sub>90</sub> (пМ)
Соединение А	6	19
Соединение В	6	17
Соединение С	6	14
Соединение D	4	12
Соединение F	1300	7388
Соединение O	5	6
Соединение P	2	9
Соединение Q	5	13
Соединение R	5	16
Соединение X	1555	6839
Контрольное антитело 1 (ФАВЛ (BAFF) (1))	24075	180053
Контрольный гибридный белок антагонист 2 (ФАВЛ (BAFF) (2))	43	107
Контрольное антитело 3 (ФАВЛ (BAFF) (3))	15	38

Пример 7. Нейтрализация активации NFκB, индуцированной связанным с мембраной ФАВЛ (BAFF) в клетках ФАВЛР (BAFFR)-СНО с люциферазным репортером.

Материалы/способы.

Клетки СНО-К1, экспрессирующие ФАВЛ (BAFF) человека, подсчитывали и ресуспендировали до концентрации 2×10<sup>6</sup> клеток на мл в стандартной ростовой среде. Чтобы остановить расщепление связанного с мембраной ФАВЛ (BAFF), клетки обрабатывали 0,125% параформальдегидом (Electron Microscopy) и инкубировали при комнатной температуре в течение одного часа. Зафиксированные клетки человека ФАВЛ (BAFF) СНО-К1 затем промывали и ресуспендировали до 2×10<sup>6</sup> клеток на мл в стандартной ростовой среде и инкубировали в течение ночи при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Затем, зафиксированные человеческие клетки ФАВЛ (BAFF) СНО-К1 собирали и ресуспендировали до концентрации 3,2×10<sup>6</sup> клеток на мл в X-VIV015, химически определённой бессывороточной аналитической среде (Lonza) (АС (АМ)), содержащей 1% пенициллина/стрептомицина (об./об.).

Человеческие клетки NFκB СНО ФАВЛР (BAFFR) с люциферазным репортером собирали, промывали и ресуспендировали до концентрации 1,6×10<sup>6</sup> клеток на мл в аналитической среде. Зафиксированные человеческие клетки ФАВЛ (BAFF) СНО-К1, приготовленные до 3,2×10<sup>6</sup> клеток на мл в АС (АМ), и предварительно проинкубированные с последовательными титрованиями тестируемых соединений в течение 30 мин, затем добавляли к 50 мкл клеток NFκB СНО ФАВЛР (BAFFR) человека с люциферазным репортером и дополнительно инкубировали при 37°C в течение 24 ч. Контрольные репортерные клетки получали либо только АС (АМ) (нестимулированные контроли), либо зафиксированные человеческие клетки ФАВЛ (BAFF) СНО-К1, разведенные в АС (АМ) (стимулированные контроли). После 24-

часовой инкубации образцы обрабатывали 100 мкл реагента STEADY-Glo (Promega) и анализировали на экспрессию люциферазы. Относительные единицы люминесценции (ОЕЛ) были нанесены на график против Log 10 наномолярной концентрации тестируемых соединений, причем значения IC<sub>50</sub> и IC<sub>90</sub> были рассчитаны с применением 4-параметрической логистической модели, поддерживаемой надстройкой Excel Xlfit (ID Business Solutions Limited). Значения IC<sub>50</sub> и IC<sub>90</sub> тестируемых соединений рассчитывали, как описано выше, и геометрические средние были рассчитаны в нескольких экспериментах, и показаны в табл. 9.

Результаты.

Тестируемые соединения зависимым от дозы образом ингибировали активацию NFκB, индуцированную связанным с мембраной человеческим ФАВЛ (BAFF) в клетках ФАВЛР (BAFFR)-СНО с люциферазным репортером. Результаты, проиллюстрированные в табл. 9, показывают, что значения IC<sub>50</sub> и IC<sub>90</sub> для тестируемых соединений были более высокими, чем для всех трех контрольных антагонистов ФАВЛ (BAFF).

Таблица 9. Геометрические средние значения IC<sub>50</sub> и IC<sub>90</sub> для ингибирования связанного с мембраной ФАВЛ (BAFF) в репортерных клетках ФАВЛР (BAFFR)-СНО

Идентификатор соединения	IC <sub>50</sub> (нМ)	IC <sub>90</sub> (нМ)
Соединение А	118	1015
Соединение В	125	1139
Соединение D	104	938
Контрольное антитело 1 (ФАВЛ (BAFF) (1))	553	10116
Контрольный гибридный белок антагонист 2 (ФАВЛ (BAFF) (2))	581	3678
Контрольное антитело 3 (ФАВЛ (BAFF) (3))	250	2916

Пример 8. Ингибирование активности ИЛ-23 человека в лимфоцитах В-лимфоцитов (клетки DB) с STAT3-люциферазным репортером.

Материалы/способы.

Лимфоциты В-лимфоцитов (клетки DB, ATCC каталожный номер CRL-2289) были стабильно трансдуцированы ленти-вирусным STAT-3/люциферазным репортерным геном (Qiagen). Трансдуцированные клетки удерживали под селекцией с использованием пурамицина (Life Technologies). Полной культуральной средой была среда RPMI-1640 (Life Technologies), дополненная 10% ФБС (фетальная бычья сыворотка) (Hyclone) и 2 мкг/мл пурамицина (Life Technologies). Аналитической средой была среда RPMI-1640 (Life Technologies), дополненная 10% ФБС (Hyclone).

Сконструированные клетки DB-STAT3 высевали в количестве 20000 клеток/лунка, в 96-луночную белую плашку с плоским дном, в 80 мкл/лунка аналитической среды. Тестируемые соединения (10×) готовили в полипропиленовых 96-луночных плашках с округлым дном в аналитической среде, и разбавляли соответственно для достижения диапазонов доз от 1 мкг/мл до 10 пг/мл. 10 мкл разбавленных тестируемых молекул или аналитической среды (для контрольных лунок) добавляли в каждую лунку в трех повторностях. В каждую лунку добавляли 10 мкл 10-кратного человеческого ИЛ-23 (до конечной концентрации 75 нг/мл на плашку). В альтернативном варианте, 10 мкл среды добавляли в контрольные лунки. Доза ИЛ-23, выбранная для применения в анализе, представляет собой стимулирующую дозу EC<sub>60</sub> ИЛ-23 человека для сконструированных клеток DB, как определено в предыдущих исследованиях. Планшеты инкубировали в течение ночи при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>. Был приготовлен реагент ONE-Glo™ (Promega) для люциферазного анализа, и было добавлено 100 мкл в каждую лунку, и перемешано. Люминесценцию измеряли на считывателе плашек Envision, а затем наносили на график (ось y) по отношению к концентрации антител (ось x). Значения IC<sub>50</sub> соединений определяли путем применения данных к сигмоидальной дозозависимой функции с 4 параметрами, с применением программного обеспечения GraphPad Prism 6. Значения IC<sub>90</sub> определяли путем вычисления данных с помощью Find ECanything с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 6. Геометрические средние были рассчитаны в нескольких экспериментах, и показаны в табл. 10.

Результаты.

Результаты показали, что тестируемые соединения способны ингибировать активность ИЛ-23 человека в клетках DB с STAT3-люциферазным репортером.

Таблица 10. Геометрические средние значения IC<sub>50</sub> и IC<sub>90</sub> для ингибирования ИЛ-23 человека в лимфоцитах В-клеток

Идентификатор соединения	IC <sub>50</sub> (пМ)	IC <sub>90</sub> (пМ)
Соединение А	145	1229
Соединение В	161	1101
Соединение С	189	2330
Соединение D	128	3087
Контрольное антитело 4 (ИЛ-23А (1))	79	634

Пример 9. Ингибирование активности ИЛ-23 человека и яванского макака в спленоцитах мыши.

Материалы и способы.

Мононуклеарные клетки с мышинных селезенок (самки мышей C57BL/6 в возрасте менее 13 недель; Jackson Laboratories) были выделены, промыты, подсчитаны и ресуспендированы до  $4 \times 10^6$  клеток/мл в стандартной среде для Т-лимфоцитов (ТКС). 100 мкл суспензии мИЛ-2/спленоцитов добавляли в 96-луночные плашки для микротитрования. Рекомбинантный человеческий ИЛ-23 (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc.) или рекомбинантный ИЛ-23 яванского макака (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc.) разводили в ТКС (ТСМ) (среда для культивирования тканей) и предварительно инкубировали в течение 2 ч при температуре 37°C только в ТКС, или с титрованиями исследуемых образцов. После предварительной инкубации исследуемого образца плюс ИЛ-23, 100 мкл смеси добавляли к клеткам и тестовые плашки инкубировали при 37°C с 5% CO<sub>2</sub>-увлажненным воздухом в течение 48 ч. Контрольные образцы получали либо ТКС (не стимулированные контроли), либо рекомбинантный ИЛ-23 разведенный в ТКС (стимулированные контроли). После инкубации уровни мышинового ИЛ-17 определяли из супернатанта применяя Quantikine® Mouse ИЛ-17 Immunoassay согласно инструкции производителя (R&D Systems). Интерполированные значения мИЛ17 пг/мл были определены для каждого образца и конвертированы в процент от контроля (ПОК). ПОК был нанесен на график в зависимости от концентрации исследуемого образца, и были рассчитаны значения IC<sub>90</sub>, применяя 4 Parameter Logistic Model, которая была доступна через Excel XLfit (Activity Base software, ID Business Solutions, Ltd.). Исследуемые соединения были проанализированы с учетом IC<sub>50</sub> и IC<sub>90</sub>, как описано выше, и средние геометрические были рассчитаны по нескольким экспериментам для каждого исследуемого образца, и приведены в табл. 11.

Результаты.

Результаты показывают, что исследуемые соединения были способны подавлять высвобождение ИЛ-17 с мышинных спленоцитов, которое было индуцировано ИЛ23 человека или яванского макака.

Таблица 11. Геометрические средние значения IC<sub>50</sub> и IC<sub>90</sub> для ингибирования ИЛ-23 человека в лимфоцитах В-клеток

Идентификатор соединения	ИЛ23 человека		ИЛ23 яванского макака	
	IC <sub>50</sub> (пМ)	IC <sub>90</sub> (пМ)	IC <sub>50</sub> (пМ)	IC <sub>90</sub> (пМ)
Соединение А	146	1647	155	1309
Соединение В	202	1360	200	1480
Соединение С	133	761	110	880
Соединение D	105	1700	97	1554
Контрольное антитело 4 (ИЛ-23А (1))	84	366	64	331

Пример 10. Фармакокинетика соединений в яванского макака.

Материалы и способы.

ФК-исследования единичных внутривенных (ВВ (IV)) доз для тестируемых соединений А, В, С и D проводили на самцах яванского макака (n равно 2 для каждой молекулы). Дозы вводили в виде медленной болюсной ВВ (IV) инъекции, составляющей 1 мг/кг. Образцы цельной крови собирали перед дозой, и 0,25, 2 и 6 ч после дозы в день дозирования, и 1, 2, 3, 4, 7, 10, 14, 21 и 28 дней после дозирования. Концентрацию дозированных молекул в сыворотке измеряли с помощью анализа связывания лиганда на основе MSD.

Образцы стандартной калибровочной кривой и контроля качества (КК (QC)) были приготовлены в 100% объединенной сыворотке яванского макака. Каждая стандартная кривая состояла из семи ненулевых точек, начиная с 512 нг/мл, которые затем последовательно разбавляли в 3 раза. Также был включен пустой образец (матрица без исследуемого образца). Были подготовлены четыре образца КК (QC) в низком, среднем и высоком диапазонах, начиная с 256 нг/мл, которые затем последовательно разбавляли в четыре раза до 8 нг/мл, затем двукратное разбавление применяли для приготовления наиболее низкого КК - 4 нг/мл. Образцы для стандартной кривой и КК (QC) были включены в двух повторах при каждой аналитической серии. Нижние и верхние пределы количественной оценки были определены как самые низкие и самые высокие точки КК (QC), имеющие воспроизводимые обратно рассчитанные концентра-

ции, не превышающие 30 процентов (%) от номинальной концентрации. Критерий принятия для точек стандартной кривой был 30 процентов (%) от номинальной концентрации.

Для измерения концентрации активного лекарственного средства в образцах сыворотки был приготовлен мастер-микс, объединяющий биотинилированный рекомбинантный ФАВЛ (BAFF) человека и 0,5 мкг/мл сульфо-меченого вторичного антитела козы к IgG человека в 0,5 мкг/мл связывающего буфера (5% БСА в 1 × ФСБ (фосфатно-солевой буфер) с 0,05% Tween 20). Мастер-смесь добавляли в 96-луночную не связывающую и блокирующую свет плашку в объеме 50 мкл/лунка. Двадцать пять мкл стандартов и КК (QC) (стоки, разведенные 1:20 в связывающем буфере) добавляли в лунки, в двух повторностях на не связывающую плашку, содержащую мастер-смесь. Неизвестные образцы сыворотки разбавляли 1:20 в связывающем буфере и 1:400 в связывающем буфере, содержащем 5% сыворотки. 25 мкл разведенных образцов добавляли в лунки не связывающей плашки, содержащей мастер-смесь. Не связывающие плашки инкубировали при комнатной температуре на шейкере для плашек (500 об/мин, 1,5 ч). Параллельно, плашку MSD Streptavidin GOLD блокировали, применяя 150 мкл блокирующего буфера (5% БСА с 1X ФСБ с 0,05% Tween 20) и инкубировали при комнатной температуре на шейкере для плашек (500 об/мин, 1,5 ч). После инкубации плашки MSD трижды промывали 300 мкл/лунка промывочного буфера (0,05% Tween 20 в 1X ФСБ). 50 мкл образца из не связывающих плашек добавляли в плашки MSD и инкубировали при комнатной температуре (1,5 ч, 600 об/мин). После инкубации плашки трижды промывали промывочным буфером и добавляли 150 мкл 2× Read Buffer T в каждую лунку и сразу считывали на приборе MSD Sector Imager 2400. Стандартные кривые были сравнены с четырехпараметрическим логистическим уравнением с использованием программного обеспечения MSD Discovery Workbench. Фармакокинетические параметры рассчитывали с применением некомпартментного анализа в Phoenix Win-Nonlin 6.3 (Чертара, Мэриленд, США).

Результаты.

Средняя (СО - стандартное отклонение) сывороточная концентрация в зависимости от времени для тестируемых соединений, показаны на фиг. 2. Средние (СО) фармакокинетические параметры для тестируемых соединений приведены в табл. 12. Образцы сыворотки, демонстрирующие резкое падение концентрации лекарственного средства с течением времени, которые были подтверждены как положительные по антителам к лекарственному средству, были исключены из расчетов фармакокинетических параметров.

Таблица 12. Средние (СО) фармакокинетические параметры тестируемых соединений у самцов яванского макака после 1 мг/кг внутривенной дозы

Идентификатор соединения	ППК <sub>0-последнее</sub> (площадь под кривой зависимости концентрации плазмы-время, AUC <sub>0-last</sub> ) (мкг*д/мл)	ППК <sub>0-бесконечность</sub> (AUC <sub>0-inf</sub> ) (мкг*д/мл)	CL (клиренс) (мл/день/кг)	V <sub>ss</sub> (очевидный объем распределения в установившемся состоянии) (мл/кг)	T <sub>1/2</sub> (период полувыведения) (дни)
Соединение А	52,5 (6,6)	54,2 (7,1)	18,6 (2,4)	61,6 (4,3)	3,1 (0,3)
Соединение В	102,7 (1,8)	127,0 (3,6)	7,9 (0,2)	64,4 (6,6)	6,2 (0,7)
Соединение С	26,6 (1,4)	27,0 (1,3)	37,1 (1,8)	66,9 (13,2)	2,3 (0,4)
Соединение D	33,8 (1,3)	34,5 (1,8)	29,0 (1,5)	55,7 (5,5)	2,8 (0,8)

Пример 11. Предсказание ФК для человека и дозы для человека иллюстративного соединения.

Элементарное масштабирование Дедрика применяли для масштабирования средних концентраций соединения В в сыворотке обезьян к такому же человеку с использованием аллометрического показателя 1,0 для объема распределения и 0,85 для клиренса. Предсказанную кривую зависимости сывороточной концентрации от времени при внутривенном введении для человека сравнивали с линейной двухкомпарментной моделью. Кривая зависимости сывороточной концентрации от времени при подкожном введении для человека была предсказана путем комбинирования параметров из двухкомпарментной модели при внутривенном введении с средней скоростью поглощения при подкожном введении и биодоступностью, наблюдаемой для продаваемых терапевтических мАнт (моноклональных антител). Предполагается, что клиренс и период полувыведения составляют 0,34 л/д и 9,9 д у здоровых людей соответственно. На фиг. 3 показана предсказанная кривая зависимости сывороточной концентрации от времени соединения В в сыворотке человека после дозы 100 мг подкожно, вводимого один раз каждые две недели.

Предсказанная эффективная доза для человека составляет 1 мг/кг, предоставляемая подкожно раз в две недели. Предполагается, что эта схема приема лекарств поддерживает C<sub>min</sub> (минимальная концентрация препарата в плазме) ≥ 30 нМ (6 мкг/мл) с двухнедельным или менее частым подкожным введени-

ем. Прогнозируемая эффективная доза может быть получена исходя из ФД биомаркеров ответов на концентрации, наблюдаемых для белимумаба (Benlysta®), табалумаба и блисибимода у пациентов с СКВ и РА. В данных исследованиях максимальное ингибирование биомаркеров, связанных с ФАВЛ (BAFF), было сопоставлено с постоянной  $C_{min}$  в 30-40 нМ. Концентрация, необходимая для нейтрализации ИЛ23, намного ниже, чем требуется для нейтрализации ФАВЛ (BAFF), и поэтому не влияет на общую требуемую  $C_{min}$  для двойного антагониста.

Пример 12. Очистка соединений.

Способы.

Соединения очищали с помощью Mab Select SuRe в качестве стадии аффинной очистки.

Элюцию выполняли с применением ацетат-натриевого буфера, pH 3,5. После очистки с помощью Mab Select SuRE образцы были нейтрализованы, и были нанесены на смолу Poros 50 HS, и элюированы с использованием градиента хлорида натрия в натрий-цитратном буфере. Пик вымывания для мономеров был при 20 mM NaCitrate и 120 mM NaCl pH 6,0. После ионообменной хроматографии образец состоял постоянно из больше чем 95% мономера.

Исследования с применением скоростной седиментации (СС) с помощью "Аналитического ультрацентрифугирования" (АУЦ) применяли для получения информации о чистоте образца и его агрегатных состояниях.

Образцы центрифугировали в оптимальных условиях в XL-I (Beckman Coulter, Фуллертон, Калифорния) при 20°C с помощью An60Ti ротора с четырьмя отверстиями, на скорости 40000 об/мин.

Процесс осаждения контролировали с помощью ультрафиолетового поглощения при 280 нм, применяя соответствующий буфер для разведения как референсный буфер. Изменения в распределении концентраций в ячейке ультрацентрифуги регистрировали с ходом времени, используя операционное программное обеспечение XL-I, и анализировали с применением c(S) модели непрерывного распределения в программном обеспечении SEDFIT (версия 14.1), чтобы получить распределение коэффициента седиментации. Процент мономера был рассчитан на основе интегрированной площади пика.

Результаты.

Результаты очистки соединений приведены в табл. 13. Данные показывают, что соединения имеют высокую чистоту и однородность, которые указывают на хорошую стабильность.

Таблица 13

Название параметра	Соединения А, В, С, D
Процент мономера (скорость осаждения)	99% мономера 1% агрегата

Пример 13. Масс-спектрофотометрический профиль соединений.

Способы.

Нативные образцы.

Эта процедура предоставляет данные относительно интактной массы соединения или белка. 0,15 мкл образца вводили в колонку Agilent Poroshell 300SB-C3, 5 мкм, (30×1,0 мм). Температура колонки составляла 80°C и скорость потока составляла 150 мкл/мин. Соединение или белок элюировали с колонки с градиентом от 10%B на 0 мин до 85%B на 6 мин. Подвижная фаза А представляла собой смесь вода/ацетонитрил/муравьиная кислота/ацетат аммония (99/1/0,1/2 mM), и подвижная фаза В представляла собой смесь н-пропанол/ацетонитрил/вода/муравьиная кислота (70/20/10/0,1). Сток был направлен в Agilent 6224 TOF масс-спектрометр, который (сток) был просканирован от массы 600 до массы 3200. Сырые данные были восстановлены с помощью программы MassHunter. Образец с удаленными дисульфидными связями.

Эта процедура предоставляет данные относительно массы белка, или легкой цепи и массы тяжелой цепи. 5 мкл образца добавляли к 5 мкл смеси 20:1 8М гуанидин HCL:ТСЕР (трис 2-карбоксииэтилфосфин) и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. 0,15 мкл данного образца вводили, как указано выше, с следующими отличиями: соединение или белок элюировали с колонки градиентом от 5%B на 0 мин до 85%B на 6 мин, температура колонки составляла 60°C и диапазон масс составлял 600-2000.

Дегликозилированный образец.

Эта процедура предоставляет данные относительно дегликозилированной массы белка, или легкой цепи и тяжелой цепи. 7,5 мкл образца добавляли к 3,2 мкл смеси 20:1 400 mM бикарбоната аммония:пептид-N-гликозидаза F, и инкубировали в течение 3 ч при 37°C. Затем к образцу добавляли 10 мкл смеси 20:1 8М гуанидин HCL:ТСЕР и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Данный образец вводили так, как указано выше, для образца с удаленными дисульфидными связями.

Картирование пептида с помощью масс-спектрометрии.

Образцы разбавляли в денатурирующем буфере, состоящем из 6 М гуанидин HCl, 250 mM Tris-HCl pH 7,5 и 10 mM ДТТ (дителиотреитол), а затем инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Образцы затем алкилировали йодацетамидом и инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 30 мин. Реакционные смеси очищали и буфер заменяли на 100 mM Tris-HCl, pH 7,5, используя Superfine картриджи Sephadex G-25. Образцы затем расщепляли трипсином в течение 4-часовой инкубации при 37°C.



Реакцию расщепления смесей затем останавливали добавлением ТФУК (трифторуксусная кислота).

Полученный триптический продукт вносили в колонку для обращённо-фазовой хроматографии Phenomenex Jupiter C18 с помощью автосамплера Dionex Ultimate 3000 HPLC. Была применена градиентная система растворителей, состоящая из растворителя А: 0,1% муравьиной кислоты/99% воды/1% ацетонитрила и растворителя В: 0,1% муравьиной кислоты/5% воды/95% ацетонитрила. Процент растворителя В был увеличен с 0 до 38% в течение 140 мин. Хроматографическое разделение происходило при комнатной температуре со скоростью потока 100 мкл/мин. Хранение образцов в автосамплере осуществлялось при 4°C. После хроматографического разделения образец вводился в масс-спектрометр Thermo Scientific Orbitrap Fusion, работающий в режиме положительной электрораспылительной ионизации. Используемый метод включал типы активации CID с разрешением 30000, минимальным сигналом 10000, шириной изоляции 1,0 и нормированной энергией столкновения 35,0 В. Уровень RF S-линзы был установлен на 20%. Тип сбора данных - это профиль для полного сканирования MS (масс спектрометрия) и центраоида для данных CID MS/MS. Данные собираются в диапазоне масс 250-2000 Да при скорости получения 1 спектр в секунду.

Собранные необработанные ЖХ-МС и ЖХ-МС/МС данные фрагментации были проанализированы с использованием Proteome Discover 1.4 (Thermo Scientific) в сравнении с данной последовательностью. Идентифицированные пептиды, содержащие консенсус N-X-S/T (X не является P), затем анализировали путем ручного извлечения ЭИХ (экстрагированная ионная хроматограмма) для гликозилированных пептидов. Интенсивность MS гликозилированных пептидов по всей ЭИХ использовалась для оценки их процента от общего содержания гликоформ.

Результаты.

Результаты приведены в табл. 14. Данные, которые обозначают предсказанную аминокислотную последовательность и структуру, были отражены и восстановлены без неожиданной разнородности. Шаблон гликозилирования является типичным для обычных антител, экспрессированных в клетках CHO, и не демонстрирует каких-либо атипичных структур.

Таблица 14

Параметр	Соединение В
Масс-спектрометрия: Профиль молекулярного веса интактной молекулы	Интактная/Совпадает с последовательностью
Масс-спектрометрия: Профиль гликозилирования	Аналогичный CHO- экспрессированному IgG

Пример 14. Содержание мономера при высокой концентрации.

Цель описания данного процесса - оценить присутствие соединению В свойства путем оценки агрегации при повышенной концентрации. Стандартный буфер 20 mM NaCitrate, 120 mM NaCl pH 6 применяют без оценки состава для понимания склонности молекул к агрегации.

Способы.

Соединение В постепенно концентрировали к наиболее возможной высокой концентрации, не наблюдая при этом преципитации, применяя фильтр центрифугирования Amicon Ultra с молекулярной массой отсека 50000 Да (Millipore, Биллерике). Затем, концентрированные растворы белка анализировали в эксперименте скорости седиментации (СС) для получения информации по чистоте образца и агрегатным состояниям. Хроматографию проводили с использованием системы ВЭЖХ Agilent 1200 серии. Систему запускали со скоростью 1,0 мл/мин в течение 23 мин. Примерно 30 мкг материала вводили в колонку Tosoh Biosciences TSKgel G3000SWXL (5 мкм 250a 7,8×30 см), и результаты считывали при 280 нм. Использованный буфер для пробега - 50 mM NaPhosphate, 0,2 M L-аргинин, pH 6,8.

Результаты.

Сводка аналитических данных ЭХ (эксклюзионная хроматография) для соединения В в процессе концентрирования приведена в табл. 15 и на фиг. 4. Представлены данные, показывающие агрегацию и чистоту образца при увеличении концентрации, которые свидетельствуют о том, что соединение В не обладает склонностью к агрегации при повышенной концентрацией.

Таблица 15. Сводка аналитических данных ЭХ для соединения В в процессе концентрирования

Концентрация соединения В (мг/мл)	Аналитические данные ЭХ
10	99,6% мономера, 0,4% агрегата
20	99,5% мономера, 0,5% агрегата
40	99,6% мономера, 0,4% агрегата
75	99,5% мономера, 0,5% агрегата
100	99,5% мономера, 0,5% агрегата
121	99,5% мономера, 0,5% агрегата

М - мономер, А - агрегат.

Пример 15. Валентность соединений.

Способы.

Аналитический мембранно-ограниченный электрофорез применяли для измерения валентности соединений, которые ранее были подвергнуты диализу в буфере 10 мМ ацетат, 50 мМ KCl pH 5,0 в течение ночи. В протоколе эксперимента, 20 мкл образца с концентрацией 1 мг/мл загружали в кварцевую кювету 2×2×4 мм<sup>3</sup>, оба конца которой были закрыты полупроницаемыми регенерированными целлюлозными мембранами марки BioTech с молекулярной массой отсечения (ММО) равной 10. Данные мембраны задерживают макромолекулы, в то же время пропускают воду и компоненты растворителя. Затем через кювету пропускали электрический ток в 1 мА, устанавливая электрическое поле вдоль ее длины, в котором заряженная макромолекула перемещалась в электрическом поле с непрерывным потоком свежего буфера. Движущаяся граница концентрации в реальном времени была определена с применением линейной фотодиодной матрицы (LPDA), которая обеспечивает считывания напряженности вдоль кюветы. Скорость границы концентрации использовалась для расчета электрофоретической подвижности и, следовательно, эффективной валентности. Затем, для определения основной валентности макромолекулы использовали дополнительную информацию, такую как стоксовый радиус (полученный из скорости седиментации в АУЦ), радиус противодавления (0,122 нм для иона хлора), буферная проводимость (6,35 мС) и ионная сила (0,05М).

Результаты.

Данные по валентности (см. табл. 16) указывают на коллоидную стабильность соединений в растворе, то есть сетевое взаимодействие белок-белок в растворе. Соединения с валентностью больше чем 15 имеют сильную сеть взаимодействия отталкивания и высокий потенциал для того, чтобы быть приготовленными в высоких концентрациях.

Таблица 16. Данные валентности для соединений

Идентификатор соединения	Валентность при pH 5,0
Соединение А	24,4 ± 0,2
Соединение В	21,5 ± 0,3
Соединение D	21,8 ± 0,2

Пример 16. Стабильность соединений в цельной крови.

Способы.

Анализ интерференции цельной крови был выполнен на Octet RED96, для того чтобы выявить эффекты неспецифического связывания или нецелевого связывания соединений в присутствии цельной крови (ЦК). Растворы соединений в цельной крови и 1× кинетическом рабочем буфере (1×kb) инкубировали при температуре 37°C в течение 48 ч. Кинетические измерения для инкубированных образцов соединений были выполнены на Octet RED96, оборудованном биосенсорным стрептавидиновым (SA) датчиком (ForteBio, Менло-Парк, Калифорния) при 27°C. Сообщалось о соотношении сигналов скорости/связывание в буфере и цельной крови. Соотношение меньше чем 2 рассматривалось как такое, что указывает на отсутствие интерференции.

Результаты.

Результаты продемонстрированы в табл. 17. Для тестируемых соединений не наблюдалось никакой интерференции цельной кровью.

Таблица 17. Результаты для соединений по связыванию с цельной кровью

Параметры	Отношение сигнала связывания в ЦК/кинетическом буфере с ФАВЛ (BAFF) человека	Отношение сигнала связывание в ЦК/кинетическом буфере с ИЛ23 человека
Соединение А	1,2	1,1
Соединение В	1,2	1,5
Соединение С	1,1	1,3
Соединение D	1,3	1,7
Соединение E	1,0	1,1
Соединение F	1,0	1,2

Пример 17. Предсказание иммуногенности in silico.

Способы.

Иммуногенность белковых лекарственных средств была предсказана in silico применяя вычислительный инструмент EpiMatrix, который был разработан EpiVax, Inc. (Провиденс, Род-Айленд).

EpiMatrix включает предсказания Т-хелперного эпитопа, а также эпитопа регуляторных Т-клеток, из которых первый вызывает иммунный ответ, в то время как второй является ингибирующим.

Коротко, последовательность белка была сначала разбита на перекрывающиеся белковые рамки длиной 9 аминокислот, которые, как было доказано, являются ядром связывания белков генов HLA класса II. Потенциал связывания пептидов длиной 9 аминокислот с каждым из восьми распространенных аллелей HLA класса II оценивается на основе экспериментальных данных или вычислительного прогнозирования. Начисляются баллы для отображения потенциала связывания пептидов длиной 9 аминокислот с

каждым аллелем HLA, и выполняется нормирование для того, чтобы сделать возможным сравнение связывания любого 9-аминокислотного полипептида с любым из многих аллелей HLA, и прогнозирование иммуногенности в глобальном масштабе. В итоге, программа генерирует общий "бал иммуногенности", tReg Adjusted Epx Score, который определяет вероятность того, что соединения будут вызывать иммунный ответ in vivo.

Результаты.

Результаты показаны в табл. 18. Общие баллы иммуногенности для тестируемых соединений являются низкими и предполагают, что данные соединения скорее всего не вызывают сильного иммунного ответа in vivo.

Таблица 18. Баллы EpiVax

Параметр	EpiVax (Цепь 1, Цепь 2)
Соединение A	-46,13, -28,39
Соединение B	-45,77, -28,39
Соединение C	-41,40, -28,42
Соединение D	-41,01, -28,42
Соединение E	-39,81, -41,43
Соединение F	-42,15, -36,94
Соединение G	-43,75, -29,30
Соединение H	-35,19, -43,44
Соединение I	-43,38, -29,30
Соединение J	-34,78, -43,44
Соединение K	-43,75, -33,61
Соединение L	-37,80, -43,44
Соединение M	-43,38, -33,61
Соединение N	-37,40, -43,44
Соединение O	-34,66, -39,56
Соединение P	-34,24, -39,56
Соединение Q	-34,64, -47,37
Соединение R	-34,22, -47,37
Соединение S	-40,96, -40,09
Соединение T	-43,91, -40,09
Соединение U	-41,31, -44,98
Соединение V	-42,53, -36,94
Соединение W	-38,33, -44,98
Соединение X	-39,42, -41,43

Пример 18. Ингибирование ФАВЛ (BAFF) человека в анализе пролиферации первичных В-клеток человека.

Материалы и способы.

Обычные образцы здоровой крови (n равно 3 донора), используемые в этом исследовании, были приобретены в Biological Specialty Corporation, Филадельфия, штат Пенсильвания. Полная среда для культивирования была IMDM (Life Technologies), дополненная 10% ФБС (Life Technologies) плюс пенициллин/стрептомицин (Life Technologies). Буфер для выделения В-клеток состоял из стерильного ФСБД (фосфатно-солевой буфер Дульбекко) без  $Mg^{++}$  и  $Ca^{++}$  (Life Technologies), плюс 2% ФБС, плюс 2 мМ EDTA (Life Technologies).

Выделение В-лимфоцитов человека из цельной крови здорового человека.

400 мл гепаринизированной цельной крови переносили в 1000 мл стерильную бутылку из полистирола и добавляли равный объем ФСБД. 35 мл разведенной ФБС крови помещали в верхнюю часть 15-миллиметрового градиента Ficoll-Paque™ Plus (GE Healthcare), предварительно загруженного в 50-миллилитровую круглодонную трубку из полистирола. Пробирки центрифугировали при 2000 об/мин при комнатной температуре в течение 20 мин без перерыва. Затем две трети верхнего супернатанта отсасывали, а средний серый слой, содержащий мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК (PBMC)), переносили в коническую трубку объемом 50 мл. ФСБД (без  $Ca^{++}$  и  $Mg^{++}$ ) плюс 2% ФБС добавляли до объема 50 мл. Пробирки центрифугировали при 1200 об/мин в течение 10 мин. Полученный клеточный осадок ресуспендировали в ФСБД (без  $Ca^{++}$  и  $Mg^{++}$ ) + 2% ФБС (промывочный буфер) и повторяли стадию центрифугирования (1200 об/мин в течение 10 мин). Клеточный осадок снова ресуспендировали в промывочном буфере до 50 мл. В этот момент были измерены жизнеспособность клеток и концентрация клеток.

Затем пробирку центрифугировали при 1200 об/мин в течение 10 мин и супернатант удаляли. Клеточный осадок ресуспендировали в полной культуральной среде и концентрацию клеток доводили до  $5 \times 10^6$  клеток/мл. Суспендированные клетки помещали в колбу 75 см<sup>2</sup> для тканевой культуры и инкубировали в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> (при 37°C) в течение ночи. Затем В-лимфоциты выделяли с использованием набора Dynabeads® Untouched™ Human B Cells Kit (Life Technologies) в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию клеток регулировали так, чтобы она была подходящей для последующей процедуры после измерения концентрации и жизнеспособности клеток.

Оценка пролиферации В-лимфоцитов с использованием анализа включения <sup>3</sup>H-тимидина.

В-лимфоциты высевали в плашку Falcon для тканевой культуры, 96 лунок с округлым дном ( $1 \times 10^5$  клеток/100 мкл культуральной среды на лунку). Затем тестируемые изделия готовили в полной культуральной среде в 4 последовательных концентрациях в диапазоне от 0,028 до 20 нМ, и стимулирующие В-лимфоциты вещества (антитела против IgM и ФАВЛ (BAFF) человека) в 4 концентрациях (8 мкг/мл и 20 нг/мл соответственно). В соответствующие лунки добавляли 50 мкл предварительно разбавленных тестируемых изделий (от 0,007 до 5 нМ, конечная концентрация). Затем, в соответствующие лунки добавляли 50 мкл предварительно разведенного козьего античеловеческого IgM (2 мкг/мл, конечная концентрация) и чФАВЛ (ФАВЛ человека, hBAFF) (5 нг/мл или 98 пМ, конечная концентрация) (см. фиг. 6). В-лимфоциты культивировали в инкубаторе с увлажнением, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C, в течение 72 ч. За 18 ч до окончания инкубации в каждую лунку добавляли 20 мкл 1 мкКи <sup>3</sup>H-тимидина (Pelkin Elmer). Собираатель клеток использовали для переноса ДНК с включенным <sup>3</sup>H-тимидином/лунка в фильтровальную плашку из микроволоконистого стекла, которой в лунки добавляли 30 мкл усилителя сцинтилляции после сушки на воздухе плашки в течение, по меньшей мере, 4 ч. Число импульсов в минуту (ЧИМ) каждой лунки измерялось с использованием MicroBeta Topcount, и была построена кривая зависимости значения ЧИМ (ось у) от концентрации исследуемых изделий (ось x).

Статистический анализ.

Значения IC<sub>50</sub> и IC<sub>90</sub> определяли путем сопоставления кривой данных с сигмоидальной дозозависимой функцией с 4 параметрами, с применением программного обеспечения GraphPad Prism 6. Геометрические средние были рассчитаны по трем экспериментам и показаны в табл. 19.

Результаты.

Результаты показали, что соединение В оказалось примерно в 2 раза более сильным по сравнению с контрольным антителом 3 при сравнении значений IC<sub>50</sub> и IC<sub>90</sub>.

Таблица 19. Геометрические средние значения IC<sub>50</sub> и IC<sub>90</sub> для ингибирования ФАВЛ (BAFF) человека в анализе пролиферации первичных В-лимфоцитов

Идентификатор соединения	IC <sub>50</sub> (нМ)	IC <sub>90</sub> (нМ)
Соединение В	33,7	160,2
Контрольное антитело 3 (ФАВЛ (BAFF) (3))	87,3	370,8

Пример 19. Подавление численности В220+ В-лимфоцитов, обусловленной избыточной экспрессией ФАВЛ (BAFF) у мышей В10.Р.III.

Материалы и способы.

Коротко, в первый день мышинные самки В10.Р.III (6-8 недель, Jackson Laboratory) были случайным образом разделены на 10 групп, 10 животных/группа, и им делали внутрибрюшную инъекцию объемом 100 мкл, или цитратного буфера (20 мМ NaCitrate, 115 мМ хлорида натрия, рН 6,0), или исследуемых соединений в эквивалентной молярной дозе 1,3, 0,4 и 0,13 мг/кг в противопоставлении 1, 3 и 0,1 мг/кг соответственно. Ранее не подвергавшиеся лечению необработанные мыши были дополнительным контролем. Сразу же после 1-го дня лечения мышам вводили одну 3 мг дозу (1,5 мг/мл) мини-кольцевой ДНК ФАВЛ (BAFF) человека (System Biosciences) с помощью гидродинамической инъекции, в противопоставлении пустому вектору (ПВ) для контрольной группы. Внутрибрюшинную обработку или цитратным буфером, или тестируемыми соединениями повторяли каждые 72 ч в дни 3, 6, 9 и 12.

На 14-й день мышей анестезировали изофлураном (Butler Schein) и умерщвляли через шейную дислокацию. Селезенки удаляли и клеточную суспензию анализировали с помощью проточной цитометрии на наличие В220+ В-лимфоцитов. Были определены средние уровни для каждой обработанной группы, и рассчитывали статистическую значимость по сравнению с контролем, применяя однофакторный дисперсионный анализ с последующим тестом множественного сравнения Дуннетта. Результаты проиллюстрированы на фиг. 5.

Результаты.

Результаты показали, что обработка в течение 14 дней соединением В способна значительно подавлять размножение В220+ В-лимфоцитов, индуцированное мини-кольцевой ДНК ФАВЛ (BAFF) человека.

Пример 20. Ингибирование индуцированного человеческого ИЛ23 высвобождения ИЛ17А и ИЛ22 у мышей С57/В16.

Материалы и способы.

Коротко, мышинные самки С57BL/6 (7-10 недель, Charles River) были случайным образом разделены

на 8 групп, 8 животных/группа, и им делали внутрибрюшную инъекцию 100 мкл, или цитратного буфера (20 мМ NaCitrate, 115 мМ хлорида натрия, рН 6,0), или исследуемых соединений в эквивалентной молярной дозе 1,3, 0,4 и 0,13 мг/кг против 1, 3 и 0,1 мг/кг соответственно.

Через час после дозирования тестируемого соединения мышей обезболивали с помощью изофлурана (Butler Schein) и делали 20 мкл внутрикожную инъекцию, или 0,1% БСА (Sigma) контроля, или 15 мкг/мл (0,3 мкг) рчИЛ23 (рекомбинантный ИЛ23 человека) (собственное производство), разведенного в физиологическом растворе (Invitrogen), в оба уха. Внутрикожные введения антигенных стимулов повторяли ежедневно в течение 2 дней подряд. Через 24 ч после второго стимулирования мышей забивали с помощью цервикальной дислокации и удаляли каждое ухо. Ткани уха гомогенизировали в 1 мл буфера для гомогенизации (HBSS (Gibco) 0,4% Triton X-100 (Sigma) 1X SigmaFast Protease Inhibitor (Sigma)) применяя гомогенизатор MP Biomedicals Fast-Prep 24. Гомогенизированные образцы центрифугировали при 4°C в течение 10 мин и собирали супернатант. Супернатанты анализировали на наличие мышинных ИЛ17А и ИЛ22, применяя Quantikine® Mouse ИЛ-17 и мышинные ИЛ-22 иммуноанализы в соответствии с инструкциями производителя (R&D Systems). Интерполированные значения цитокина пг/мл определяли для каждого образца. Были определены средние уровни пкг/мл для каждой обработанной группы и рассчитывали статистическую значимость по сравнению с контролем, применяя однофакторный дисперсионный анализ с последующим тестом множественного сравнения Дуннетта.

Результаты.

Результаты на фиг. 6 показывают, что обработка одной внутрибрюшной дозой соединения В способна значительно ингибировать высвобождение мышинового ИЛ17 и ИЛ22 в коже, вызванное последовательными внутрикожными инъекциями рекомбинантного человеческого ИЛ23 в течении двух дней.

#### Последовательности

SEQ ID NO	Последовательность
1	QVQLQQSGAEVKKPGSSVRVSKASGGTFNNAINWVRQAPGGLEWMGGIIP MFGTAKYSQNFQGRVAITADESTGTASMELSSLRSEDTAVYYCARSRDLFLPHH ALSPWGRGTMVTVSS
2	SSELTQDPAVSVVALGQTVRVTCTQGDLSRYYASWYQQKPGQAPVLIYGKNNRP SGIPDRFSGSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCSSRDSGNHWWFGGGTELTVL
3	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTDQTIHWMRQAPGGLEWIGYIYPR DDSPKYENFVKGVITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAIPDRSGYAWFIY WGQGLTVTVSS
4	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTRH TGVPSRFSGSGSRDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIK
5	SSELTQDPAVSVVALGQTVRVTCTQGDLSRYYASWYQQKPGQAPVLIYGKNNRP SGIPDRFSGSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCSSRDSGNHWWFGGGTELTVLG GGSGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTDQTIHWMRQAPGGLE WIGYIYPRDDSPKYENFVKGVITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAIPDRS GYAWFIYWGQGLTVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLV DYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
6	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTRH TGVPSRFSGSGSRDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGGSG GGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSKASGGTFNNAINWVRQAPGGLEWMG GIIPMFGTAKYSQNFQGRVAITADESTGTASMELSSLRSEDTAVYYCARSRDLFL PHHALSPWGRGTMVTVSSLGGGSGRTVAAPSVEFIPPSDEQLKSGTASVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLTKADYEEKHKVY ACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
7	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTRH TGVPSRFSGSGSRDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGGSG GGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSKASGGTFNNAINWVRQAPGGLEWMG

	GIIPMFGTAKYSQNFQGRVAITADESTGTASMELSSLRSEDТАVYYCARSRDL LLF PHHALSPWGRGTMVTVSSLGGSSTGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
8	SSELTQDPAVSVALGQTVRVTTCQGDLSRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRP SGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCSSRDSSGNHWFVGGGTELTVLG GGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLE WIGYIYPRDDSPKYNEFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDТАVYYCAIPDRS GYAWFIYWGQGLTVTVSSLGGSSTGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
9	SSELTQDPAVSVALGQTVRVTTCQGDLSRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRP SGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCSSRDSSGNHWFVGGGTELTVLG GGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLE WIGYIYPRDDSPKYNEFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDТАVYYCAIPDRS GYAWFIYWGQGLTVTVSSGGCGGGEVAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALEKL EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG
10	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTRH TGVPSTRFSGSGSRDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGGSG GGGQVQLQQSGAEVKKPGSSVRVSKASGGTFNNAINWVRQAPGQGLEWMG GIIPMFGTAKYSQNFQGRVAITADESTGTASMELSSLRSEDТАVYYCARSRDL LLF PHHALSPWGRGTMVTVSSGGCGGKVAACEKEVAALKEKVAALKEKVAALKE
11	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTRH TGVPSTRFSGSGSRDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGGSG GGGQVQLQQSGAEVKKPGSSVRVSKASGGTFNNAINWVRQAPGQGLEWMG GIIPMFGTAKYSQNFQGRVAITADESTGTASMELSSLRSEDТАVYYCARSRDL LLF PHHALSPWGRGTMVTVSSGGCGGGEVAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALEKL EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG
12	SSELTQDPAVSVALGQTVRVTTCQGDLSRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRP SGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCSSRDSSGNHWFVGGGTELTVLG GGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLE WIGYIYPRDDSPKYNEFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDТАVYYCAIPDRS GYAWFIYWGQGLTVTVSSGGCGGKVAACEKEVAALKEKVAALKEKVAALKE
13	SSELTQDPAVSVALGQTVRVTTCQGDLSRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRP SGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCSSRDSSGNHWFVGGGTELTVLG GGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLE WIGYIYPRDDSPKYNEFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDТАVYYCAIPDRS GYAWFIYWGQGLTVTVSSLGGSSTGASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
14	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTRH TGVPSTRFSGSGSRDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGGSG GGGQVQLQQSGAEVKKPGSSVRVSKASGGTFNNAINWVRQAPGQGLEWMG GIIPMFGTAKYSQNFQGRVAITADESTGTASMELSSLRSEDТАVYYCARSRDL LLF PHHALSPWGRGTMVTVSSLGGSSTGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

	ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
15	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTRH TGVPSTRFSGSGSRDFTLTISSLOPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGGSG GGGQVQLQQSGAEVKKPGSSVRVSKASGGTFNNNAINWVRQAPGQGLEWMG GIIPMFGTAKYSQNFQGRVAITADESTGTASMESSLRSEDТАVYYCARSRDLLLLF PHHALSPWGRGTMVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVD HKPNSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCV VVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
16	SSELTQDPAVSVALGQTVRVTCCQDLSRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRP SGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCSSRDSSGNHWFVGGGTELTVLG GGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLE WIGYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDТАVYYCAIPDRS GYAWFIYWQGTЛTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
17	SSELTQDPAVSVALGQTVRVTCCQDLSRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRP SGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCSSRDSSGNHWFVGGGTELTVLG GGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLE WIGYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDТАVYYCAIPDRS GYAWFIYWQGTЛTVSSGGCGGGEVAACEKEVAALKEKEVAALKEKEVAALKE SKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQ KSLSLGLG
18	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTRH TGVPSTRFSGSGSRDFTLTISSLOPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGGSG GGGQVQLQQSGAEVKKPGSSVRVSKASGGTFNNNAINWVRQAPGQGLEWMG GIIPMFGTAKYSQNFQGRVAITADESTGTASMESSLRSEDТАVYYCARSRDLLLLF PHHALSPWGRGTMVTVSSGGCGGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE
19	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTRH TGVPSTRFSGSGSRDFTLTISSLOPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGGSG GGGQVQLQQSGAEVKKPGSSVRVSKASGGTFNNNAINWVRQAPGQGLEWMG GIIPMFGTAKYSQNFQGRVAITADESTGTASMESSLRSEDТАVYYCARSRDLLLLF PHHALSPWGRGTMVTVSSGGCGGGEVAACEKEVAALKEKEVAALKEKEVAALKE SKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQ KSLSLGLG
20	SSELTQDPAVSVALGQTVRVTCCQDLSRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRP SGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCSSRDSSGNHWFVGGGTELTVLG GGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLE WIGYIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDТАVYYCAIPDRS GYAWFIYWQGTЛTVSSGGCGGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE
21	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTRH TGVPSTRFSGSGSRDFTLTISSLOPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGGSG GGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKAPDHIFSIHWMQWVRQAPGQGLEWMG EIFPGSGTTDYNEKFKGKVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDТАVYYCASGAFDYW GQGTТTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPNSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG
22	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNRLSWLQEPGKAPKRLIYATSSLDS GVPSRFSGSRSGTEFTLTISSLOPEDVITYYCLQYASSPFTFGQTKLEIKGGGSGG

	GGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLEWIGYI YPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCAIPDRSGYAW FIYWGQGLTVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLTKADYEEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
23	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTRH TGVPSTRFSGSGSRDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGGSG GGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAPDHIFSIHWMQWVRQAPGQGLEWMG EIFPGSGTTDYNEKFKGKVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCASGAFDYW GQGTTVTVSSGGCGGGEVAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALEKLEPKSSDKTH TCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSL SLSPG
24	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNRLSWLQQEPGKAPKRLIYATSSLDS GVPSRFSGSRSGTEFTLTISSLQPEDFVITYYCLQYASSPFTFGQGTKLEIKGGGSGG GGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLEWIGYI YPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCAIPDRSGYAW FIYWGQGLTVTVSSGGCGGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE
25	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTRH TGVPSTRFSGSGSRDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGGSG GGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAPDHIFSIHWMQWVRQAPGQGLEWMG EIFPGSGTTDYNEKFKGKVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCASGAFDYW GQGTTVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVD KRVESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSDQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHN HYTQKSLSLSLG
26	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNRLSWLQQEPGKAPKRLIYATSSLDS GVPSRFSGSRSGTEFTLTISSLQPEDFVITYYCLQYASSPFTFGQGTKLEIKGGGSGG GGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLEWIGYI YPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCAIPDRSGYAW FIYWGQGLTVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLTKADYEEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
27	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTRH TGVPSTRFSGSGSRDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGGSG GGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAPDHIFSIHWMQWVRQAPGQGLEWMG EIFPGSGTTDYNEKFKGKVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCASGAFDYW GQGTTVTVSSGGCGGGEVAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALEKESKYGPPCPP CAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
28	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGNRLSWLQQEPGKAPKRLIYATSSLDS GVPSRFSGSRSGTEFTLTISSLQPEDFVITYYCLQYASSPFTFGQGTKLEIKGGGSGG GGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLEWIGYI YPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCAIPDRSGYAW FIYWGQGLTVTVSSGGCGGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE
29	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTRH TGVPSTRFSGSGSRDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGGSG GGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAPDHIFSIHWMQWVRQAPGQGLEWMG EIFPGSGTTDYNEKFKGKVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCASGAFDYW GQGTTVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDV HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMH



	EALHNHYTQKSLSLSPG
30	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGNRLNWXQQKPGKAPKRLIYATSSLDS GVPSRFSGSRSGTEFTLTISLQPEDFVTYYCLOYASSPFTFGQGKTLEIKGGGSGG GGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLEWIGYI YPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCAIPDRSGYAW FIYWGQGTЛTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLISKADYEEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
31	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTRH TGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGGSG GGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAPDHIFSIHWMQWVRQAPGQGLEWWMG EIFPGSGTTDYNEKFKGKVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCASFADY W GQGTTVTVSSGGCGGGEVAACEKEVA ALEKEVA ALEKEVA ALEKLEPKSSDKTH TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGSSFLYSKLTVDKSRWQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPG
32	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGNRLNWXQQKPGKAPKRLIYATSSLDS GVPSRFSGSRSGTEFTLTISLQPEDFVTYYCLOYASSPFTFGQGKTLEIKGGGSGG GGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLEWIGYI YPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCAIPDRSGYAW FIYWGQGTЛTVSSGGCGGKKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE
33	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTRH TGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGGSG GGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAPDHIFSIHWMQWVRQAPGQGLEWWMG EIFPGSGTTDYNEKFKGKVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCASFADY W GQGTTVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSRVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTICNVDPKPKNTKVD KRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLG
34	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGNRLNWXQQKPGKAPKRLIYATSSLDS GVPSRFSGSRSGTEFTLTISLQPEDFVTYYCLOYASSPFTFGQGKTLEIKGGGSGG GGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLEWIGYI YPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCAIPDRSGYAW FIYWGQGTЛTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLISKADYEEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
35	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTRH TGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGGSG GGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAPDHIFSIHWMQWVRQAPGQGLEWWMG EIFPGSGTTDYNEKFKGKVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCASFADY W GQGTTVTVSSGGCGGGEVAACEKEVA ALEKEVA ALEKEVA ALEKESKYGPPCPP CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTTPVLDSGSSFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
36	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGNRLNWXQQKPGKAPKRLIYATSSLDS GVPSRFSGSRSGTEFTLTISLQPEDFVTYYCLOYASSPFTFGQGKTLEIKGGGSGG GGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLEWIGYI YPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCAIPDRSGYAW FIYWGQGTЛTVSSGGCGGKKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE
37	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTRH TGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGGSG GGGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFSFSTFFIHWVRRPQGLEWIGRI DPNSGATKYNEKFEKSVTLTRDTSISTAYMELSLRSDDTA VYYCARGEDLLIRT DALDYWGQGTSVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSRVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQYIICNVNHNK PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTC

	VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
38	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNAAGIDVAWVQQKPGKAPKLLIYSKSNRYTGVPSTRFSGSGSTDFLTISSLQPEDFADYYCLQYRSYPRTFGGGKLEIKGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTDQTIHWMRQAPGGLEWIGYIYPRDSDPKYENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAIPDRSGYAWFIYWGQGTLLTVVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLTKADYKHKVYACEVTHQGLSPPVTKSFNRGEC
39	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWVQQKPGKVPKLLIYWASTRH TGVPSTRFSGSGSRTDFLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSFSTFFIHWVWRQRPQGGLEWIGRIDPNSGATKYNEKFESKVTLTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARGEDLLIRTDALDYWGQGTSTVTVSSGGCGGGEVAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALEKLEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
40	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNAAGIDVAWVQQKPGKAPKLLIYSKSNRYTGVPSTRFSGSGSRTDFLTISSLQPEDFADYYCLQYRSYPRTFGGGKLEIKGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTDQTIHWMRQAPGGLEWIGYIYPRDSDPKYENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAIPDRSGYAWFIYWGQGTLLTVVSSGGCGGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE
41	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWVQQKPGKVPKLLIYWASTRH TGVPSTRFSGSGSRTDFLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSFSTFFIHWVWRQRPQGGLEWIGRIDPNSGATKYNEKFESKVTLTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARGEDLLIRTDALDYWGQGTSTVTVSSGGGSGASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYITCNDVHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVYVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
42	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNAAGIDVAWVQQKPGKAPKLLIYSKSNRYTGVPSTRFSGSGSRTDFLTISSLQPEDFADYYCLQYRSYPRTFGGGKLEIKGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTDQTIHWMRQAPGGLEWIGYIYPRDSDPKYENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAIPDRSGYAWFIYWGQGTLLTVVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLTKADYKHKVYACEVTHQGLSPPVTKSFNRGEC
43	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWVQQKPGKVPKLLIYWASTRH TGVPSTRFSGSGSRTDFLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSFSTFFIHWVWRQRPQGGLEWIGRIDPNSGATKYNEKFESKVTLTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARGEDLLIRTDALDYWGQGTSTVTVSSGGCGGGEVAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALEKESKYGPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
44	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNAAGIDVAWVQQKPGKAPKLLIYSKSNRYTGVPSTRFSGSGSRTDFLTISSLQPEDFADYYCLQYRSYPRTFGGGKLEIKGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTDQTIHWMRQAPGGLEWIGYIYPRDSDPKYENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAIPDRSGYAWFIYWGQGTLLTVVSSGGCGGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE
45	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWVQQKPGKVPKLLIYWASTRH TGVPSTRFSGSGSRTDFLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSFSTFFIHWVWRQAPGGLEWIGRI

	DPNSGATKYNEKFESRVMTMRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCARGEDLLIRT DALDYWGQGTSVTVSSLGGGSGASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
46	DIQMTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQNAAGIDVAWFQQKPGKAPKLLIYKSNRY TGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYRSYPRTFGQGTKLEIKGGGS GGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTDQTIHWMRQAPGGGLEWIG YIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAIPDRSGY AWFIYWGQGT LTVVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNIFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
47	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTRH TGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGGSG GGGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSFSTFFIHVWRQAPGGGLEWIGRI DPNSGATKYNEKFESRVMTMRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCARGEDLLIRT DALDYWGQGTSVTVSSGGCGGGEVAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALEKLEP KSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG
48	DIQMTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQNAAGIDVAWFQQKPGKAPKLLIYKSNRY TGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYRSYPRTFGQGTKLEIKGGGS GGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTDQTIHWMRQAPGGGLEWIG YIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAIPDRSGY AWFIYWGQGT LTVVSSGGCGGKVAACEKEVAALKEKVAALKEKVAALKE VAALKE
49	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTRH TGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGGSG GGGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSFSTFFIHVWRQAPGGGLEWIGRI DPNSGATKYNEKFESRVMTMRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCARGEDLLIRT DALDYWGQGTSVTVSSLGGGSGASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVVPSSSLGTQTYTCNVDHK PSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLGLG
50	DIQMTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQNAAGIDVAWFQQKPGKAPKLLIYKSNRY TGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYRSYPRTFGQGTKLEIKGGGS GGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTDQTIHWMRQAPGGGLEWIG YIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAIPDRSGY AWFIYWGQGT LTVVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNIFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
51	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTRH TGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGGSG GGGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSFSTFFIHVWRQAPGGGLEWIGRI DPNSGATKYNEKFESRVMTMRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCARGEDLLIRT DALDYWGQGTSVTVSSGGCGGGEVAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALEKESK YGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSLG
52	DIQMTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQNAAGIDVAWFQQKPGKAPKLLIYKSNRY TGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYRSYPRTFGQGTKLEIKGGGS GGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTDQTIHWMRQAPGGGLEWIG YIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAIPDRSGY

	AWFIYWGGQTLVTVSSGGCGGGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE
53	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGNRLSWLQQEPGKAPKRLIYATSSLDS GVPSRFSGSRSGTEFTLTISLQPEDFVTYYCLOYASSPFTFGQGTKLEIKGGGSGG GGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLEWIGYI YPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSED AVVYCAIPDRSGYAW FIYWGGQTLVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSC VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
54	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTRH TGVPFRFSGSGSRDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGGSG GGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCAPDHIFSIHWMQWVRQAPGQGLEWIMG EIFPGSGTTDYNEFKGKVTITVDKSTSTAYMELSSLRSED AVVYCASGAFDYW GQGTTVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTTLTKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
55	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGNRLSWLQQEPGKAPKRLIYATSSLDS GVPSRFSGSRSGTEFTLTISLQPEDFVTYYCLOYASSPFTFGQGTKLEIKGGGSGG GGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLEWIGYI YPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSED AVVYCAIPDRSGYAW FIYWGGQTLVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVV QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG
56	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTRH TGVPFRFSGSGSRDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGGSG GGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCAPDHIFSIHWMQWVRQAPGQGLEWIMG EIFPGSGTTDYNEFKGKVTITVDKSTSTAYMELSSLRSED AVVYCASGAFDYW GQGTTVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTTLTKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
57	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGNRLNWWYQQKPGKAPKRLIYATSSLDS GVPSRFSGSRSGTEFTLTISLQPEDFVTYYCLOYASSPFTFGQGTKLEIKGGGSGG GGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLEWIGYI YPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSED AVVYCAIPDRSGYAW FIYWGGQTLVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSC VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
58	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTRH TGVPFRFSGSGSRDFTLTISLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGGSG GGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCAPDHIFSIHWMQWVRQAPGQGLEWIMG EIFPGSGTTDYNEFKGKVTITVDKSTSTAYMELSSLRSED AVVYCASGAFDYW GQGTTVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTTLTKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
59	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGNRLNWWYQQKPGKAPKRLIYATSSLDS GVPSRFSGSRSGTEFTLTISLQPEDFVTYYCLOYASSPFTFGQGTKLEIKGGGSGG GGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLEWIGYI YPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSED AVVYCAIPDRSGYAW FIYWGGQTLVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSC VMHEALHNHYTQKSLSLSPG

	QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKLSLSLGLG
60	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTRH TGVPSTRFSGSGSRDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGGSG GGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKAPDHIFSIHWMQWVRQAPGQGLEWIMG EIFPSSGTDDYNEKFKGKVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCASGAFDYW GQGTITVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLTKADYKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
61	DIQMTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQNAIDVAWFQKPGKAPKLLIYSKSNRY TGVPSTRFSGSGSRDFTLTISSLQPEDFADYYCLQYRSYPRTFGGGTKLEIKGGGS GGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLEWIG YIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAIPDRSGY AWFIYWGQGTITVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKRVKPKSCKDTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMH EALHNHYTQKLSLSLSPG
62	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTRH TGVPSTRFSGSGSRDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGGSG GGGQVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYSFSTFFIHWVRQRPQGGLEWIGRI DPNSGATKYNEKFESKVTLTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARGEDLLIRT DALDYWGQGTSTVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLTKADYKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
63	DIQMTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQNAIDVAWFQKPGKAPKLLIYSKSNRY TGVPSTRFSGSGSRDFTLTISSLQPEDFADYYCLQYRSYPRTFGGGTKLEIKGGGS GGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLEWIG YIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAIPDRSGY AWFIYWGQGTITVTVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNDHK PSNTKVDKRVESKYGPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKLSLSLGLG
64	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTRH TGVPSTRFSGSGSRDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGGSG GGGQVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYSFSTFFIHWVRQRPQGGLEWIGRI DPNSGATKYNEKFESKVTLTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARGEDLLIRT DALDYWGQGTSTVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLTKADYKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
65	DIQMTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQNAIDVAWFQKPGKAPKLLIYSKSNRY TGVPSTRFSGSGSRDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYRSYPRTFGQGTLEIKGGGS GGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFTDQTIHWMRQAPGQGLEWIG YIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAIPDRSGY AWFIYWGQGTITVTVSSI.GGGSGASTKGPSVFPL.APSSKSTSGGTAAL.GCI.VKDYF PEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKRVKPKSCKDTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMH EALHNHYTQKLSLSLSPG
66	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTRH TGVPSTRFSGSGSRDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGGSG GGGQVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYSFSTFFIHWVRQAPGQGLEWIGRI DPNSGATKYNEKFESRVMTTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARGEDLLIRT

	DALDYWGQGTSVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
67	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNAIDVAWFQQKPGKAPKLLIYSKSNRY TGVPSRFSGSGGTDFLTISSLQPEDFATYYCLQYRSYPRTFGQGTLEIKGGGS GGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDQTIHWMRQAPGGLEWIG YIYPRDDSPKYNENFKGKVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCAIPDRSGY AWFIYWGQGLTVVSSLGGGSGASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPHK PSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKLSLSLG
68	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASRDVAIAVAWYQQKPGKVPKLLIYWASTRH TGVPSRFSGSGSRDFTLTISSLQPEDVADYFCHQYSSYPFTFGSGTKLEIKGGGSG GGGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFSTFFIHWVRQAPGGLEWIGRI DPNSGATKYNEKFESRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSDDTAVYYCARGEDLLIRT DALDYWGQGTSVTVSSLGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
69	GGGSGGGG
70	LGGGSG
71	FNRGEC
72	VEPKSC
73	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAP EFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSDGGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLG
74	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAP EFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKISKAKGQ PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSDGGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLG
75	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSL G
76	EPKSCDKTHTCPPCP
77	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
78	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSL GK
79	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSL G
80	MDDSTEREQSRLTSLCKKREEMKLEKCVSILPRKESPSVRSSKDGKLLAATLLLA

	LLSCCLTVVSYFYQVAALQGDLASLRAELQGHHAELPAGAGAPKAGLEEAPAVT AGLKIFEPAPGEGNSSQNSRNKRAVQGPEETVTQDCLQIADSETPTIQKGSYTF VPWLLSFKRGSALKEKENKILVKETGYFFIYGQVLYTDKTYAMGHLIQRKKVHV FGDELSLVTLFRCIQNMPETLPNNSCYSAGIAKLEEGDELQLAIPRENAQISLDGD VTFFGALKLL
81	MLGSRAVMLLLLWPWTAQGRAVPGGSSPAWTQCQQLSQKLCTLAWSAHLVGH MDLREEGDEETTNDVPHIQCGDGDQPGLRDNSQFCLQRIHQGLIFYEKLLGSDIF TGEPSSLPDSVPVQGLHASLLGLSLLQPEGHHWETQQIPSLSPSQPWQRLRLRFKI LRSLQAFVAVAAARVFAHGAATLSP
82	GGCGGGEVAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK
83	GGCGGGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE
84	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCAPDHIFSIHWMQWVRQAPGQGLEWMGEIFP GSGTTDYNEKFKGKVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCASGAFDYWGQG TTVTVSS
85	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGNRLSWLQOEPGKAPKRLIYATSSLDS GVPSTRFSGSRSGTEFTLTISLQPEDFVTYYCLQYASSPFTFGQGTKLEIK
86	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCAPDHIFSIHWMQWVRQAPGQGLEWMGEIFP GSGTTDYNEKFKGKVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCASGAFDYWGQG TTVTVSS
87	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGNRLNWIYQKPGKAPKRLIYATSSLDS GVPSTRFSGSRSGTEFTLTISLQPEDFVTYYCLQYASSPFTFGQGTKLEIK
88	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSFSTFFIHWVRQAPGQGLEWIGRIDPNS GATKYNEKFESKVTLTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARGEDLLIRTDALD YWGQTSVTVSS
89	DIQMTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQNAIDVAWFQKPGKAPKLLIYKSNRY TGVPSTRFSGSGTDFTLTISLQPEDFADYYCLQYRSYPRTFGGGTKLEIK
90	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSFSTFFIHWVRQAPGQGLEWIGRIDPNS GATKYNEKFESRVTMTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARGEDLLIRTDALD YWGQTSVTVSS
91	DIQMTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQNAIDVAWFQKPGKAPKLLIYKSNRY TGVPSTRFSGSGTDFTLTISLQPEDFADYYCLQYRSYPRTFGGGTKLEIK
92	GGTFNNNAIN
93	GIIPMFGTAKYSQNFQG
94	SRDLLLFPHHALSP
95	QGDSLRSYYAS
96	GKNNRPS
97	SSRDSSGNHWV
98	GYTFDQTIH
99	YIYPRDDSPKYNENFKG
100	PDRSGYAWFIY
101	KASRDVAIAVA
102	WASTRHT
103	HQYSSYPFT
104	DHIFSIHWMQ
105	EIFPGSGTDDYNEKFKG
106	GAFDY
107	RASQDIGNRLS
108	ATSSLDS
109	LQYASSPFT
110	DHIFSIHWMQ
111	EIFPGSGTDDYNEKFKG
112	GAFDY
113	RASQDIGNRLN
114	ATSSLDS
115	GYSFSTFFIH
116	RIDPNSGATKYNEKFES
117	GEDLLIRTDALDY
118	KASQNAIDVA
119	SKSNRYT
120	LQYRSYPRT
121	GYSFSTFFIH

122	GRIDPNSGATKYNEKFES
123	GEDLLIRTDALDY
124	KASQNAGIDVA
125	SKSNRYT
126	LQYRSYPRT
127	ESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVVSQEDPEVQF NWXVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNYHT QKSLSLSLG
128	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWWSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQGNVFSCSVMHEALHNYHTQKSLSLSP G
129	LEPKSSDKTHTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQGNVFSCSVMHEAL HNYHTQKSLSLSPG
130	LEPKSSDKTHTCPPCP
131	GCKWDLLIKQWVCDPLGSGSATGGSGSTASSGSGSATHMLPGCKWDLLIKQWV CDPLGGGGVDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQGNVFSCSV MHEALHNYHTQKSLSLSPGK
132	QVQLQQWGAGLLKPSSETLSLTCAVYGGFSFGYYWSWIRQPPGKLEWIGELNHS GSTNYPNLSKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGYYDILTGYYYYY FDYWGQGTLVTVSS
133	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSRYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT GIPARFSGSGGTDSLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPRTFGGGTKVEIK
134	ESKYGPPCPPCP
135	GGCGGG
136	LGCGGGGS

Другие варианты осуществления изобретения.

Все описанные свойства, раскрытые в данной спецификации, могут быть объединены в любой комбинации. Каждое свойство, раскрытое в данной спецификации, может быть заменено на альтернативное свойство, которое служит той самой эквивалентной или аналогичной цели. Таким образом, если не указано иначе, каждое свойство раскрывается в данном изобретении только для примера общего ряда эквивалентных или аналогичных свойств.

Из приведенного выше описания специалист в данной области может легко определить существенные характеристики данного раскрытия изобретения и без отхода от сущности и объема этого изобретения может выполнить различные изменения и модификации изобретения для того, чтобы адаптировать его к различным применениям и условиям. Таким образом, другие варианты осуществления изобретения также находятся в пределах формулы.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, которое специфически связывает ФАВЛ (BAFF) и ИЛ-23А, содержащее первый полипептид и второй полипептид или содержащее два указанных первых полипептида и два указанных вторых полипептида, где указанные два первых полипептида связаны вместе посредством по меньшей мере одной дисульфидной связи, причем:

(А) указанный первый полипептид содержит:

(i) переменный домен легкой цепи первого иммуноглобулина (VL1), специфичный к первому белку-мишени;

(ii) переменный домен тяжелой цепи второго иммуноглобулина (VH2), специфичный ко второму целевому белку; и

(iii) шарнирную область, константную область 2 тяжелой цепи (CH2) и константную область 3 тяжелой цепи (CH3); и

(В) указанный второй полипептид содержит:

(i) переменный домен легкой цепи второго иммуноглобулина (VL2), специфичный к указанному второму белку-мишени;

(ii) переменный домен тяжелой цепи первого иммуноглобулина (VH1), специфичный к указанно-



му первому белку-мишени, причем:

а) указанные VL1 и VH1 объединяются с образованием сайта связывания, который связывает указанный первый белок-мишень;

б) указанные VL2 и VH2 объединяются с образованием сайта связывания, который связывает указанный второй белок-мишень;

в) указанная константная область 2 тяжелой цепи (CH2) содержит тирозин в позиции 252, треонин в позиции 254 и глутаминовую кислоту в позиции 256, пронумерованные согласно индексу ЕС, как у Кабата; и

д) указанный первый белок-мишень представляет собой ФАВЛ (BAFF), а указанный второй белок-мишень представляет собой ИЛ-23А, или указанный первый белок-мишень представляет собой ИЛ-23А, а указанный второй белок-мишень представляет собой ФАВЛ (BAFF), и при этом:

(i) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 2, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 1, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 4, а указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 3; или

(ii) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 4, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 3, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 2, а указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 1; или

(iii) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 89, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 88, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 4, а указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 3; или

(iv) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 4, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 3, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 89, а указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 88; или

(v) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 91, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 90, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 4, а указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 3; или

(vi) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 4, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 3, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 91, а указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 90.

2. Соединение по п.1, отличающееся тем, что указанный первый полипептид дополнительно содержит первый линкер между указанным VL1 и указанным VH2, а указанный второй полипептид дополнительно содержит второй линкер между указанными VL2 и указанным VH1.

3. Соединение по п.2, отличающееся тем, что указанный первый линкер или указанный второй линкер содержит аминокислотную последовательность GGGSGGG (SEQ ID NO: 69).

4. Соединение по п.2, отличающееся тем, что указанный первый линкер и указанный второй линкер содержат аминокислотную последовательность GGGSGGG (SEQ ID NO: 69).

5. Соединение по п.1, отличающееся тем, что указанный первый полипептид дополнительно содержит домен константной области 1 тяжелой цепи (CH1) и указанный второй полипептид дополнительно содержит домен константной области легкой цепи (CL), причем указанный CL и указанный CH1 объединяются через дисульфидную связь для того, чтобы сформировать C1 домен.

6. Соединение по п.5, отличающееся тем, что указанный первый полипептид дополнительно содержит третий линкер между указанным VH2 и указанным CH1 и указанный второй полипептид дополнительно содержит четвертый линкер между указанным VH1 и указанным CL.

7. Соединение по п.6, отличающееся тем, что указанный третий линкер или указанный четвертый линкер содержат аминокислотную последовательность LGGGSG (SEQ ID NO: 70).

8. Соединение по п.6, отличающееся тем, что указанный третий линкер и указанный четвертый линкер содержат аминокислотную последовательность LGGGSG (SEQ ID NO: 70).

9. Соединение по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанная константная область 2 тяжелой цепи (CH2) содержит аланин в позиции 234 и аланин в позиции 235, пронумерованные в соответствии с индексом ЕС как у Кабата.

10. Соединение по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что аминокислотную последовательность указанной шарнирной области, указанной константной области 2 тяжелой цепи (CH2) или указанной константной области 3 тяжелой цепи (CH3) получают из IgG1 или из IgG4.

11. Соединение по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанная шарнирная область содержит аминокислотную последовательность EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 76), аминокислотную последовательность LEPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 130) или аминокислотную последовательность ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO: 134).

12. Соединение по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанное соединение содержит два указанных первых полипептида и два указанных вторых полипептида, при этом указанные два первых полипептида объединены вместе через по меньшей мере одну дисульфидную связь.

13. Соединение по п.1, отличающееся тем, что:

(i) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, а указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; или

(ii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, а указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; или

(iii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, а указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; или

(iv) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11,

а указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; или  
 (v) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, а указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; или  
 (vi) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, а указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; или  
 (vii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, а указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; или  
 (viii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, а указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; или  
 (ix) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, а указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38; или  
 (x) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39, а указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; или  
 (xi) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, а указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42; или  
 (xii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, а указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44; или  
 (xiii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, а указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46; или  
 (xiv) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47, а указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48; или  
 (xv) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, а указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50; или  
 (xvi) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, а указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52; или  
 (xvii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, а указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; или  
 (xviii) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63, а указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64; или  
 (xix) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, а указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66; или  
 (xx) указанный первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, а указанный второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68.

14. Соединение по п.13, отличающееся тем, что указанное соединение содержит два указанных первых полипептида и два указанных вторых полипептида, причем указанные два первых полипептида связаны вместе через по меньшей мере одну дисульфидную связь, и при этом каждый указанный первый полипептид связан с одним указанным вторым полипептидом через по меньшей мере одну дисульфидную связь.

15. Соединение по п.13 или 14, отличающееся тем, что указанное соединение содержит два указанных первых полипептида и два указанных вторых полипептида, причем каждый из указанных первых полипептидов содержит СН1, шарнир, СН2 и СН3, и каждый из указанных вторых полипептидов содержит СL, и при этом шарнир, СН2 и СН3 одного из первых полипептидов объединяется с шарниром, СН2 и СН3 другого из первых полипептидов, и СН1 каждого из указанных первых полипептидов объединяется с СL одного из указанных вторых полипептидов, образуя тетравалентную молекулу.

16. Соединение по п.1, содержащее два первых полипептида и два вторых полипептида, причем указанные два первых полипептида связаны вместе посредством по меньшей мере одной дисульфидной связи, и при этом каждый указанный первый полипептид связан с одним указанным вторым полипептидом посредством по меньшей мере одной дисульфидной связи, при этом каждый из указанных первых полипептидов содержит:

(i) переменный домен легкой цепи первого иммуноглобулина (VL1), специфичный к первому белку-мишени;

(ii) переменный домен тяжелой цепи второго иммуноглобулина (VH2), специфичный к второму белку-мишени;

(iii) константную область 1 тяжелой цепи (СН1), шарнирную область, константную область 2 тяжелой цепи (СН2) и константную область 3 тяжелой цепи (СН3), и

при этом каждый из указанных вторых полипептидов содержит:

(i) переменный домен легкой цепи второго иммуноглобулина (VL2), специфичный к указанному второму белку-мишени;

(ii) переменный домен тяжелой цепи первого иммуноглобулина (VH1), специфичный к указанному первому белку-мишени;

(iii) домен константной области легкой цепи (СL),

причем шарнир, СН2 и СН3 одного из первых полипептидов объединяется с шарниром, СН2 и СН3

другого из первых полипептидов, и CH1 каждого из указанных первых полипептидов объединяется с CL каждого из вторых полипептидов с образованием тетравалентной молекулы, при этом:

а) указанные VL1 и VH1 объединяются с образованием сайта связывания, который связывает указанный первый белок-мишень;

б) указанные VL2 и VH2 объединяются с образованием сайта связывания, который связывает указанный второй белок-мишень;

в) указанная константная область 2 тяжелой цепи (CH2) содержит тирозин в позиции 252, треонин в позиции 254 и глутаминовую кислоту в позиции 256, пронумерованные согласно индексу ЕС, как у Кабата; и

д) указанный первый белок-мишень представляет собой ФАВЛ (BAFF), а указанный второй белок-мишень представляет собой ИЛ-23А, или указанный первый белок-мишень представляет собой ИЛ-23А, а указанный второй белок-мишень представляет собой ФАВЛ (BAFF), и при этом:

(i) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 2, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 1, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 4, а указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 3; или

(ii) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 4, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 3, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 2, а указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 1; или

(iii) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 89, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 88, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 4, а указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 3; или

(iv) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 4, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 3, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 89, а указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 88; или

(v) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 91, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 90, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 4, а указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 3; или

(vi) указанный VL1 содержит SEQ ID NO: 4, указанный VH1 содержит SEQ ID NO: 3, указанный VL2 содержит SEQ ID NO: 91, а указанный VH2 содержит SEQ ID NO: 90.

17. Соединение по п.16, отличающееся тем, что каждый из указанных первых полипептидов дополнительно содержит первый линкер между указанным VL1 и указанным VH2, а каждый из указанных вторых полипептидов дополнительно содержит второй линкер между указанными VL2 и указанным VH1.

18. Соединение по п.17, отличающееся тем, что указанный первый линкер или указанный второй линкер содержат аминокислотную последовательность GGGSGGGG (SEQ ID NO: 69).

19. Соединение по п.17, отличающееся тем, что указанный первый линкер и указанный второй линкер содержат аминокислотную последовательность GGGSGGGG (SEQ ID NO: 69).

20. Соединение по п.17, отличающееся тем, что каждый из указанных первых полипептидов дополнительно содержит третий линкер между указанным VH2 и указанным CH1, а каждый из указанных вторых полипептидов дополнительно содержит четвертый линкер между указанным VH1 и указанным CL.

21. Соединение по п.20, отличающееся тем, что указанный третий линкер или указанный четвертый линкер содержат аминокислотную последовательность LGGGSG (SEQ ID NO: 70).

22. Соединение по п.20, отличающееся тем, что указанный третий линкер и указанный четвертый линкер содержат аминокислотную последовательность LGGGSG (SEQ ID NO: 70).

23. Соединение по п.16, отличающееся тем, что указанная константная область 2 тяжелой цепи (CH2) содержит аланин в позиции 234 и аланин в позиции 235, пронумерованные в соответствии с индексом ЕС, как у Кабата.

24. Соединение по п.16, отличающееся тем, что аминокислотную последовательность указанной шарнирной области, указанной константной области 2 тяжелой цепи (CH2) или указанной константной области 3 тяжелой цепи (CH3) получают из IgG1 или из IgG4.

25. Соединение по п.16, отличающееся тем, что указанная шарнирная область содержит аминокислотную последовательность EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 76), аминокислотную последовательность LEPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 130) или аминокислотную последовательность ESKYGPCCPPCP (SEQ ID NO: 134).

26. Соединение по п.16, отличающееся тем, что:

(i) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; или

(ii) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; или

(iii) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; или

(iv) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; или

(v) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность

SEQ ID NO: 37 и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38; или

(vi) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41 и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42; или

(vii) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45 и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46; или

(viii) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49 и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50; или

(ix) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61 и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; или

(x) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63 и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64; или

(xi) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65 и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66; или

(xii) каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67 и каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68.

27. Композиция для связывания ФАВЛ (BAFF) и ИЛ-23А, содержащая соединение по любому из пп.1-26 и фармацевтически приемлемый носитель.

28. Способ лечения аутоиммунного или воспалительного заболевания, включающий введение субъекту:

(a) соединения по любому из пп.1-26; или

(b) фармацевтической композиции, содержащей (i) указанное соединение и (ii) фармацевтически приемлемый носитель.

29. Соединение по любому из пп.1-26, которое ингибирует функцию ФАВЛ (BAFF) и ИЛ-23 А, для лечения аутоиммунного или воспалительного заболевания.

30. Фармацевтическая композиция, содержащая:

(i) соединение по любому из пп.1-26; и

(ii) фармацевтически приемлемый носитель,

где указанная композиция предназначена для применения при лечении аутоиммунного или воспалительного заболевания.

31. Нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид по любому из пп.1-26.

32. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.31, который может быть использован для экспрессии соединения по любому из пп.1-26.

33. Вектор по п.32, дополнительно содержащий промотор, функционально соединенный с указанной нуклеиновой кислотой.

34. Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по п.31, или вектор по п.32 или 33.

35. Способ продуцирования полипептида по любому из пп.1-26, включающий получение клетки по п.34 и экспрессию указанной нуклеиновой кислоты в указанной клетке.

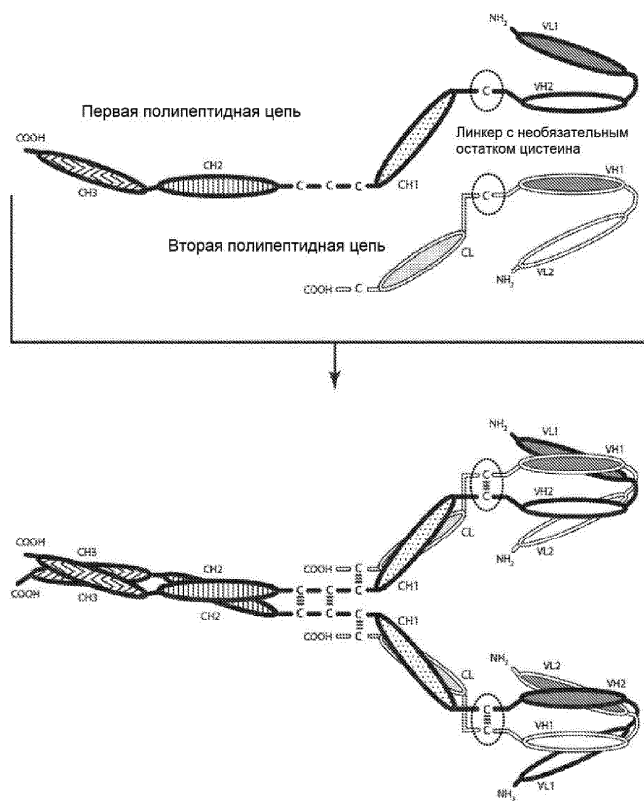
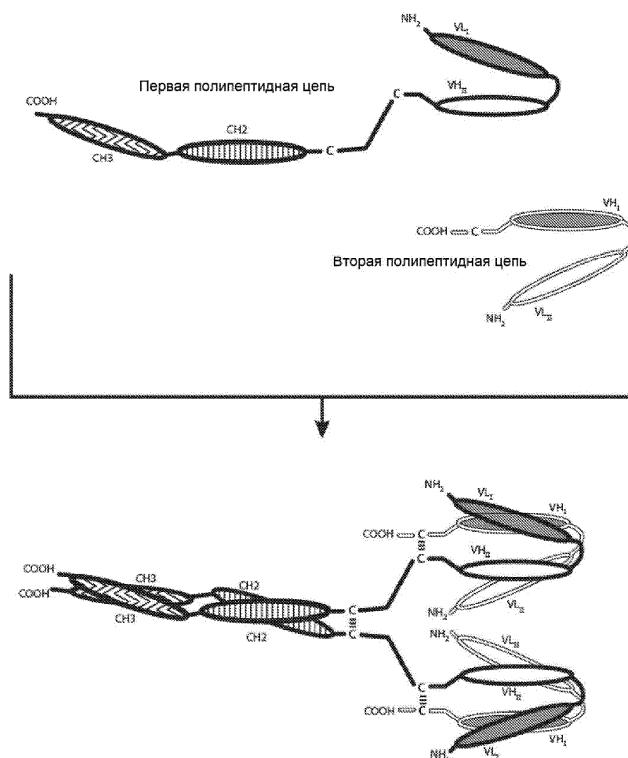
36. Способ по п.35, дополнительно включающий выделение и очистку указанного полипептида.

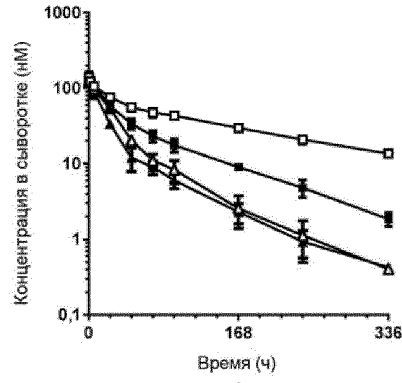
37. Способ по п.28, отличающийся тем, что аутоиммунное или воспалительное заболевание включает в себя системную красную волчанку (СКВ (SLE)), системную красную волчанку с поражением почек/волчаночным нефритом (ВН (LN)), ассоциированный с АНЦА васкулит (ААВ (AAV)), первичный синдром Шегрена (ПСШ (pSS)), хроническую болезнь "трансплантат против хозяина" (ХБТПХ (cGVHD)), системный склероз (СС (SSc)), ревматоидный артрит (РА (RA)), псориаз (Пс (Ps)), анкилозирующий спондилоартрит (АС (AS)) и псориатический артрит (ПА (PA)).

38. Соединение по п.29, отличающееся тем, что аутоиммунное или воспалительное заболевание включает в себя системную красную волчанку (СКВ (SLE)), системную красную волчанку с поражением почек/волчаночным нефритом (ВН (LN)), ассоциированный с АНЦА васкулит (ААВ (AAV)), первичный синдром Шегрена (ПСШ (pSS)), хроническую болезнь "трансплантат против хозяина" (ХБТПХ (cGVHD)), системный склероз (СС (SSc)), ревматоидный артрит (РА (RA)), псориаз (Пс (Ps)), анкилозирующий спондилоартрит (АС (AS)) и псориатический артрит (ПА (PA)).

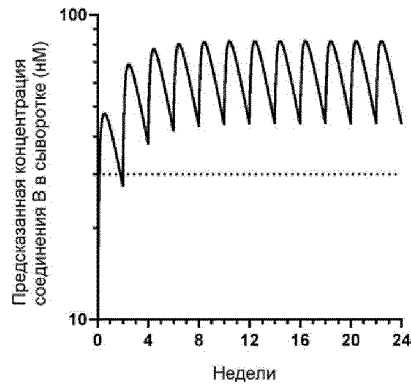
39. Фармацевтическая композиция по п.30, отличающаяся тем, что аутоиммунное или воспалительное заболевание включает в себя системную красную волчанку (СКВ (SLE)), системную красную волчанку с поражением почек/волчаночным нефритом (ВН (LN)), ассоциированный с АНЦА васкулит (ААВ

(AAV)), первичный синдром Шегрена (ПСШ (pSS)), хроническую болезнь "трансплантат против хозяина" (ХБТПХ (cGVHD)), системный склероз (СС (SSc)), ревматоидный артрит (РА (RA)), псориаз (Ps), анкилозирующий спондилоартрит (АС (AS)) и псориатический артрит (ПА (PA)).

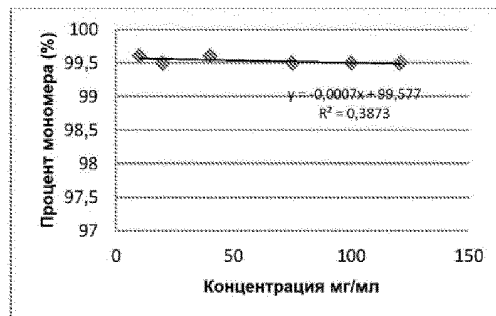




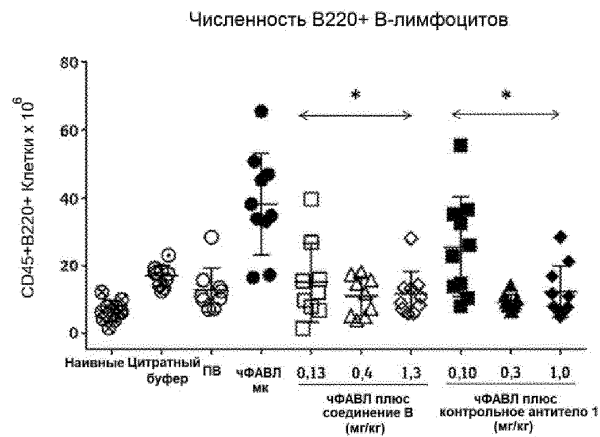
Фиг. 2



Фиг. 3

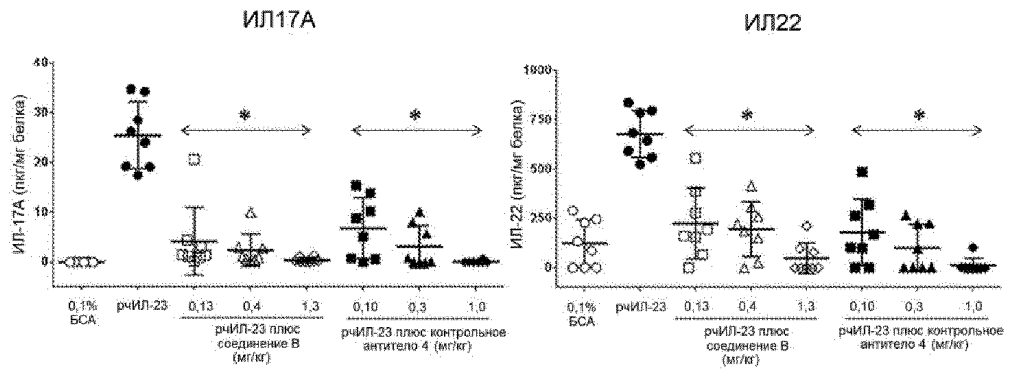


Фиг. 4



\* равно p меньше 0,05 Однофакторный дисперсионный анализ с последующим тестом множественного сравнения Дуннетта в сравнении с контролем чФАВЛмк

Фиг. 5



\* равно р меньше 0,05 Однофакторный дисперсионный анализ с последующим тестом множественного сравнения Дуннетта в сравнении с контролем рЧИЛ-23

Фиг. 6



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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