

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **041325**

(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2022.10.11**

**(21)** Номер заявки  
**201792328**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2016.04.20**

**(51)** Int. Cl. **C07K 1/22** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)

**(54) СПОСОБ ОЧИСТКИ БЕЛКОВ**

**(31)** **1506868.7**

**(32)** **2015.04.22**

**(33)** **GB**

**(43)** **2018.05.31**

**(86)** **РСТ/EP2016/058774**

**(87)** **WO 2016/169992 2016.10.27**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ЮСБ БИОФАРМА СПРЛ (BE)**

**(72)** Изобретатель:  
**Хейвуд Сэм Филип, Уайлд Гэвин  
Бэрри (GB)**

**(74)** Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

**(56)** A.E. CUNHA ET AL.: "Methanol induction optimization for scFv antibody fragment production in *Pichia pastoris*", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING., vol. 86, no. 4, 1 January 2004 (2004-01-01), pages 458-467, XP055282624, US, ISSN: 0006-3592, DOI: 10.1002/bit.20051, page 458, column 1, line 1 - line 12, page 460, column 2, line 28 - line 46

WO-A2-02059264

GARGIR A.A. ET AL.: "Single chain antibodies specific for fatty acids derived from a semi-synthetic phage display library", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA (BBA) - GENERAL SUBJECTS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1569, no. 1-3, 15 January 2002 (2002-01-15), pages

167-173, XP004341314, ISSN: 0304-4165, DOI: 10.1016/50304-4165(01)00245-8, paragraph [02.4]

DAVIES J. ET AL.: "Camelising" human antibody fragments: NMR studies on VH domains", FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 339, no. 3, 21 February 1994 (1994-02-21), pages 285-290, XP025614903, ISSN: 0014-5793, DOI: 10.1016/0014-5793(94)80432-X [retrieved on 1994-02-21], paragraph [02.3]

ZHU Z. ET AL.: "HIGH LEVEL SECRETION OF A HUMANIZED BISPECIFIC DIABODY FROM *ESCHERICHIA COLI*", BIOTECHNOLOGY. THE INTERNATIONAL MONTHLY FOR INDUSTRIAL BIOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, US, vol. 14, no. 2, 1 February 1996 (1996-02-01), pages 192-196, XP001084974, ISSN: 0733-222X, DOI: 10.1038/NBT0296-192, page 192, column 1, line 13 - line 20, page 192, column 2, line 25 - line 38

WO-A1-2010019493

WO-A2-2013068563

SELDON T.A. ET AL.: "Improved protein-A separation of VH3 fab from FC after papain digestion of antibodies", CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN, PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN, JP, vol. 34, no. 12, 1 December 1986 (1986-12-01), pages 5071-5078, XP009175386, ISSN: 0009-2363, Introduction; Results; figure 1

WO-A1-0069457

WO-A2-2010096418

WO-A1-2014096390

**(57)** Изобретение относится к способу получения антитела, содержащего домен VH3 человека, в мономерной форме. Конкретно, изобретение относится к новому способу, обеспечивающему получение мономерного антитела, содержащего домен VH3 человека, из смеси, содержащей мономерную и мультимерные формы антитела.

**B1**

**041325**

**041325 B1**

### Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области очистки белков, более конкретно - к области очистки антител.

### Уровень техники, предшествующий изобретению

В области терапевтических средств использование белков и антител и получаемых из антител молекул, в частности, непрерывно становилось необходимым и важным, и, таким образом, параллельно образовалась потребность в контролируемых производственных процессах. Коммерциализация терапевтических белков требует их продукции в больших количествах. Для этой цели белки часто экспрессируют в клетках-хозяевах, а затем перед их получением в пригодных для введения формах их необходимо выделять и очищать.

Наиболее распространенным классом молекул антител является иммуноглобулин G (IgG), гетеротетрамер, состоящий из двух тяжелых цепей и двух легких цепей. Молекулу IgG можно подразделить на две функциональные субъединицы: (1) кристаллизующийся фрагмент (Fc), который составляет концевую часть антитела и взаимодействует с рецепторами клеточной поверхности с активацией иммунного ответа; и (2) антигенсвязывающий фрагмент (Fab), который опосредует распознавание антигена. Fc-область содержит две пары константных доменов (CH2 и CH3) из двух спаренных тяжелых цепей, тогда как область Fab состоит из переменного домена с последующим константным доменом тяжелой цепи (VH и CH1 соответственно), которые спариваются с переменным и константным доменами легкой цепи (VL и CL, соответственно). Области Fc и Fab разделены шарнирной областью, которая содержит дисульфидные связи, удерживающие две цепи вместе. Полноразмерные антитела класса IgG традиционно очищали способами, которые включают этап захвата при аффинной хроматографии с использованием белка A, получаемого из *Staphylococcus aureus*. Высокая специфичность связывания белка A и Fc-области антител позволяет удалять этим способом хроматографии более 98% примесей за один этап, начиная непосредственно из сложных растворов, таких как собранные из культур клеток среды. Большой коэффициент, достигаемый на этом этапе способа, помогает упростить весь последующий процесс очистки. Как правило, после этого этапа очистки остается удалить только следовые примеси (высокомолекулярные агрегаты, остаточные белки клеток-хозяев, выщелачиваемый белок A), и, как правило, этого можно достичь за один-два последующих этапа хроматографии.

Кроме того, в антителах, которые содержат специфическую каркасную подгруппу 3 переменной области тяжелой цепи человека, описан участок "альтернативного связывания" белка A (Sasso et al. *J. Immunol.* 1991, 147:1877-1883, Human IgA and IgG F(ab')<sub>2</sub> that bind to staphylococcal protein A belong to the VHIII subgroup), также обозначаемый как домен VH3 переменной области тяжелой цепи и часто классифицируемый как вторичное взаимодействие. Хотя все пять доменов белка A (A, B, C, D, E) связываются с Fc-областью IgG, значимое связывание с VH3 демонстрируют только домены D и E. В контексте очистки IgG с использованием аффинной хроматографии с белком A, которая основана на взаимодействии между доменом Fc IgG и белком A, эти взаимодействия домена VH3 с белком A считали нежелательными, учитывая, что они влияют на профиль элюции очищаемого антитела, и разработаны и доступны на рынке альтернативные смолы, которые содержат только домен B белка A, такие как SuRe® из GE Healthcare.

Однако многие антитела и получаемые из антител молекулы, доступные в настоящее время и/или находящиеся в разработке, не содержат Fc-областей, и необходима дополнительная адаптация способов их очистки. Описанное выше связывание белка A областями VH3 могло бы обеспечить использование белка A в производстве таких антител.

Конкретным требованием к очистке антител является выделение требуемого антитела, или получаемой из антитела молекулы в мономерной форме, или по существу без молекул с более высокой молекулярной массой, таких как димеры и тримеры.

Молекулы определенных антител обладают повышенной тенденцией к формированию мультимеров, что является результатом случайного спаривания переменного домена с переменными доменами расположенных рядом молекул. Это особенно характерно для более сложных полученных из антител молекул, в которых между различными представляющими интерес доменами использованы линкерные области.

Таким образом, в данной области остается необходимость в дополнительных способах производства и очистки антител и получаемых из антител молекул в мономерной форме, в частности, когда эти молекулы не содержат Fc-область.

### Краткое описание чертежей

Фиг. 1 представляет собой хроматограмму, демонстрирующую профиль элюции A26Fab-645dsFv из смолы с белком A при элюции с градиентом pH.

На фиг. 2 представлено общее количество белка, мономерного и мультимерного A26Fab-645dsFv, присутствующее в каждой из фракций, полученных после хроматографии, приведенной на фиг. 1, как проанализировано посредством эксклюзионной ВЭЖХ.

Фиг. 3 представляет собой хроматограмму, демонстрирующую профиль элюции конструкции Fc из смолы с белком A при элюции с градиентом pH.

На фиг. 4 представлено общее количество белка, мономерной и мультимерной форм, присутствующей

шее в каждой из фракций, полученных после хроматографии, приведенной на фиг. 3, как проанализировано посредством эксклюзионной ВЭЖХ.

Фиг. 5 представляет собой хроматограмму, демонстрирующую профиль элюции A26Fab-645dsFv из смолы с белком А при элюции со ступенчатым изменением рН.

На фиг. 6 представлен анализ посредством эксклюзионной ВЭЖХ фракций, полученных после хроматографии с белком А, приведенной на фиг. 5. Точечная линия представляет анализ фракции, элюируемой при рН 3,8, тогда как непрерывная линия представляет анализ фракции, элюируемой при рН 3,0.

На фиг. 7 представлен анализ посредством невосстанавливающего SDS-PAGE фракций, получаемых после хроматографии A26Fab-645dsFv с белком А при элюции со ступенчатым изменением рН, приведенной на фиг. 5. На дорожке 1 представлены маркеры молекулярной массы, на дорожке 2 представлен образец очищенного от примесей супернатанта культуры клеток, как нанесено для хроматографии с белком А, на дорожке 3 представлена прошедшая фракция, получаемая после хроматографии с белком А, на дорожке 4 представлена фракция, получаемая после элюции при рН 3,8, и на дорожке 5 представлена фракция, получаемая после элюции при рН 3,0.

На фиг. 8 представлен анализ посредством восстанавливающего SDS-PAGE фракций, получаемых после хроматографии A26Fab-645dsFv с белком А при элюции со ступенчатым изменением рН, приведенной на фиг. 5. На дорожке 1 представлены маркеры молекулярной массы, на дорожке 2 представлен образец очищенного от примесей супернатанта культуры клеток, как нанесено для хроматографии с белком А, на дорожке 3 представлена прошедшая фракция, получаемая после хроматографии с белком А, на дорожке 4 представлена фракция, получаемая после элюции при рН 3,8, и на дорожке 5 представлена фракция, получаемая после элюции при рН 3,0.

На фиг. 9 представлен анализ посредством эксклюзионной СЭЖХ фракций, получаемых после хроматографии A26Fab-645dsFv с белком А при градиентной элюции, как описано в примере 4, демонстрирующий общее количество белка, мономерного и мультимерного A26Fab-645dsFv.

На фиг. 10 представлен анализ посредством эксклюзионной СЭЖХ фракций, получаемых после хроматографии A26Fab-645dsFv с белком А при градиентной элюции, как описано в примере 5, демонстрирующий общее количество белка, мономерного и мультимерного A26Fab-645dsFv.

На фиг. 11 представлен анализ посредством эксклюзионной СЭЖХ фракций, получаемых после хроматографии A26Fab-645dsFv с белком А при градиентной элюции, как описано в примере 6, демонстрирующий общее количество белка, мономерного и мультимерного A26Fab-645dsFv.

На фиг. 12 представлено схематическое изображение мономерного Fab-dsFv и мультимерных версий Fab-dsFv, а также их основных компонентов: Fab и dsFv. Эта диаграмма иллюстрирует возможные мономеры, димеры и тримеры. Однако фактически, когда димеры и тримеры формируют циклические структуры, все линкеры были бы одинаковой длины.

На фиг. 13-20 представлены различные последовательности молекул антител и их компонентов.

На фиг. 21 представлена хроматограмма, демонстрирующая профиль элюции TrYbe из смолы с белком А при элюции с градиентом рН.

На фиг. 22 представлен анализ посредством эксклюзионной ВЭЖХ фракций, полученных после хроматографии с белком А, приведенной на фиг. 21.

На фиг. 23 представлен анализ посредством невосстанавливающего (А) и восстанавливающего (В) SDS PAGE фракций, получаемых после хроматографии TrYbe с белком А при элюции с градиентом рН, приведенной на фиг. 21.

На фиг. 24 представлено общее количество белка, мономерного и мультимерного TrYbe, присутствующего в каждой из фракций, полученных после хроматографии, приведенной на фиг. 21, как проанализировано посредством эксклюзионной ВЭЖХ.

На фиг. 25 представлена хроматограмма, демонстрирующая профиль элюции YUbe из смолы с белком А при элюции с градиентом рН.

На фиг. 26 представлен анализ посредством эксклюзионной ВЭЖХ фракций, полученных после хроматографии с белком А, приведенной на фиг. 25.

На фиг. 27 представлен анализ посредством невосстанавливающего (А) и восстанавливающего (В) SDS PAGE фракций, получаемых после хроматографии YUbe с белком А при элюции с градиентом рН, приведенной на фиг. 25.

На фиг. 28 представлено общее количество белка, мономерного и мультимерного YUbe, присутствующего в каждой из фракций, полученных после хроматографии, приведенной на фиг. 25, как проанализировано посредством эксклюзионной ВЭЖХ.

На фиг. 29 представлено схематическое изображение альтернативных мономерных форматов Fab-scFv, поддающихся очистке способом по изобретению.

На фиг. 30 представлено схематическое изображение альтернативных мономерных форматов Fab-2x dsscFv (TrYbe®) и Fab-dsscFv-dsFv, поддающихся очистке способом по изобретению.

#### **Подробное описание изобретения**

Настоящее изобретение удовлетворяет указанную выше потребность, предоставляя новый способ получения антитела, содержащего домен VH3 человека, в мономерной форме. В настоящее время при

связывании доменов VH3 человека и белка А выявлен эффект avidности. Это открытие является неожиданным, учитывая, что оно не описано для взаимодействия Fc-областей и белка А и привело к разработке нового способа, который обеспечивает выделение мономерных антител, содержащих домен VH3 человека, из смеси, содержащей мономерные и мультимерные формы антитела.

В первом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу получения антитела, содержащего домен VH3 человека, в мономерной форме, включающему:

- a) нанесение смеси, содержащей антитело, содержащее домен VH3 человека, в мономерной и мультимерной форме, на хроматографический материал, содержащий белок А, где указанный белок А содержит домен D и/или E, в условиях, которые обеспечивают связывание указанного антитела с белком А; и
- b) выделение антитела, содержащего домен VH3 человека, в мономерной форме, где антитело, содержащее домен VH3 человека, не содержит Fc-области.

Во втором альтернативном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу получения антитела, содержащего домен VH3 человека, включающему:

- a) экспрессию антитела в клетке-хозяине;
- b) получение смеси, содержащей антитело, клетки-хозяева и другие примеси;
- c) очистку антитела с использованием по меньшей мере этапа хроматографии с белком А, где указанный белок А содержит домен D и/или E; и
- d) получение антитела, содержащего домен VH3 человека, где антитело, содержащее домен VH3 человека, не содержит Fc-области.

В третьем альтернативном варианте осуществления изобретение относится к способу отделения антитела, содержащего домен VH3 человека, в мономерной форме от антитела в мультимерной форме, включающему:

- a) нанесение смеси, содержащей антитело, содержащее домен VH3 человека, в мономерной и мультимерной форме, на содержащий белок А хроматографический материал, где указанный белок А содержит домен D и/или E;
- b) обеспечение связывания указанного антитела с белком А;
- c) нанесение элюирующего буфера, который селективно разрывает связывание антитела в мономерной форме;
- d) получение образующегося в результате элюата; и необязательно
- e) нанесение второго элюирующего буфера, который разрывает связывание антитела в мультимерной форме, и получение этого второго элюата, где антитело, содержащее домен VH3 человека, не содержит Fc-области.

В четвертом альтернативном варианте осуществления изобретение относится к способу отделения антитела, содержащего домен VH3 человека, в мономерной форме от антитела в мультимерной форме, включающему:

- a) нанесение смеси, содержащей антитело, содержащее домен VH3 человека, в мономерной и мультимерной форме, на содержащий белок А хроматографический материал, где указанный белок А содержит домен D и/или E;
- b) обеспечение связывания антитела в мультимерной форме;
- c) получение антитела в мономерной форме в фильтрате; и необязательно
- d) нанесение элюирующего буфера, который селективно разрушает связывание антитела в мультимерной форме; и
- e) получение элюата, образующегося после d), где антитело, содержащее домен VH3 человека, не содержит Fc-области.

В дополнительном варианте осуществления способ по изобретению дополнительно включает один или несколько этапов хроматографии для удаления оставшихся примесей. Как правило, на таких этапах используют этап неаффинной хроматографии с использованием твердой фазы с соответствующей функциональностью для использования в гель-фильтрационной хроматографии, катионообменной хроматографии, анионообменной хроматографии, хроматографии со смешанным режимом, гидрофобной хроматографии и гидрофобной хроматографии с индукцией заряда. Их можно проводить в режиме связывания и режиме элюции или в проточном режиме. В проточном режиме примеси связываются или обладают сниженной подвижностью в твердой фазе, тогда как требуемый белок выделяют в элюате или в проточной фракции. Подходящие твердые фазы для применения в хроматографии, такие как гранулированные смолы или мембраны с подходящей функциональностью, легкодоступны специалистам в данной области. В конкретном варианте осуществления способа по изобретению способ дополнительно включает этап анионообменной хроматографии, проводимый в проточном режиме.

В дополнительном конкретном варианте осуществления способ по изобретению включает этап хроматографии с белком А с последующим первым этапом хроматографии, который представляет собой анионообменную хроматографию с получением фильтрата, содержащего белок, и вторым этапом хроматографии, который представляет собой катионообменную хроматографию, после которой получают элюат, содержащий белок.

Альтернативно, способ по изобретению включает хроматографию с белком А с последующим пер-

вым этапом хроматографии, который представляет собой катионообменную хроматографию, после которой получают элюат, содержащий белок, и вторым этап хроматографии, который представляет собой анионообменную хроматографию с получением фильтрата, содержащего белок.

Как правило, хроматографию с белком А проводят в режиме связывания или элюции, где связывание требуемого белка с твердой фазой позволяет примесям, таким как примесные белки, проходить через хроматографическую среду, в то время как требуемый белок остается связанным с твердой фазой. Затем связанный требуемый белок получают из твердой фазы с использованием элюирующего буфера, который нарушает механизм, посредством которого требуемый белок связан с указанной твердой фазой.

В дополнительном варианте осуществления способ по изобретению включает добавление на содержащий белок А хроматографический материал после нанесения смеси, содержащей антитело, содержащее домен VH3 человека, в мономерной и мультимерной форме, первого раствора так, что несвязанный материал переходит в раствор.

В дополнительном варианте осуществления способа по изобретению элюирующий буфер наносят на содержащий белок А хроматографический материал так, что высвобождается связанное антитело.

В дополнительном варианте осуществления способа по изобретению элюат, получаемый после хроматографии с белком А, относительно наносимой смеси обогащен мономерным антителом по сравнению с мультимерным антителом.

Как понятно специалисту в данной области, в контексте настоящего изобретения белок в элюате, получаемом после хроматографии с белком А, содержит повышенный процент антител в мономерной форме относительно смеси перед этапом хроматографии с белком А.

В конкретном варианте осуществления элюат, получаемый после хроматографии с белком А, содержит по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70, 75, 80, 85 или по меньшей мере 90% антитела, содержащего домен VH3 человека, в мономерной форме.

В дополнительном альтернативном варианте осуществления, где необходимо выделить антитело в мультимерной форме, белок, содержащийся в элюате после хроматографии с белком А, содержит повышенный процент антитела в мультимерной форме относительно смеси перед этапом хроматографии с белком А. В конкретном варианте осуществления элюат, получаемый после хроматографии с белком А, содержит по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70, 75, 80, 85 или по меньшей мере 90% антитела, содержащего домен VH3 человека, в мультимерной форме.

В дополнительном варианте осуществления способа по изобретению указанный белок А представляет собой нативный рекомбинантный белок А.

Существует множество хроматографических материалов, доступных специалисту в данной области, содержащих указанный нативный рекомбинантный белок А, таких как, например, MabSelect® (GE Healthcare), Absolute® (Novasep), Captiv A® (Repligen) или Amsphere® (JSR).

В конкретном варианте осуществления способа по изобретению связанное антитело высвобождают из содержащего белок А хроматографического материала посредством нанесения элюирующего буфера с pH, подходящим для нарушения связывания антитела. Указанный pH зависит от конкретной молекулы, и, как правило, его эмпирически определяет специалист в данной области и корректирует для достижения требуемого конечного показателя, т.е. желательным может являться получение из нанесенной смеси наибольшего возможного количества мономера или может являться желательным получение мономера с наибольшей возможной чистотой. В конкретном варианте осуществления способа по изобретению pH элюирующего буфера составляет pH от 3,0 до 4,5, предпочтительно pH от 3,2 до 4,3, pH от 3,5 до 4, предпочтительно pH от 3,6 до 3,9 или pH 3,8.

Буферы, пригодные для использования в качестве промывочных и элюирующих буферов в хроматографии с белком А, легкодоступны в данной области, и в качестве неограничивающих примеров их можно выбирать из фосфатно-солевого буфера (PBS), Tris, гистидинового, ацетатного, цитратного буферов или буферов MES (имидазол 2-(N-морфолино)этансульфонової кислоты), BES (N,N-(бис-2-гидроксиэтил)-2-аминоэтансульфонової кислоты), MOPS (3-(N-морфолино)пропансульфонової кислоты) или HEPES (N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфонової кислоты).

В конкретном варианте осуществления способ по изобретению включает нанесение смеси, содержащей антитело, содержащее домен VH3 человека, в мономерной и мультимерной форме, на содержащий белок А хроматографический материал, где указанный белок А содержит домен D и/или E, в условиях, которые обеспечивают связывание указанного антитела с белком А; нанесение первого раствора или промывочного буфера так, что в раствор переходит несвязанный материал; нанесение элюирующего буфера на содержащий белок А хроматографический материал так, что высвобождается связанное антитело; и получение антитела, содержащего домен VH3 человека, в мономерной форме, где полученный раствор обогащен антителом, содержащим домен VH3, в мономерной форме, относительно нанесенной смеси и где антитело, содержащее домен VH3 человека, не содержит Fc-области.

В дополнительном конкретном варианте осуществления способ по изобретению включает нанесение смеси, содержащей антитело, содержащее домен VH3 человека, в мономерной и мультимерной форме, на содержащий белок А хроматографический материал, где указанный белок А содержит домен D

и/или E, в условиях, которые обеспечивают связывание указанного антитела с белком А; нанесение первого раствора или промывочного буфера так, что в раствор переходит несвязанный материал; нанесение элюирующего буфера на содержащий белок А хроматографический материал так, что высвобождается связанное антитело в мономерной форме; и получение антитела, содержащего домен VH3 человека, в мономерной форме, где полученный раствор обогащен антителом, содержащим домен VH3, в мономерной форме, относительно нанесенной смеси и где антитело, содержащее домен VH3 человека, не содержит Fc-области.

В дополнительном варианте осуществления изобретения антитело, содержащее домен VH3, выбрано из Fab', F(ab')<sub>2</sub>, scFv, Fab-Fv, Fab-scFv, Fab-(scFv)<sub>2</sub>, Fab-(Fv)<sub>2</sub>, диатела, триотела и тетратела.

В дополнительном варианте осуществления способа по изобретению антитело, содержащее домен VH3, содержит по меньшей мере два домена VH3 человека.

В дополнительном варианте осуществления способа по изобретению антитело, содержащее домен VH3 человека, специфически связывается OX40.

В одном из вариантов осуществления способа по изобретению антитело представляет собой FabFv или его стабилизированную дисульфидными формами форму, как описано в РСТ/EP2014/074409, включенного в настоящий документ в качестве ссылки.

В одном из вариантов осуществления антитело содержит связывающий домен, специфичный к сывороточному альбумину человека, конкретно, с CDR или переменными областями, как описано в WO 2013/068563, включенного в настоящий документ в качестве ссылки.

В дополнительном варианте осуществления способа по изобретению указанное антитело, содержащее домен VH3 человека, содержит:

CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, как определено в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3 соответственно; и

CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, как определено в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно.

В дополнительном конкретном варианте осуществления способа по изобретению антитело представляет собой A26Fab-645dsFv, которое содержит фрагмент Fab, который специфически связывается с OX40, и фрагмент Fv, который специфически связывается с сывороточным альбумином, где оба фрагмента стабилизированы дисульфидной связью, как определено в WO 2013/068563, включенном в настоящий документ в качестве ссылки.

В дополнительном конкретном варианте осуществления способ по изобретению включает нанесение смеси, содержащей A26Fab-645dsFv в мономерной и мультимерной форме, на содержащий белок А хроматографический материал, где указанный белок А содержит домен D и/или E, в условиях, которые обеспечивают связывание указанного антитела с белком А; нанесение первого раствора или промывочного буфера так, что в раствор переходит несвязанный материал; нанесение элюирующего буфера на содержащий белок А хроматографический материал так, что высвобождается связанное антитело в мономерной форме; и получение A26Fab-645dsFv в мономерной форме, где полученный раствор обогащен A26Fab-645dsFv в мономерной форме относительно нанесенной смеси и где pH элюирующего буфера составляет от 3,5 до 4,2, предпочтительно от 3,6 до 4,1, от 3,7 до 4,0, предпочтительно от 3,8 до 3,9 или 3,8.

В дополнительном конкретном варианте осуществления способ по изобретению дополнительно включает нанесение второго элюирующего буфера на содержащий белок А хроматографический материал с получением связанного A26Fab-645dsFv в мультимерной форме, где pH указанного второго элюирующего буфера представляет собой pH ниже 3,5, предпочтительно pH ниже 3,4, предпочтительно pH ниже 2,8-3,2, предпочтительно pH 2,9-3,1, предпочтительно pH 3,0.

Таким образом, настоящее изобретение относится к слитому белку биспецифического антитела, которое связывается с OX40 человека и сывороточным альбумином человека, включающему:

тяжелую цепь, содержащую последовательно от N-конца первый переменный домен тяжелой цепи (VH#1), домен CH1 и второй переменный домен тяжелой цепи (VH#2);

легкую цепь, содержащую последовательно от N-конца первый переменный домен легкой цепи (VL#1), домен CL и второй переменный домен легкой цепи (VL#2),

где указанные тяжелая и легкие цепи выровнены так, что VH#1 и VL#1 формируют первый антигенсвязывающий участок, а VH#2 и VL#2 формируют второй антигенсвязывающий участок;

где, конкретно, антиген, связывающийся с первым антигенсвязывающим участком, представляет собой OX40 человека, а антиген, связывающийся со вторым антигенсвязывающим участком, представляет собой сывороточный альбумин человека;

где первый переменный домен тяжелой цепи (VH#1) содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, для CDR-H1, последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, для CDR-H2 и последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, для CDR-H3, а первый переменный домен легкой цепи (VL#1) содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4, для CDR-L1, последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5, для CDR-L2, и последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6, для CDR-L3;

где второй вариабельный домен тяжелой цепи (VH#2) содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11, а второй вариабельный домен легкой цепи (VL#2) содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12, и второй вариабельный домен тяжелой цепи (VH#2) и второй вариабельный домен легкой цепи (VL#2) связаны дисульфидной связью.

В одном из вариантов осуществления между доменом CH1 и вторым вариабельным доменом тяжелой цепи (VH#2) присутствует пептидный линкер. В одном из вариантов осуществления пептидный линкер присутствует между доменом CL и вторым вариабельным доменом легкой цепи (VL#1). В одном из вариантов осуществления первый вариабельный домен тяжелой цепи (VH#1) содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8. В одном из вариантов осуществления первый вариабельный домен легкой цепи (VL#1) содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7. В одном из вариантов осуществления тяжелая цепь содержит или состоит из последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 15. В одном из вариантов осуществления легкая цепь содержит или состоит из последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 16.

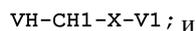
Таким образом, в одном из вариантов осуществления предоставлен слитый белок биспецифического антитела, который связывается с OX40 человека и сывороточным альбумином человека, с тяжелой цепью, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 15, и легкой цепью, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 16.

В одном из вариантов осуществления молекула антитела, например формата Fab-dsFv, представляет собой молекулу антитела, описанную в PCT/EP2014/074409 или WO 2014/019727, включенных в настоящий документ в качестве ссылки.

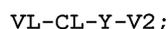
В другом варианте осуществления молекула антитела представляет собой слитый белок формата Fab-scFv, описанный в WO 2013/068571, включенном в настоящий документ в качестве ссылки.

В другом варианте осуществления молекула антитела представляет собой полиспецифическую молекулу антитела, содержащую или состоящую из:

a) полипептидной цепи формулы (I)



b) полипептидной цепи формулы (II)



где VH представляет собой вариабельный домен тяжелой цепи;

CH1 представляет собой домен константной области тяжелой цепи, например ее домен 1;

X представляет собой связь или линкер;

Y представляет собой связь или линкер;

V1 представляет собой dsFv, sdAb, scFv или dsscFv;

VL представляет собой вариабельный домен легкой цепи;

CL представляет собой домен из константной области легкой цепи, такой как C<sub>кappa</sub>;

V2 представляет собой dsFv, sdAb, scFv или dsscFv,

где по меньшей мере один из V1 или V2 представляет собой dsFv или dsscFv, описанный в WO 2015/197772, включенном в настоящий документ в качестве ссылки.

В одном конкретном варианте осуществления молекула антитела представляет собой молекулу полиспецифического антитела формата Fab-2x dsscFv, описанного в WO 2015/197772, включенном в настоящий документ в качестве ссылки.

В дополнительном конкретном варианте осуществления молекула полиспецифического антитела формата Fab-2x dsscFv представляет собой трехвалентное антитело, т.е. каждый из Fv связывается с разным эпитопом.

В дополнительном конкретном варианте осуществления формат молекулы полиспецифического антитела представляет собой формат Fab-dsscFv-dsFv, как описано в WO 2015/197772, включенном в настоящий документ в качестве ссылки.

Антитело, которое можно получать способом по настоящему изобретению, можно получать посредством культивирования эукариотических клеток-хозяев, трансфицированных одним или несколькими экспрессирующими векторами, кодирующими рекомбинантное антитело. Предпочтительно эукариотические клетки-хозяева представляют собой клетки млекопитающих, более предпочтительно клетки китайского хомяка (CHO).

Клетки млекопитающих можно культивировать в любой среде, которая поддерживает их рост и экспрессию антител в них, предпочтительно среда представляет собой среду определенного химического состава, которая не содержит полученных у животных продуктов, таких как сыворотка животного и пептон. Существуют различные среды для культивирования клеток, доступные специалисту в данной области, содержащие различные комбинации витаминов, аминокислот, гормонов, факторов роста, ионов, буферов, нуклеозидов, глюкозы или эквивалентного источника энергии, находящихся в соответствующих концентрациях, обеспечивающих рост клеток и продукцию белка. В среду для культивирования клеток в соответствующих концентрациях в различные моменты в течение цикла культивирования клеток можно включать дополнительные компоненты сред для культивирования клеток, которые известны специалистам в данной области.

Культивирование клеток млекопитающих можно проводить в любом подходящем контейнере, таком как перемешиваемая колба или биореактор, которым можно или нельзя оперировать в режиме культивирования с периодической подпиткой в зависимости от требуемого масштаба производства. Эти биореакторы могут представлять собой реакторы типа смесительного бака или реактора с подачей воздуха снизу. Доступны различные крупномасштабные биореакторы с емкостью более 1000-50000 л, предпочтительно 5000-20000 л или до 10000 л. Альтернативно, для производства антитела способом по изобретению также можно использовать биореакторы меньшего масштаба, например от 2 до 100 л.

Как правило, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые можно производить способами по настоящему изобретению, находятся в супернатанте культуры клеток-хозяев млекопитающих, как правило, культуры клеток СНО. При обработке культур СНО, где требуемый белок, такой как антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, секретируется в супернатант, указанный супернатант собирают известными в данной области способами, как правило, посредством центрифугирования.

Таким образом, в конкретном варианте осуществления изобретения способ перед очисткой белка включает этап центрифугирования и получения супернатанта. В дополнительном конкретном варианте осуществления указанное центрифугирование представляет собой непрерывное центрифугирование. Во избежание сомнения супернатант означает жидкость, находящуюся выше осажденных клеток, полученных после центрифугирования культуры клеток.

Альтернативно, указанный супернатант можно получать с использованием способов очистки от примесей, известных специалисту в данной области, например, таких как глубинная фильтрация. Таким образом, в конкретном варианте осуществления изобретения способ перед очисткой белка включает этапы глубинной фильтрации и получения супернатанта.

Альтернативно, клетки-хозяева представляют собой прокариотические клетки, предпочтительно грамотрицательные бактерии. Более предпочтительно клетки-хозяева представляют собой клетки *E.coli*. Прокариотические клетки-хозяева для экспрессии белков хорошо известны в данной области (Тегре, К. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 211-222.). Клетки-хозяева представляют собой рекомбинантные клетки, которые генетически сконструированы для продукции требуемого белка, такого как фрагмент антитела. Рекомбинантные клетки-хозяева *E.coli* можно получать из любого подходящего штамма *E.coli*, включая MC4100, TG1, TG2, DHB4, DH5 $\alpha$ , DH1, BL21, K12, XL1Blue и JM109. Один пример представляет собой штамм *E.coli* W3110 (ATCC 27,325), широко используемый штамм-хозяин для ферментации рекомбинантного белка. Фрагменты антител также можно получать, культивируя модифицированные штаммы *E.coli*, например штаммы *E.coli*, являющиеся метаболическими мутантами или обладающими дефицитом протеазы, такие как штаммы, описанные в WO 2011/086136, WO 2011/086138 или WO 2011/086139, включенных в настоящий документ в качестве ссылки.

Как правило, антитело, которое можно очищать способами по настоящему изобретению, в зависимости от природы белка, масштаба производства и используемого штамма *E.coli* находится в периплазме клетки-хозяина *E.coli* или в супернатанте культуры клеток-хозяев. Способы направления белков в эти компартменты хорошо известны в данной области (Makrides, S.C. (1996). Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 60, 512-538.). Примеры подходящих сигнальных последовательностей для направления белков в периплазму *E.coli* включают сигнальные последовательности PhoA, OmpA, OmpT, LamB и OmpF *E.coli*. Белки можно направлять в супернатант, используя природные секреторные пути или индуцируя ограниченное пропускание наружной мембраны, вызывая секрецию белка, примерами чего является использование лидерной последовательности *relB*, лидерной последовательности белка A, коэкспрессии белка высвобождения бактериоцина, индуцированного митомицином белком высвобождения бактериоцина совместно с добавлением в среду для культивирования глицина и коэкспрессии гена *kil* для увеличения проницаемости мембраны. Наиболее предпочтительно, чтобы в способах по изобретению экспрессия рекомбинантного белка происходила в периплазме клеток-хозяев *E.coli*.

Экспрессию рекомбинантного белка в клетках-хозяев *E.coli* также можно проводить под контролем индуцируемой системы, когда экспрессия рекомбинантного антитела в *E.coli* находится под контролем индуцибельного промотора. В данной области хорошо известно множество индуцибельных промоторов, пригодных для использования в *E.coli*, и, в зависимости от промотора, экспрессию рекомбинантного белка можно индуцировать различными факторами, такими как температура или концентрация конкретного вещества в среде для выращивания. Примеры индуцибельных промоторов включают промоторы *lac*, *tac* и *trc* *E.coli*, которые индуцируют лактозу или негидролизующий аналог лактозы, изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид (IPTG), и промоторы *rhoA*, *trp* и *araBAD*, которые индуцируют фосфат, триптофан и L-арабинозу соответственно. Экспрессию можно индуцировать, например, добавлением индуктора или изменением температуры, когда индукция зависит от температуры. Когда индукции экспрессии рекомбинантного белка достигают добавлением в культуру индуктора, индуктор можно добавлять любым подходящим способом в зависимости от системы ферментации и индуктора, например, посредством од-

ного или нескольких порционных добавлений или посредством постепенного добавления индуктора при подаче питания. Следует понимать, что между добавлением индуктора и фактической индукцией экспрессии белка может существовать задержка, например, когда индуктор представляет собой лактозу, пока перед лактозой используется любой добавленный ранее источник углерода, перед началом индукцией экспрессии белка может происходить задержка.

Культуры клеток-хозяев *E.coli* (ферментируемые культуры) можно культивировать в любой среде, которая поддерживает рост *E.coli* и экспрессию рекомбинантного белка. Среда может представлять собой любую среду определенного химического состава, например, такую как описана в Durany O., et al. (2004). Studies on the expression of recombinant fuculose-1-phosphate aldolase in *Escherichia coli*. *Process Biochem.* 39, 1677-1684.

Культивирование клеток-хозяев *E.coli* можно проводить в любом подходящем контейнере, таком как перемешиваемая колба или ферментер, в зависимости требуемого масштаба производства. Доступны различные крупномасштабные ферментеры с емкостью от более 1000 приблизительно до 100000 л. Предпочтительно используют ферментеры от 1000 до 50000 л, более предпочтительно от 1000 до 25000, 20000, 15000, 12000 или 10000 л. Также можно использовать ферментеры меньшего масштаба с емкостью от 0,5 до 1000 л.

Ферментацию *E.coli* можно проводить в любой подходящей системе, например, в непрерывном, периодическом режимах или режиме культивирования с периодической подпиткой в зависимости от белка и требуемых выходов. При необходимости, периодический режим можно использовать с порционными добавлениями питательных веществ или индукторов. Альтернативно, можно использовать культуру с периодической подпиткой и культуры, выращиваемые в периодическом режиме с предварительной индукцией с максимальной удельной скоростью роста, которую можно поддерживать с использованием питательных веществ, исходно присутствующих в ферментере, и в одном или нескольких режимах подачи питательных веществ, используемых для контроля скорости роста до завершения ферментации. В режиме культивирования с периодической подпиткой также можно использовать предварительную индукцию для контроля метаболизма клеток-хозяев *E.coli* и для достижения более высоких достигаемых плотностей клеток.

При желании, клетки-хозяева можно собирать из ферментационной среды, например клетки-хозяева можно собирать из образца посредством центрифугирования, фильтрования или посредством концентрации.

В одном из вариантов осуществления способ по настоящему изобретению до выделения белка включает этап центрифугирования и сбора клеток.

В способах ферментации *E.coli*, где требуемый белок, такой как фрагмент антитела, находится в периплазматическом пространстве клетки-хозяина, необходимо высвободить белок из клетки-хозяина. Высвобождение можно проводить любым подходящим способом, таким как лизис клеток посредством механической обработки или применения давления, обработки посредством замораживания-оттаивания, осмотического шока, экстрагирующих средств или тепловой обработки. Такие способы выделения для высвобождения белка хорошо известны в данной области. Таким образом, в конкретном варианте осуществления способ по изобретению перед очисткой белка включает дополнительный этап выделения белка.

В дополнительном варианте осуществления способ по изобретению дополнительно включает выделение клеток-хозяев из среды для культивирования клеток, сбор белка на этапе экстракции белка, получение содержащего белки смеси, являющейся результатом этапа экстракции белка, и очистку указанного белка от смеси, где указанная очистка включает по меньшей мере один этап хроматографии с белком А.

В конкретном варианте осуществления этап экстракции включает добавление в образец буфера для экстракции и получения выделяемого в результате белка. Предпочтительно этап экстракции проводят в течение подходящего периода времени и при подходящей температуре, обеспечивающих выделение белка в его природной конформации, и его эмпирически оптимизируют для каждого конкретного белка. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения указанный этап экстракции проводят при температурах от 25 до 35°C, от 27 до 33°C, предпочтительно от 29 до 31°C. Этап экстракции белка проводят в течение периода времени, который также эмпирически оптимизируют в зависимости от конкретного белка и используемой температуры. В конкретном варианте осуществления указанного этапа экстракции проводят в течение периода от 4 до 20 ч, в течение периода от 6 до 18 ч, предпочтительно от 8 до 12 ч. В конкретном варианте осуществления этапа экстракции белка проводят в течение периода от 8 до 12 ч при температурах от 29 до 31°C, предпочтительно в течение 11 ч при 30°C.

В альтернативном варианте осуществления в образец добавляют буфер для экстракции и затем образец подвергают этапу тепловой обработки. Этап тепловой обработки предпочтительно является таким, как подробно описано в US 5665866, включенном в настоящий документ в качестве ссылки.

После этапа экстракции смесь, содержащую требуемый белок, такой как антитело, можно подвергать этапу центрифугирования и/или фильтрации.

В дополнительном конкретном варианте осуществления способ по изобретению после этапа экстракции и перед очисткой белка от указанной смеси может включать этап коррекции pH смеси, содер-

жащей требуемый белок.

Как используют в настоящем документе, термин "антитело" или "антитела" относится к моноклональным или поликлональным антителам. Как используют в настоящем документе, термин "антитело" или "антитела" в качестве неограничивающих примеров включает рекомбинантные антитела, которые получают посредством рекомбинантных технологий, как известно в данной области. "Антитело" или "антитела" включают антитела любых видов, в частности видов млекопитающих, включая антитела с двумя по существу целыми тяжелыми и двумя по существу целыми легкими цепями, антитела человека любого изотипа, включая IgD, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgE, и антитела, которые продуцируются как димеры этой основной структуры, включая IgA<sub>1</sub>, IgA<sub>2</sub>, или пентамеры, такие как IgM, и их модифицированные варианты, антитела не являющихся человеком приматов, например шимпанзе, бабуина, макака-резус или яванского макака, антитела грызунов, например мыши или крысы; антитела кролика, козы или антитела лошади и антитела верблюдовых (например, верблюдов или лам, такие как Нанотела™) и их производные, или видов птиц, такие как антитела кур, или антитела рыб, такие как антитела акул. Также термин "антитело" или "антитела" относится к "химерным" антителам, в которых первая часть по меньшей мере одной последовательности тяжелой и/или легкой цепи антитела получена у первого вида, а вторая часть последовательности тяжелой и/или легкой цепи антитела получена у второго вида. Представляющие интерес химерные антитела в настоящем документе включают "приматизированные" антитела, содержащие антигенсвязывающие последовательности переменных доменов, полученные у не являющегося человеком примата (например, мартышковых, таких как бабуин, макака-резус или яванский макака), и последовательности константных областей человека. "Гуманизированные" антитела представляют собой химерные антитела, которые содержат последовательность, полученную из не принадлежащих человеку антител. Преимущественно гуманизированные антитела представляют собой антитела человека (реципиентное антитело), в котором остатки гипервариабельной области реципиента заменены остатками гипервариабельной области [или определяющей комплементарность области (CDR)] не являющихся человеком видов (донорное антитело), таких как мышь, крыса, кролик, курица или не являющийся человеком примат, с требуемой специфичностью, аффинностью и активностью. В большинстве случаев остатки антитела человека (реципиента) вне CDR, т.е. в каркасной области (FR), дополнительно замещают соответствующими не принадлежащими человеку остатками. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые не существуют ни в реципиентном антителе, ни в донорном антителе. Эти модификации проводят для дополнительного улучшения характеристик антитела. Гуманизирование снижает иммуногенность не принадлежащих человеку антител у людей, таким образом облегчая применение антител для лечения заболеваний человека. Гуманизированные антитела и несколько различных технологий их получения хорошо известны в данной области. Термин "антитело" или "антитела" также относится к антителам человека, которые можно получать в качестве альтернативы гуманизированию. Например, можно получать трансгенных животных (например, мышей), которые при иммунизации могут производить полный репертуар антител человека с отсутствием продукции эндогенных антител мыши. Например, описано, что гомозиготная делеция гена области соединения тяжелой цепи (JH) антител у химерных и мутантных по зародышевой линии мышей приводит к полному ингибированию продукции эндогенных антител. Перенос набора генов иммуноглобулинов зародышевой линии человека такой мутантной по зародышевой линии мышей после иммунизации трансгенного животного, несущего гены иммуноглобулинов зародышевой линии человека, указанным антигеном приводит к продукции антител человека со специфичностью к конкретному антигену. Технологии получения таких трансгенных животных и технологии выделения и продукции антител человека у таких трансгенных животных известны в данной области. Альтернативно, у трансгенного животного, например мыши, соответствующими последовательностями генов переменных областей иммуноглобулинов человека замещают только гены иммуноглобулинов, кодирующие переменные области антитела мыши. Гены иммуноглобулинов зародышевой линии мыши, кодирующие константные области антител, остаются неизменными. Таким образом, эффекторные функции антител в иммунной системе трансгенной мыши и, таким образом, развитие В-клеток по существу не изменяются, что может приводить к улучшенному ответу антителами при антигенной стимуляции *in vivo*. После выделения у таких трансгенных животных генов, кодирующих конкретное представляющее интерес антитело, гены, кодирующие константные области, можно заменять генами константных областей человека с получением полностью принадлежащего человеку антитела. Другие способы получения антител человека *in vitro* основаны на дисплейных технологиях, таких как технологии фагового дисплея или рибосомного дисплея, где используют библиотеки рекомбинантных ДНК, которые получают по меньшей мере частично искусственным путем или из репертуара генов переменных (V) доменов иммуноглобулинов доноров. Технологии фагового и рибосомного дисплея для получения антител человека хорошо известны в данной области. Антитела человека также можно получать из выделенных В-клеток человека, которые *ex vivo* иммунизируют представляющим интерес антигеном, а затем сливают с получением гибридом, которые затем можно подвергать скринингу на оптимальное антитело человека. Как используют в настоящем документе, термин "антитело" или "антитела", также относится к агликозилированным антителам.

Молекулы антител для применения по любому из вариантов осуществления изобретения включают

такие фрагменты антител, как Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> и Fv и фрагменты scFv, а также диатела, включая такие форматы, как BiTE® (привлекающие Т-клетки биспецифические активаторы) и DART™ (технология перенаправляющих антител с двойной аффинностью), триотела, тетратела, мини-антитела, доменные антитела (dAb), такие как фрагменты sdAb, VHH и VNAR, одноцепочечные антитела, биспецифические, триспецифические, тетраспецифические или полиспецифические антитела, получаемые из фрагментов антител, или антитела, включающие в качестве неограничивающих примеров конструкции Fab-Fv, Fab-scFv, Fab(Fv)<sub>2</sub> или Fab-(scFv)<sub>2</sub>. Фрагменты антител, как определено выше, известны в данной области. Для ясности, следует понимать, что Fab-Fv относится к конструкции, содержащей одну область Fv и одну область Fab, связанных в любом порядке, т.е. Fab-Fv или Fv-Fab, где за последними аминокислотами в одной из областей следуют первые аминокислоты в следующей области, или наоборот. Подобным образом следует понимать, что Fab-scFv относится к конструкции, содержащей одну область scFv и одну область Fab, связанных в любом порядке, и в случае Fab с любой из остальных полипептидных цепей, т.е. Fab-scFv или scFv-Fab, где за последней аминокислотой в одной из областей следует первая аминокислота в следующей области, или наоборот. Аналогично следует понимать, что Fab-(Fv)<sub>2</sub> относится к конструкции, содержащей две области Fv и одну область Fab, связанных в любом порядке, т.е. Fab-Fv-Fv, Fv-Fab-Fv или Fv-Fv-Fab, где за последними аминокислотами в одной из областей следуют первые аминокислоты в следующей области, или наоборот. Подобным образом следует понимать, что Fab-(scFv)<sub>2</sub> относится к конструкции, содержащей две области scFv и одну область Fab, связанных в любом порядке, и в случае Fab с любой из остальных полипептидных цепей, что приводит к 20 возможным сочетаниям.

Как правило, эти конструкции между первой областью (например, Fab) и второй областью (например, Fv) содержат пептидный линкер. Такие линкеры хорошо известны в данной области и могут представлять собой одну или несколько аминокислот, как правило, оптимизированных специалистом в данной области по длине и составу. Альтернативно, указанные области можно связывать непосредственно, т.е. без пептидного линкера.

Примеры подходящих линкерных областей для связывания варибельного домена с Fab или Fab' описаны в WO 2013/068571 и WO 2014/096390, включенных в настоящий документ в качестве ссылки, и в качестве неограничивающих примеров включают последовательности подвижных линкеров и последовательности жестких линкеров. Последовательности подвижных линкеров включают последовательности, описанные в Huston et al., 1988, 10 PNAS, 85:5879-5883; Wright & Deonarain, Mol. Immunol., 2007, 44(11):2860-2869; Alfthan et al., Prot. Eng., 1995, 8(7):725-731; Luo et al., J. Biochem., 1995, 118(4):825-831; Tang et al., 1996, J. Biol. Chem. 271(26):15682-15686 и Turner et al., 1997, JIMM 205, 42-54.

Как используют в настоящем документе, термин "домен VH3" относится к подгруппе каркаса 3 варибельной области тяжелой цепи человека иммуноглобулина. Варибельные домены тяжелых цепей антител классифицируют на определенные подсемейства (от VH1 до VH6) на основании последовательностей ДНК и гомологий белков (Walter et al. Am. J. Hum. Genet. 42:446-451, 1988, Analysis for genetic variation reveals human immunoglobulin VH-region gene organization; Schroeder et al. Int. Immunol. 1990; 2(1):41-50, Structure and evolution of mammalian VH families).

Как используют в настоящем документе, термин "Fc-область" относится к Fc-области природного антитела, она представляет собой димер константной области с отсутствием константного домена тяжелой цепи 1 (CH1). Как известно в данной области, Fc-область антитела представляет собой кристаллизующийся фрагмент (Fc), получаемый после расщепления природного антитела пепсином или папаином.

Как используют в настоящем документе, антитело, которое "не содержит Fc-области", относится к антителу, которое не содержит областей природного константного домена тяжелой цепи 2 (CH2), природного константного домена тяжелой цепи 3 (CH3) и природного константного домена тяжелой цепи 4 (CH4).

В данной области ранее описаны остатки Fc-области, отвечающие за связывание с белком А (Nagaoka et al. Single amino acid substitution in the mouse IgG1 Fc region induces drastic enhancement of the affinity to protein A, PDS. Vol. 16, Issue 4, pages 243-245). Таким образом, специалист в данной области может разработать антитело с Fc-областью, утратившее способность связываться с белком А, и такое антитело будет пригодно для использования в способе по настоящему изобретению.

Как используют в настоящем документе, термин "мультимер" или "мультимерная форма" относится к формам антител, состоящих из доменов двух или более мономеров, в которых все домены правильно уложены и спарены. Примеры мультимеров предоставлены на фиг. 12, где различные молекулы антител корректно уложены и каждый домен VH спарен с комплементарным доменом VL. Для ясности следует понимать, что комплементарные пары VH-VL кооперативно связывают один и тот же антиген.

Как используют в настоящем документе, термин "белок А" или "Белок А стафилококков", представляет собой мембранный белок I типа, ковалентно связанный с клеточной стенкой большинства штаммов грамположительной бактерии *Staphylococcus aureus*. Он обладает высокой аффинностью к IgG различных видов, например человека, кролика и морской свинки, но только слабым взаимодействием с IgG жвачных и мышей. Белок А взаимодействует с антителами в двух конкретных событиях связывания: "классический" участок связывания на части Fc IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> и IgG<sub>4</sub> человека и "альтернативный" участок

связывания, находящийся на части Fab IgG, IgM, IgA и IgE человека, которые содержат тяжелые цепи подсемейства VH3. Наиболее часто описанной молекулярной массой белка A *Staphylococcus aureus* является приблизительно 42000 Да. Рекомбинантный белок A стрептококков состоит из 299 аминокислот, и его теоретически рассчитанная молекулярная масса составляет 33,8 кДа, по оценкам SDS-PAGE.

Белок А состоит из трех областей: S, являющейся сигнальной последовательностью, которая обрабатывается при секреции; пяти гомологичных IgG-связывающих доменов E, D, A, B и C и закрепляющейся в клеточной стенке области XM. У укороченного белка с отсутствием области X молекулярная масса составляет приблизительно 31 кДа. Домены способны независимо связываться Fc-частью IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> и IgG<sub>4</sub>, но демонстрируют только слабое взаимодействие с IgG<sub>3</sub>. Кроме того, все домены природного белка А демонстрируют сравнимое связывание с Fab, для которого описано, что его опосредуют области D и E.

Как используют в настоящем документе, термин "OX40" относится к молекуле, также известной как CD134, TNFRSF4, ACT35 или TXGP1L, которая является представителем суперсемейства рецепторов TNF, действующим в качестве костимулирующего рецептора с последующим привлечением CD28 и OX40, необходимыми для оптимальных пролиферации и выживания Т-клеток.

Как используют в настоящем документе, термины "специфически связывается с", "специфическое связывание с" данной молекулой и их эквиваленты по отношению к антителу означают, что антитело связывается с данной указанной молекулой с достаточными аффинностью и специфичностью для достижения биологически значимого эффекта. Выбираемое антитело, как правило, обладает аффинностью связывания к данной молекуле, например антитело может связываться с данной молекулой со значением Kd от 100 нМ до 1 пМ. Аффинности антител можно определять, например, анализом на основе поверхностного плазмонного резонанса, таким как анализ BIAcore; твердофазным иммуноферментным анализом (ELISA) и конкурентными анализами (например, RIA). В значении по настоящему изобретению антитело, специфически связывающееся с данной указанной молекулой, также может связываться с другой молекулой, например, в качестве неограничивающего примера, как в случае биспецифического антитела.

#### Примеры

Пример 1. Очистка A26Fab-645dsFv с белком А при элюции с градиентом рН.

Экспрессия, выделение и очистка от примесей A26Fab-645dsFv при использовании *E.coli*.

A26Fab-645dsFv (фрагмент антитела, который связывается с OX40 человека и сывороточным альбумином) экспрессировали в виде гетерологичного белка в клетках-хозяев *E.coli* W3110 после индукции IPTG (изопропил-β-D-1-тиогаляктопиранозидом) и гетерологичный белок выделяли из периплазматического пространства клеток-хозяев посредством добавления буфера с 100 мМ Tris/10 мМ ЭДТА, доведенного до рН 7,4 и этапа экстракции белка при 30°C. Клеточный материал удаляли посредством центрифугирования, а затем клеточный экстракт, содержащий гетерологичный белок, очищали от примесей с использованием комбинации центрифугирования и фильтрации через 0,22 мкм фильтр.

Очистка A26Fab-645dsFv с белком А при элюции с градиентом рН.

Экстракт *E.coli* с удаленными примесями наносили на хроматографическую колонку с белком А, 5 мл HiTrap MabSelect (GE Healthcare), уравновешенную в фосфатно-солевом буфере Дульбекко (PBS), рН 7,4. Сначала колонку промывали PBS для удаления несвязанного материала, а затем связанный материал элюировали градиентом рН от 7,4 до 2,1. Элюированный материал фракционировали и анализировали посредством эксклюзионной ВЭЖХ (эксклюзионная хроматография - высокоэффективная жидкостная хроматография) с использованием эксклюзионной ВЭЖХ с TSK gel G3000SWXL (Tosoh Corporation). Анализ посредством эксклюзионной ВЭЖХ использовали для определения % мономеров и мультимеров, присутствующих в каждой фракции. Время удержания мономера A26Fab-645dsFv составляло приблизительно 9 мин. Димер, тример, тетрамер и структуры более высокого порядка демонстрировали время удержания менее 9 мин, и их коллективно обозначали мультимерные молекулы или молекулы большей молекулярной массы (HMWS).

При элюции из хроматографической колонки с белком А по градиенту рН наблюдали два пика, см. фиг. 1. В первом пике наблюдали более высокие уровни мономера по сравнению с более высокими уровнями мультимерных молекул во втором пике, см. табл. 1 и фиг. 2.

У A26Fab-645dsFv отсутствует Fc, таким образом, связывание с белком А происходило посредством каркаса подкласса варибельной области VH3 V-областей человека. Полагают, что увеличенное связывание мультимерных молекул происходило вследствие увеличенной avidности этих молекул к белку А. В мультимерных молекулах содержится больше областей VH3, и, таким образом, они сильнее связываются со смолой с белком А, требуя для элюции меньшего рН.

Таблица 1

Анализ SEC G3000 фракций после очистки A26Fab-645dsFv с белком А при элюции с градиентом pH

Фракция	Объем (мл)	Конц. (мг/мл)	Белок (мг)	HMWS (%)	Мономер (%)
A1	3,3	0,3	0,9	4,0	96,1
A2	3,1	0,6	1,9	6,7	93,3
A3	3,2	1,6	5,0	15,0	85,0
A4	3,2	1,6	5,1	22,7	77,3
A5	3,2	1,8	5,8	44,2	55,8
A6	3,3	1,4	4,6	53,8	46,2
A7	3,3	0,5	1,5	54,7	45,3
A8	1,0	0,2	0,2	50,6	49,4

Пример 2. Очистка конструкции Fc с белком А при элюции с градиентом pH.

Экспрессия и очистка от примесей мультимерного Fc с использованием CHO.

Конструкцию Fc, содержащую домен Fc IgG1 человека, слитый с концевой частью IgM человека, которая вызывает сборку Fc в мультимеры, экспрессировали в линии клеток китайского хомяка (CHO DG44) со стабильным дефицитом дигидрофолатредуктазы (DHFR). Клетки трансфицировали с использованием Nucleofector (Lonza) по инструкциям производителя плазмидным вектором, содержащим ген DHFR в качестве селективного маркера и гены, кодирующие продукт. Трансфицированные клетки выжили в среде без гипоксантина и тимидина и в присутствии ингибитора DHFR метотрексата. Культивирование проводили в перемешиваемых колбах в периодическом режиме и сбор проводили через 14 суток.

Очистку супернатанта культуры клеток от примесей проводили посредством центрифугирования (4000×g в течение 60 мин при комнатной температуре) с последующей глубинной и стерильной фильтрацией.

Супернатант культуры клеток с удаленными примесями концентрировали и все конструкции, содержащие Fc, очищали с использованием хроматографической колонки с белком А, 5 мл HiTrap MabSelect SuRe (GE Healthcare), уравновешенной в PBS pH 7,4. Колонку отмывали PBS и связанный материал элюировали 0,1 М цитратом pH 3,4. У элюированного материала заменяли буфер на PBS pH 7,4.

Очищенные конструкции Fc наносили на хроматографическую колонку с белком А, 5 мл HiTrap MabSelect (GE Healthcare), уравновешенную в PBS pH 7,4. Сначала колонку промывали PBS для удаления несвязанного материала, а затем связанный материал элюировали градиентом pH, pH от 7,4 до 2,1, см. фиг. 3. Элюированный материал фракционировали и анализировали посредством эксклюзионной ВЭЖХ (эксклюзионная ВЭЖХ с G3000, Tosoh Corporation). Анализ посредством эксклюзионной ВЭЖХ использовали для определения % мономерного и мультимерного Fc, присутствующих в каждой фракции. Время удержания мономера Fc составляло приблизительно 9,3 мин. Время удержания тримера, гексамера и структур более высокого порядка составляло менее 9,4 мин, и их коллективно обозначали мультимерные молекулы или молекулы большей молекулярной массы (HMWS), см. табл. 2 и фиг. 4.

Таблица 2

Анализ SEC G3000 фракций после очистки мультимерных Fc с белком А при элюции с градиентом pH

Фракция	Общий белок (мг)	% мономерного Fc	% мультимерного Fc
A1	0,89	2,3	97,6
A2	3,13	4,7	95,3
A3	3,14	9,5	90,4
A4	0,94	7,8	92,3

Элюция конструкции Fc проходила в виде одного пика с небольшими плечами на верхнем и нижнем перегибах. Однако анализ фракций посредством эксклюзионной ВЭЖХ выявил, что мономерные и мультимерные формы молекулы элюируют параллельно, см. табл. 2 и фиг. 4. Разделения разных молекул при градиентной элюции не наблюдали.

Мультимеры конструкции Fc содержат несколько Fc-областей, но не содержат вариабельных областей, и поэтому у них отсутствует возможность связывания белка А через домен VH3 человека. Мономерные и мультимерные конструкции Fc совместно элюируют из колонки с белком А при градиентной элюции, это демонстрирует, что avidность Fc-области к смоле не является показателем для элюции. Таким образом, содержащие мономерную и мультимерную Fc-область молекулы этим способом эффективно разделить невозможно. Это отличается от примеров 1 и 2, когда при элюции из материала с белком А антител, содержащих домен VH3, у которых отсутствует Fc-область, с использованием градиента pH можно было отделить мономерные от мультимеров.

Пример 3. Очистка A26Fab-645dsFv с белком А при элюции со ступенчатым изменением рН.

Экспрессия и очистка от примесей A26Fab-645dsFv с использованием CHO.

Конструкцию, которая связывается с OX40 человека и сывороточным альбумином, экспрессировали в линии клеток китайского хомяка (CHO DG44) со стабильным дефицитом дигидрофолатредуктазы (DHFR). Клетки трансфицировали посредством электропорации с использованием Nucleofector (Lonza) по инструкциям производителя плазмидным вектором, содержащим ген DHFR в качестве селективного маркера и гены, кодирующие продукт. Трансфицированные клетки выбирали в среде без гипоксантина и тимидина и в присутствии ингибитора DHFR метотрексата. Культивирование проводили в перемешиваемых колбах в периодическом режиме и сбор проводили через 14 суток.

Очистку супернатанта культуры клеток от примесей проводили посредством центрифугирования (4000×g в течение 60 мин при комнатной температуре) с последующей глубинной и стерильной фильтрацией.

Очистка A26Fab-645dsFv с белком А при элюции со ступенчатым изменением рН.

Очищенный от примесей супернатант культуры клеток наносили на хроматографическую колонку с белком А, 5 мл HiTrap MabSelect (GE Healthcare), уравновешенную в фосфатно-солевом буфере Дульбекко (PBS) рН 7,4. Сначала колонку промывали PBS для удаления несвязанного материала, а затем связанный материал элюировали сначала при рН 3,8, а затем проводили второй этап элюции при рН 3,0, см. фиг. 5. Элюированный материал фракционировали и анализировали посредством эксклюзионной ВЭЖХ (эксклюзионная ВЭЖХ с G3000, Tosoh Corporation) и проводили SDS-PAGE с 4-20% Tris/глицином в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях.

Анализ посредством эксклюзионной ВЭЖХ использовали для определения % мономеров и мультимеров, присутствующих в каждой фракции. Время удержания мономера A26Fab-645dsFv составляло приблизительно 9 мин. Время удержания димера, тримера, тетрамера и структур более высокого порядка составляло менее 9 мин, и их коллективно обозначали мультимерные молекулы или молекулы большей молекулярной массы (HMWS), см. фиг. 6 и табл. 3.

Таблица 3

Анализ SEC G3000 фракций после очистки A26Fab-645dsFv с белком А при элюции со ступенчатым изменением рН

	Объем (мл)	Конц. (мг/мл)	Общий белок (мг)	HMWS (%)	Мономер (%)
рН3,8	13,8	0,67	9,2	21,3	78,7
рН3,0	7,5	1,04	7,8	96,8	3,2

Невосстанавливающий SDS-PAGE подтвердил полученные выше уровни мономера и мультимеров в пиках элюции. Мономер A26Fab-645dsFv мигрировал в диапазоне 97-66 кДа и являлся основной полосой в дорожке 4, соответствующей элюции при рН 3,8, мультимеры A26Fab-645dsFv мигрировали в виде нескольких полос более 120 кДа и являлись основными составляющими полос в дорожке 5, соответствующей фракции, получаемой после элюции при рН 3,0, см. фиг. 7.

Восстанавливающий SDS-PAGE подтвердил, что все полосы в невосстанавливающем SDS-PAGE относились к A26Fab-645dsFv, см. фиг. 8.

После элюции при рН 3,8 получали один пик в 2,8 объемах колонки с небольшим шлейфом на нижнем перегибе. Анализ посредством эксклюзионной ВЭЖХ продемонстрировал, что этот пик содержал 79% A26Fab-645dsFv в мономерной форме, высокое количество мономера также подтверждали анализом невосстанавливающим SDS-PAGE. После элюции при рН 3,0 получали один пик. Анализ эксклюзионной ВЭЖХ продемонстрировал, что этот пик представлял собой 97% A26Fab-645dsFv в мультимерной форме, большое количество мультимера также подтверждали анализом невосстанавливающим SDS-PAGE.

Полученные выше результаты демонстрируют, что эффективное разделение молекул мономера и мультимеров посредством связывания VH3 с белком А является возможным. Это отличается от связывания Fc с белком А, как продемонстрировано в предыдущем примере.

Пример 4. Очистка A26Fab-645dsFv с белком А (Amsphere) посредством градиентной элюции.

Экспрессия и очистка от примесей A26Fab-645dsFv с использованием CHO.

Конструкцию, которая связывается с OX40 человека и сывороточным альбумином, экспрессировали в линии клеток китайского хомяка (CHO DG44) со стабильным дефицитом дигидрофолатредуктазы (DHFR). Клетки трансфицировали посредством электропорации с использованием Nucleofector (Lonza) по инструкциям производителя плазмидным вектором, содержащим ген DHFR в качестве селективного маркера и гены, кодирующие продукт. Трансфицированные клетки выбирали в среде без гипоксантина и тимидина и в присутствии ингибитора DHFR метотрексата. Культивирование проводили в перемешиваемых колбах в периодическом режиме и сбор проводили через 14 суток.

Очистку супернатанта культуры клеток от примесей проводили посредством центрифугирования (4000×g в течение 60 мин при комнатной температуре) с последующей глубинной и стерильной фильтрацией.

Очистка A26Fab-645dsFv с белком А (Amsphere) при элюции с градиентом рН.

Очищенный от примесей супернатант наносили на хроматографическую колонку с белком А Amsphere, (объем колонки 5 мл с высотой слоя 10 см) и уравнивали в фосфатно-солевом буфере Дульбекко (PBS) рН 7,4. Затем колонку отмывали PBS для удаления несвязанного материала, а затем связанный материал элюировали градиентом рН, рН от 6,0 до 2,1. Элюированный материал фракционировали и анализировали посредством эксклюзионной СЭЖХ (эксклюзионная хроматография, сверхэффективная жидкостная хроматография) с использованием колонки Acquity для эксклюзионной СЭЖХ VEN450 2,5 мкм. Анализ эксклюзионной СЭЖХ использовали для определения % мономеров и мультимеров, присутствующих в каждой фракции. Время удержания мономера A26Fab-645dsFv составляло приблизительно 2,2 мин. Димер, тример, тетрамер и структуры более высокого порядка демонстрировали время удержания менее 2,2 мин, и их коллективно обозначали мультимерные молекулы или молекулы большей молекулярной массы (HMWS).

При элюции с хроматографической колонки с белком А Amsphere по градиенту рН наблюдали два пика, см. фиг. 9. В первом пике наблюдали более высокие уровни мономера по сравнению с более высокими уровнями мультимерных молекул во втором пике, см. табл. 4 и фиг. 9.

У A26Fab-645dsFv отсутствует Fc, таким образом, связывание с белком А Amsphere происходило посредством каркаса подкласса варибельной области VH3 V-областей человека. Полагают, что увеличенное связывание мультимерных молекул происходило вследствие увеличенной авидности этих молекул к белку А. В мультимерных молекулах содержится больше областей VH3, и, таким образом, они сильнее связываются со смолой с белком А, требуя для элюции меньшего рН.

Таблица 4

Анализ фракций после очистки A26Fab-645dsFv с белком А Amsphere при элюции с градиентом рН посредством эксклюзионной хроматографии

Фракция	Объем (мл)	Конц. (мг/мл)	Белок (мг)	HMWS (%)	Мономер (%)
B15	5	0,54	2,68	0,0	85,2
B14	5	1,01	5,05	1,8	95,7
B13	5	1,14	5,7	48,2	49,7
B12	5	3,32	16,61	96,1	3,9
B11	5	1,85	9,235	96,1	2,8
B10	5	0,51	2,535	79,9	7,0

Пример 5. Очистка A26Fab-645dsFv с белком А (NovaSep Absolute) посредством градиентной элюции.

Экспрессия и очистка от примесей A26Fab-645dsFv с использованием CHO.

Конструкцию, которая связывается с OX40 человека и сывороточным альбумином, экспрессировали в линии клеток китайского хомяка (CHO DG44) со стабильным дефицитом дигидрофолатредуктазы (DHFR). Клетки трансфицировали посредством электропорации с использованием Nucleofector (Lonza) по инструкциям производителя плазмидным вектором, содержащим ген DHFR в качестве селективного маркера и гены, кодирующие продукт. Трансфицированные клетки выбирали в среде без гипоксантина и тимидина и в присутствии ингибитора DHFR метотрексата. Культивирование проводили в перемешиваемых колбах в периодическом режиме и сбор проводили через 14 суток.

Очистку супернатанта культуры клеток от примесей проводили посредством центрифугирования (4000×g в течение 60 мин при комнатной температуре) с последующей глубинной и стерильной фильтрацией.

Очистка A26Fab-645dsFv с белком А (NovaSep Absolute) при элюции с градиентом рН.

Очищенный от примесей супернатант наносили на хроматографическую колонку с белком А NovaSep Absolute (объем колонки 5 мл с высотой слоя 10 см) и уравнивали в фосфатно-солевом буфере Дульбекко (PBS) рН 7,4. Сначала колонку промывали PBS для удаления несвязанного материала, а затем связанный материал элюировали градиентом рН, рН от 6,0 до 3,0. Элюированный материал фракционировали и анализировали посредством эксклюзионной СЭЖХ с использованием колонки для эксклюзионной СЭЖХ VEN450 2,5 мкм Acquity. Анализ эксклюзионной СЭЖХ использовали для определения % мономеров и мультимеров, присутствующих в каждой фракции. Время удержания мономера A26Fab-645dsFv составляло приблизительно 2,2 мин. Димер, тример, тетрамер и структуры более высокого порядка демонстрировали время удержания менее 2,2 мин, и их коллективно обозначали мультимерные молекулы или молекулы большей молекулярной массы (HMWS).

При элюции с хроматографической колонки с белком А NovaSep Absolute по градиенту рН наблюдали два пика, см. фиг. 10. В первом пике наблюдали более высокие уровни мономера по сравнению с более высокими уровнями мультимерных молекул во втором пике, см. табл. 5 и фиг. 10.

У A26Fab-645dsFv отсутствует Fc, таким образом, связывание с белком А NovaSep Absolute происходило посредством каркаса подкласса варибельной области VH3 V-областей человека. Полагают, что увеличенное связывание мультимерных молекул происходило вследствие увеличенной авидности этих

молекул к белку А. В мультимерных молекулах содержится больше областей VH3, и, таким образом, они сильнее связываются со смолой с белком А, требуя для элюции меньшего рН.

Таблица 5

Эксклюзионный анализ фракций после очистки A26Fab-645dsFv с белком А NovaSep Absolute при элюции с градиентом рН

Фракция	Объем (мл)	Конц. (мг/мл)	Белок (мг)	HMWS (%)	Мономер (%)
B15	2	0,36	0,72	0	99,7
B14	2	1,21	2,42	0	99,7
B13	2	0,46	0,92	4,6	94,8
B12	2	0,64	1,28	87,3	12,2
B11	2	2,05	4,1	98,4	1,4
B10	2	2,68	5,36	99	0,8
B9	2	0,67	1,34	97,2	2,3
B8	2	0,37	0,74	94,8	4,3
B6	2	0,03	0,06	94,7	4

Пример 6. Очистку A26Fab-645dsFv с белком А (AcroSep) посредством градиентной элюции.

Экспрессия и очистка от примесей A26Fab-645dsFv с использованием CHO.

Конструкцию, которая связывается с OX40 человека и сывороточным альбумином, экспрессировали в линии клеток китайского хомяка (CHO DG44) со стабильным дефицитом дигидрофолатредуктазы (DHFR). Клетки трансфицировали посредством электропорации с использованием Nucleofector (Lonza) по инструкциям производителя плазмидным вектором, содержащим ген DHFR в качестве селективного маркера и гены, кодирующие продукт. Трансфицированные клетки выбирали в среде без гипоксантина и тимидина и в присутствии ингибитора DHFR метотрексата. Культивирование проводили в перемешиваемых колбах в периодическом режиме и сбор проводили через 14 суток.

Очистку супернатанта культуры клеток от примесей проводили посредством центрифугирования (4000×g в течение 60 мин при комнатной температуре) с последующей глубинной и стерильной фильтрацией.

Очистка (AcroSep) A26Fab-645dsFv с белком А при элюции с градиентом рН.

Очищенный от примесей супернатант наносили на хроматографическую колонку с белком А AcroSep, (1 мл колонка volume с высотой слоя 1,5 см) уравнивали в фосфатно-солевом буфере Дульбекко (PBS) рН 7,4. Сначала колонку промывали PBS для удаления несвязанного материала, а затем связанный материал элюировали градиентом рН, рН от 6,0 до 3,0. Элюированный материал фракционировали и анализировали посредством эксклюзионной СЭЖХ using Acquity Колонка для эксклюзионного СЭЖХ VEN450 2,5 мкм. Анализ посредством эксклюзионной ВЭЖХ использовали для определения % мономеров и мультимеров, присутствующих в каждой фракции. Время удержания мономера A26Fab-645dsFv составляло приблизительно 2,2 мин. Димер, тример, тетрамер и структуры более высокого порядка демонстрировали время удержания более 2,2 мин, и их коллективно обозначали мультимерные молекулы или молекулы большей молекулярной массы (HMWS).

При элюции с хроматографической колонки с белком А AcroSep наблюдали один широкий пик при элюции по градиенту рН, см. фиг. 11. Сниженное разрешение могло происходить вследствие уменьшенной высоты слоя, однако на верхнем перегибе пика все еще наблюдали повышенные уровни мономера по сравнению с повышенными уровнями мультимерных молекул на нижнем перегибе пика элюции, см. табл. 6 и фиг. 11.

В A26Fab-645dsFv отсутствует Fc, таким образом, связывание с белком А AcroSep Absolute происходило посредством каркаса подкласса варибельной области VH3 V-областей человека. Полагают, что увеличенное связывание мультимерных молекул происходило вследствие увеличенной avidности этих молекул к белку А. В мультимерных молекулах содержится больше областей VH3, и, таким образом, они сильнее связываются со смолой с белком А, требуя для элюции меньшего рН.

Таблица 6

Эксклюзионный анализ фракций после очистки A26Fab-645dsFv  
с белком А AcroSep Absolute при элюции с градиентом pH

Фракция	Объем (мл)	Конц. (мг/мл)	Белок (мг)	HMWS (%)	Мономер (%)
B13	1	0,17	0,17	28,9	71,1
B12	1	0,22	0,22	44,6	55
B11	1	0,35	0,35	67,1	32,8
B10	1	0,52	0,52	87,4	12,4
B9	1	0,73	0,73	96,2	3,6
B8	1	1,00	1,00	98,6	1,2
B7	1	1,19	1,19	99,1	0,7
B6	1	1,05	1,05	99,2	0,6
B5	1	0,54	0,54	98,6	0,9
B4	1	0,22	0,22	97,5	1,4

Пример 7. Очистка TrYbe® с белком А при элюции с градиентом pH.

Очистка TrYbe® с белком А при элюции с градиентом pH.

Экспрессия и очистка от примесей TrYbe® с использованием CHO.

Мультиспецифическую трехвалентную молекулу антитела формата Fab-2x dsscFv, как описано в WO 2015/197772 (TrYbe®), экспрессировали в линии клеток китайского хомяка (CHO DG44) со стабильным дефицитом дигидрофолатредуктазы (DHFR). Клетки трансфицировали с использованием Nucleofector (Lonza) по инструкциям производителя плазмидным вектором, содержащим ген DHFR в качестве селективного маркера и гены, кодирующие продукт. Трансфицированные клетки выбирали в среде без гипоксантина и тимидина и в присутствии ингибитора DHFR метотрексата. Экспрессию проводили собственным способом с периодической подпиткой с получением большого количества клеток.

Очистку супернатанта культуры клеток от примесей проводили посредством центрифугирования (4000×g в течение 60 мин при комнатной температуре) с последующей глубинной и стерильной фильтрацией. Очищенный от примесей супернатант культуры клеток наносили на 5 мл HiTrap MabSelect (GE Healthcare), уравновешенную в фосфатно-солевом буфере Дульбекко (PBS) pH 7,4. Колонку отмывали PBS и связанный материал элюировали градиентом pH, pH от 7,4 до 2,1, см. фиг. 21. Элюированный материал фракционировали и анализировали посредством эксклюзионной ВЭЖХ G3000 и SDS-PAGE с 4-20% Tris/глицином (восстанавливающий и невосстанавливающий). Для определения % мономеров и мультимеров использовали анализ посредством эксклюзионной ВЭЖХ. Время удержания мономера TrYbe® составляло приблизительно 9,4 мин. Время удержания димера, тримера, тетрамера и структур более высокого порядка составляло менее 9,4 мин, и их коллективно обозначали мультимерные молекулы или HMWS. Для анализа хроматограмм эксклюзионной ВЭЖХ фракций см. фиг. 22.

При элюции по градиенту pH наблюдали два пика с плечом на нижнем перегибе, см. фиг. 21. Эти три фракции анализировали посредством SDS-PAGE, см. фиг. 23. На профиле элюции при восстанавливаемом SDS-PAGE наблюдали несколько полос. Мономер мигрировал в диапазоне полос молекулярной массы 116-200 кДа. Все полосы, которые мигрируют выше мономера, коллективно обозначали мультимерными молекулами или HMWS. Относящиеся к легкой цепи примеси с отсутствием межцепочечных дисульфидных связей и не связанные дисульфидными связями тяжелые и легкие цепи мигрируют в диапазоне маркеров молекулярных масс 37-55 кДа. Фракция 1 (дорожка 2) преимущественно состояла из мономера и относящихся к легкой цепи молекул с небольшим количеством или отсутствием видимых HMWS. Во фракции 2 (дорожка 3) мономер составляет основную полосу. Хотя полосы HMWS являются видимыми, уровни относительно уровней, наблюдаемых во фракции 3 (дорожка 4), значимо снижены. В восстанавливаемом геле все родственные продукту молекулы восстанавливаются до тяжелых и легких цепей с небольшой полосой невосстанавливаемого материала, видимого в дорожках 3 и 4. Дорожка 2 подтверждает, что фракция 1 сильно обогащена относящимися к легкой цепи молекулами.

Первый пик (1) посредством восстанавливающего SDS-PAGE идентифицирован как относящиеся к легкой цепи примеси и при анализе посредством эксклюзионной ВЭЖХ содержал 2% HMWS. Второй пик (2) идентифицирован как TrYbe® и содержал 72% мономера и 22% HMWS, см. табл. 7 и фиг. 24. Нижний перегиб на пике 2, фракция 3, идентифицирован как TrYbe® и содержал 6% мономера и 92% HMWS.

В TrYbe® отсутствует Fc, таким образом, связывание с белком А происходило посредством каркаса подкласса варибельной области VH3 V-областей человека. Полагают, что увеличенное связывание мультимерных молекул происходило вследствие увеличенной avidности этих молекул к белку А. В мультимерных молекулах содержится больше областей VH3, и, таким образом, они сильнее связываются со смолой с белком А, требуя для элюции меньшего pH.

Анализ SEC G3000 фракций после очистки TrYbe® с белком А  
при элюции с градиентом pH

Фракция	Белок (мг)	HMWS (%)	Мономер (%)
1	3,9	2,0	97,3
2	33,9	22,1	72,0
3	0,4	91,5	6,4

Пример 8. Очистка YUbe с белком А при элюции с градиентом pH.

Экспрессия и очистка от примесей YUbe с использованием CHO.

Слитый белок Fab-scFv (Yube) конструировали, по существу как описано в примере 4 WO 2013/068571, с использованием различных последовательностей переменных областей. Конструкцию экспрессировали в линии клеток китайского хомяка (CHO DG44) со стабильным дефицитом дигидрофолатредуктазы (DHFR). Клетки трансфицировали с использованием Nucleofector (Lonza) по инструкциям производителя плазмидным вектором, содержащим ген DHFR в качестве селективного маркера и гены, кодирующие продукт. Трансфицированные клетки выбирали в среде без гипоксантина и тимидина и в присутствии ингибитора DHFR метотрексата. После культивирования на этапе перемешиваемой колбы оценивали рост и продукцию и выбирали 24 наиболее экспрессирующих клона для оценки способом перемешиваемой колбы с периодической подпиткой. В 3-л перемешиваемую колбу инокулировали 1 л культуры с исходной плотностью  $0,3 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл и поддерживали при 36,8°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Добавление питательных веществ проводили начиная от суток 3 до суток 12 и добавляли глюкозу в виде болюсного добавления при падении концентрации ниже 5,8 г/л. Культуру собирали на сутки 14 посредством центрифугирования при 4000×g в течение 60 мин с последующей фильтрацией через 0,2 мкм.

Очистка YUbe с белком А при элюции с градиентом pH.

Очищенный от примесей супернатант культуры клеток наносили на 4,7 мл колонку HiScreen Mab-Select (GE Healthcare), уравновешенную в фосфатно-солевом буфере (PBS) Sigma pH 7,4. Колонку отмывали PBS с последующими 90% 0,2 М фосфатом натрия/10% лимонной кислоты, pH 7,4, и связанный материал элюировали градиентом pH от 7,4 до 2,1, см. фиг. 25. Элюированный материал фракционировали и анализировали посредством эксклюзионной ВЭЖХ G3000 и SDS-PAGE с 4-20% Tris/глицином (восстанавливающий и невосстанавливающий). Анализ посредством эксклюзионной ВЭЖХ использовали для определения % мономеров и мультимеров. Время удержания мономера YUbe составляло приблизительно 9,6 мин. Время удержания димера, тримера, тетрамера и структур более высокого порядка составляло <9,6 мин, и их коллективно обозначали мультимерные молекулы или HMWS. Для анализа фракций посредством хроматограмм эксклюзионной ВЭЖХ см. фиг. 26.

При элюции по градиенту pH наблюдали один пик, см. фиг. 25. Фракции пика элюции анализировали посредством SDS-PAGE, см. фиг. 27. При невосстанавливаемом SDS-PAGE в профиле элюции наблюдали несколько полос. Мономер мигрировал близко к уровню маркера молекулярной массы 98 кДа. Все полосы, мигрирующие выше мономера (в диапазоне маркеров молекулярной массы от 250 до 98 кДа), коллективно обозначали мультимерные молекулы или HMWS. Не связанные дисульфидными связями тяжелые и легкие цепи мигрируют на уровне маркеров молекулярных масс 50-64 кДа и 30 кДа соответственно. Фракции B9-B6 (дорожки 6-9) преимущественно состояли из мономера с незначительными или отсутствием видимых HMWS. Во фракциях B5-B3 (дорожки 10-12) происходило возрастание/увеличение интенсивности полос HMWS по мере увеличения кислотности градиента pH. В восстанавливаемом геле происходило восстановление всех относящихся к продукту молекул до тяжелых и легких цепей.

Пик элюции идентифицирован как YUbe и всего содержал 84% мономера и 16% HMWS, см. табл. 8 и фиг. 28.

В YUbe отсутствует Fc, таким образом, связывание с белком А происходило посредством каркаса подкласса переменной области VH3 V-областей человека. Полагают, что увеличенное связывание мультимерных молекул происходило вследствие увеличенной avidности этих молекул к белку А. В мультимерных молекулах содержится больше областей VH3, и, таким образом, они более сильно связываются со смолой с белком А, требуя для элюции меньшего pH.

Таблица 8

Анализ SEC G3000 фракций после очистки BУbe с белком А  
при элюции с градиентом рН

Фракция	Объем (мл)	Концентрация (мг/мл)	Белок (мг)	HMWS (%)	Мономер (%)
B9	2,12	0,026	0,055	0,0	100,0
B8	2,14	0,103	0,220	0,0	100,0
B7	2,16	0,527	1,138	0,0	100,0
B6	2,18	2,395	5,221	0,7	99,3
B5	2,20	4,290	9,438	5,4	94,6
B4	2,22	1,886	4,187	28,8	71,2
B3	2,24	0,308	0,690	52,2	47,8
B2	2,26	0,047	0,106	40,8	59,2
			Среднее:	16,0	84,0

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ отделения антитела, содержащего домен VH3 человека, в мономерной форме от антитела в мультимерной форме, включающий:

а) нанесение смеси, содержащей антитело, содержащее домен VH3 человека, в мономерной и мультимерной форме, на содержащий белок А хроматографический материал, где указанный белок А содержит домен D и/или E;

б) обеспечение связывания указанного антитела с белком А;

с) нанесение элюирующего буфера, который селективно разрушает связывание антитела в мономерной форме;

д) получение образующегося в результате элюата,

где антитело, содержащее домен VH3 человека, не содержит Fc-область;

где антитело, содержащее домен VH3 человека, содержит по меньшей мере два домена VH3 человека.

2. Способ по п.1, где элюирующий буфер на стадии с) имеет рН от 3,0 до 4,5.

3. Способ по п.1 или 2, дополнительно содержащий нанесение элюирующего буфера, который селективно разрушает связывание антитела в мультимерной форме после хроматографии с белком А, и получение образующегося элюата.

4. Способ по любому из предшествующих пунктов, где на содержащий белок А хроматографический материал после нанесения смеси, содержащей антитело, содержащее домен VH3 человека, в мономерной и мультимерной форме, добавляют первый раствор так, что несвязанный материал переходит в раствор.

5. Способ по п.1 или 2, где элюирующий буфер наносят на содержащий белок А хроматографический материал так, что высвобождается связанное антитело.

6. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанный белок А представляет собой нативный рекомбинантный белок А.

7. Способ по любому из предшествующих пунктов, где антитело, содержащее домен VH3, выбрано из F(ab')<sub>2</sub>, Fab-Fv, Fab-scFv, Fab-(scFv)<sub>2</sub>, Fab-(Fv)<sub>2</sub>, Fab-dsFv, диател, триател и тетрател.

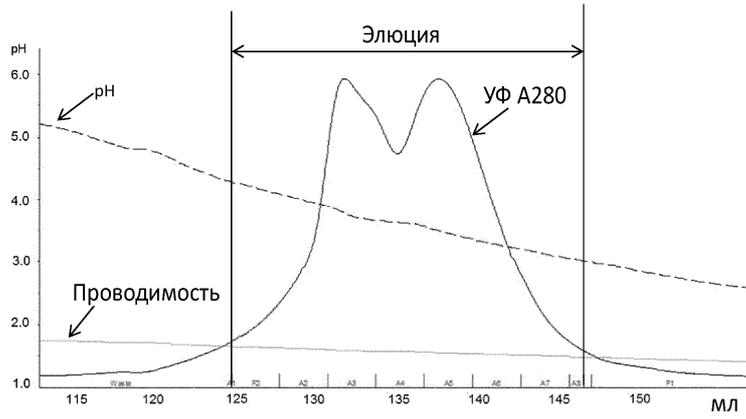
8. Способ по любому из предшествующих пунктов, где антитело, содержащее домен VH3, содержит переменный домен тяжелой цепи, представленный в SEQ ID NO: 11, и переменный домен легкой цепи, представленный в SEQ ID NO: 12.

9. Способ по любому из предшествующих пунктов, где антитело, содержащее домен VH3, специфически связывается с OX40.

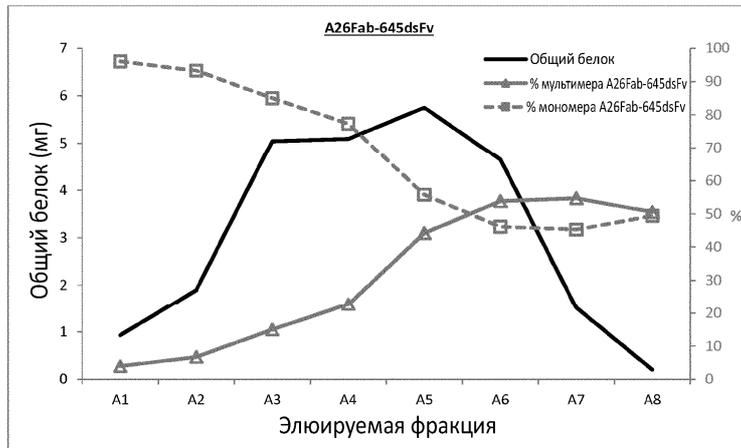
10. Способ по п.9, где указанное антитело, содержащее домен VH3, содержит:

CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, как определено в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3 соответственно; и

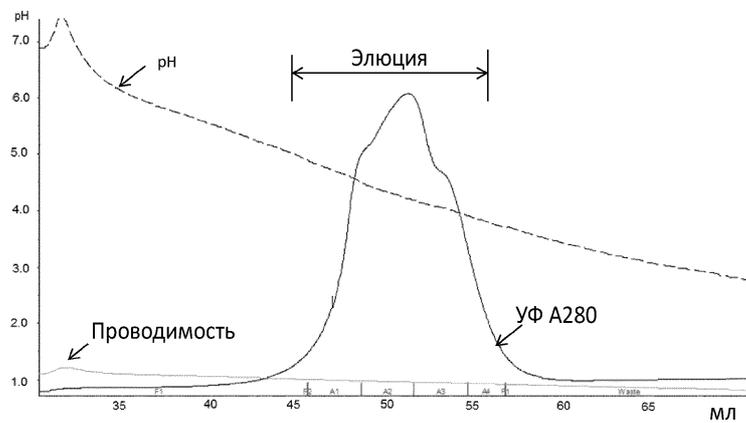
CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, как определено в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно.



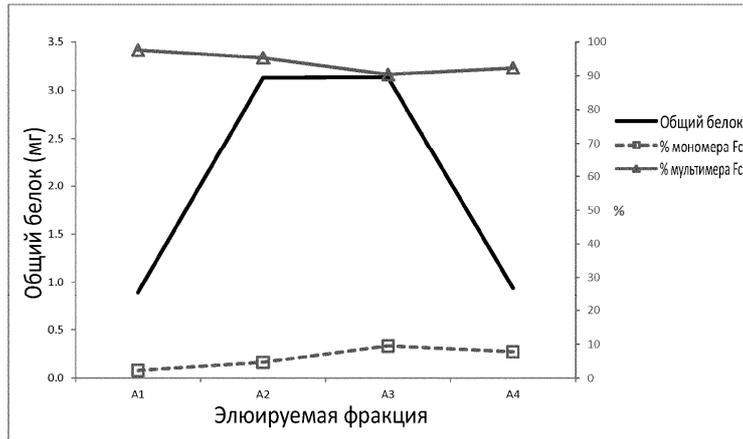
Фиг. 1



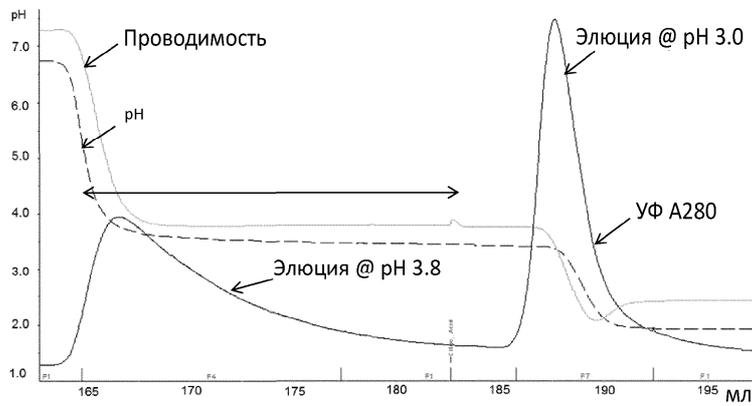
Фиг. 2



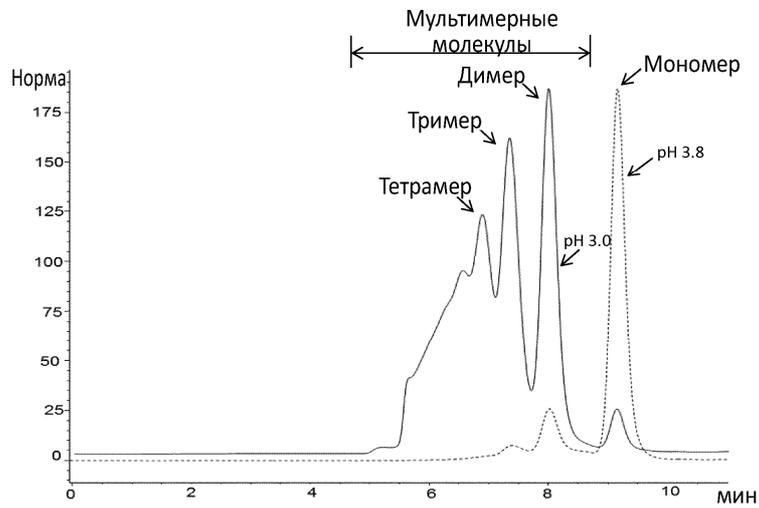
Фиг. 3



Фиг. 4

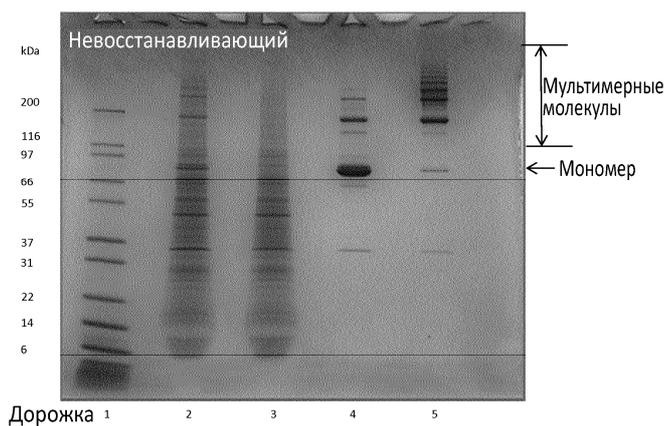


Фиг. 5



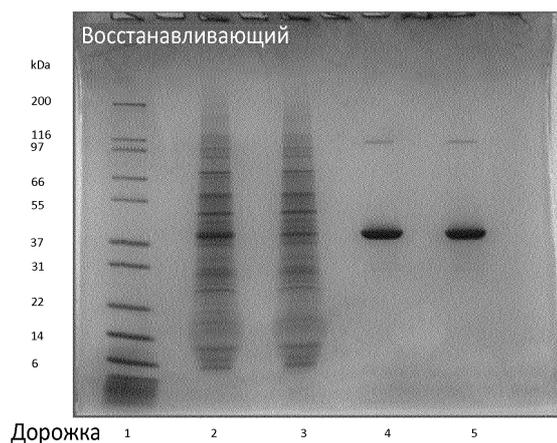
Фиг. 6

041325



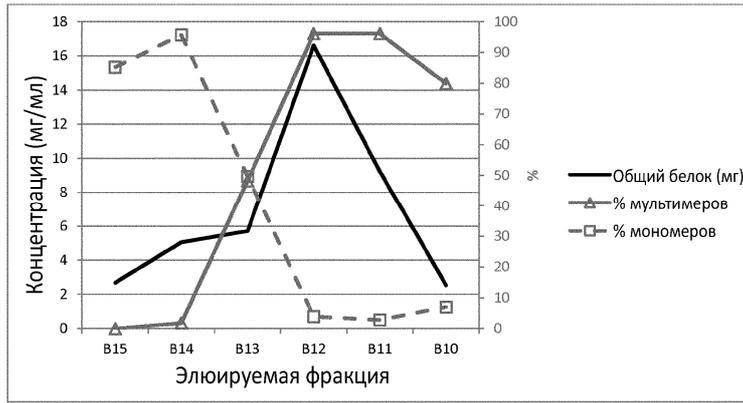
Дорожка	Образец
1	Маркеры молекулярной массы (Novex Mk12)
2	Загрузка MabSelect - очищенный от примесей супернатант культуры клеток
3	Прошедшая MabSelect фракция
4	Элюция pH 3.8
5	Элюция pH 3.0

Фиг. 7

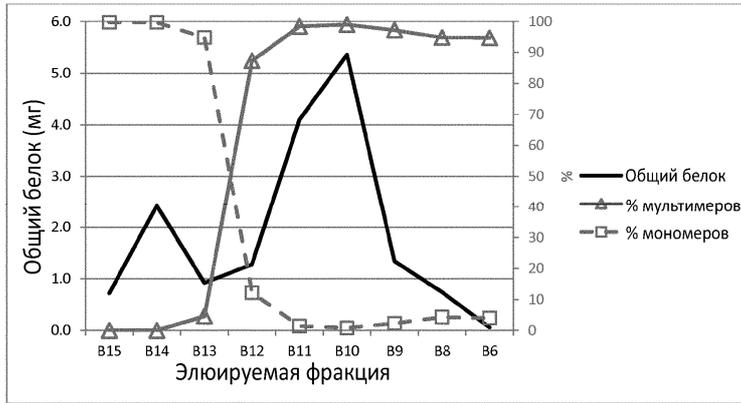


Дорожка	Образец
1	Маркеры молекулярной массы (Novex Mk12)
2	Загрузка MabSelect - очищенный от примесей супернатант культуры клеток
3	Прошедшая MabSelect фракция
4	Элюция pH 3.8
5	Элюция pH 3.0

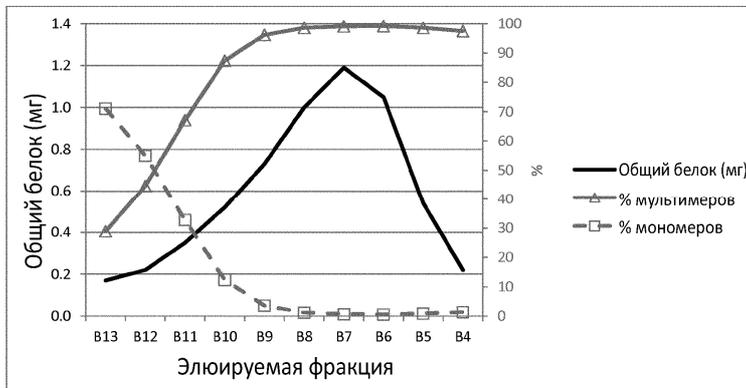
Фиг. 8



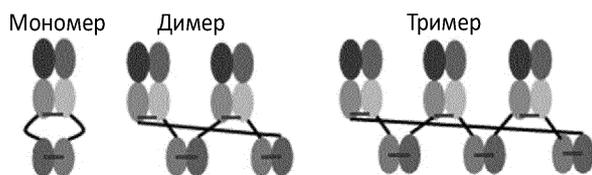
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



**Fab**=Тяжелая и легкая цепи Fab с дисульфидной связью между тяжелой и легкой цепями и линкерами, связанными с С-концами константных областей тяжелой цепи и легкой цепи для связывания с dsFv



**dsFv**=стабилизированный дисульфидами Fv и линкеры для связывания с Fab

Фиг. 12

(a) Варибельная область легкой цепи антитела A26, специфичного к OX40 (SEQ ID NO:7)

```
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRATQSIYNALAWYQQKPKAPKLLIYNANTLHTGVP SRFSA
SGSGTDSLTISSLQPEDFATYYCQQYYDYPLTFGGGTKVEIKR
```

(b) Варибельная область тяжелой цепи антитела A26, специфичного к OX40 (SEQ ID NO:8)

```
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASISPSGGLTYRDSV
KGRFTISRDDAKNSPYLQMNLSRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGTLLVTVSS
```

(c)

```
CDRH1: NYGIH (SEQ ID NO:1)
CDRH2: SISPSGGLTYRDSVKG (SEQ ID NO:2)
CDRH3: GGEGIFDY (SEQ ID NO:3)
CDRL1: RATQSIYNALA (SEQ ID NO:4)
CDRL2: NANTLHT (SEQ ID NO:5)
CDRL3: QQYYDYPLT (SEQ ID NO:6)
```

(d) Компонент Fab легкой цепи антитела к OX40 (SEQ ID NO:9)

```
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRATQSIYNALAWYQQKPKAPKLLIYNANTLHTGVP SRFSA
SGSGTDSLTISSLQPEDFATYYCQQYYDYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
```

(e) Компонент Fab тяжелой цепи антитела к OX40 (SEQ ID NO:10)

```
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASISPSGGLTYRDSV
KGRFTISRDDAKNSPYLQMNLSRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVKPEPKSC
```

Фиг. 13

(a) Компонент Fv тяжелой цепи антитела к альбумину (SEQ ID NO:11)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGIHWASGTTFYATWAKGRFTISRDNKNT  
VYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGTLLVTVSS

(b) Компонент Fv легкой цепи антитела к альбумину (SEQ ID NO:12)

DIQMTQSPSSVSASVGDRTITTCQSSPSVWSNFLSWYQQKPKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFRSGSGGTDFTLTIS  
SLQPEDFATYYCGGYSISDITFCGCTKVEIKRT

(c) Линкер 1 (SEQ ID NO:13)

SGGGSGGGGTGGGGS

(d) Линкер 2 (SEQ ID NO:14)

GGGGSGGGGTGGGGS

(e) A26 Fab Heavy-(G4S,G4T,G4S)-645dsFv(gH5) (SEQ ID NO:15)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKLEWVASISPSGGTTYRDSVKGRFTISRDDAKN  
SPYQLMNSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGTLLVTVSSASTKGP SVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV  
TVSWNSGALTSQVHTFPVAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNTRKVDKKEPKSCSGGGSGGGGT  
GGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGIHWASGTTFYATWAKGRFTISR  
NSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGTLLVTVSS

(f) A26 Fab Light-(3xG4S)-645dsFv(gL4) (SEQ ID NO:16)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITTCRATQSIYNALAWYQQKPKAPKLLIYNANTLHTGVPSRFRSASGSGTDSILTIS  
LQPEDFATYYCQQYYDYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNAL  
QSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGSGGGSDI  
QMTQSPSSVSASVGDRTITTCQSSPSVWSNFLSWYQQKPKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFRSGSGGTDFTLTIS  
LQPEDFATYYCGGYSISDITFCGCTKVEIKRT

Фиг. 14

(a) Вариабельный домен тяжелой цепи 645gH1 (SEQ ID NO:17)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGIHWASGTTFYATWAKGRFTISRDTTVY  
LQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGTLLVTVSS

(b) Вариабельный домен легкой цепи 645gL1 (SEQ ID NO:18)

DIVMTQSPSSVSASVGDRTITTCQSSPSVWSNFLSWYQQKPKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFRSGSGGTDFTLTIS  
SLQPEDFATYYCGGYSISDITFCGCTKVEIK

(c) A26 Fab Heavy-( 3xG4S)-645dsFv(gH1) (SEQ ID NO:19)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKLEWVASISPSGGTTYRDSVKGRFTISRDDAKN  
SPYQLMNSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGTLLVTVSSASTKGP SVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV  
TVSWNSGALTSQVHTFPVAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNTRKVDKKEPKSCSGGGSGGGGS  
GGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGIHWASGTTFYATWAKGRFTISR  
DTTVYVLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGTLLVTVSS

(d) A26 Fab Light-(3xG4S)-645dsFv(gL1) (SEQ ID NO:20)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITTCRATQSIYNALAWYQQKPKAPKLLIYNANTLHTGVPSRFRSASGSGTDSILTIS  
LQPEDFATYYCQQYYDYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNAL  
QSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGSGGGSD  
IVMTQSPSSVSASVGDRTITTCQSSPSVWSNFLSWYQQKPKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFRSGSGGTDFTLTIS  
LQPEDFATYYCGGYSISDITFCGCTKVEIK

Фиг. 15

(а) ДНК, кодирующая тяжелую цепь A26-645 (gH5), содержащая лидерную последовательность *OmpA E. coli* (SEQ ID NO:21)

ATGAGAAGACTGCTATAGCGATCGCAGTGGCGCTAGCTGGTTTCGCCACCGTGGCGCAAGCTGAAGTTCAGCTGGT  
 CGAGTCTGGAGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTTGTGCAGCAAGCGGTTTCACGTTCAACA  
 ACTACGGTATCCACTGGATTCTGTCAGGCACCAGTAAAGGCTGGAATGGGTAGCCTCTATCTCCGCTGTTGGT  
 CTGACGTAATACCGTACTGTCAAAGTCTGTTCCACATCTCTCGTATGACCGCAAAAACCTCCGTACTGCA  
 AATGAACCTCTGCGTGCAGAAGATACCGCAGTGTACTACTGCGCTACTGTTGGTGAAGGTATCTTCGACTACTGGG  
 GTCAGGGTACCCCTGGTAACTGTCTCGAGCGCTTCTACAAAGGGCCCAAGCGTTTTCCCACTGGCTCCGCTCTAAA  
 TCCACCTCTGGTGGTACGGCTGCACCTGGTGGTGAAGACTACTTCCAGAACCCAGTTACCGTGTCTTGGAA  
 CTCTGGTGCACCTGACCTCTGGTGTTCACACCTTCCAGCAGTCTCCAGTCTTCTGGTCTGTACTCCCTGTCTAGCG  
 TGGTTACCGTTCCGTTCTTCTCTGGTACTCAGACCTACATCTGCAACGTCACCCACAAAACCGTCCAAACCAAG  
 GTCGACAAAAAATCGAGCGAAATCCTGTAGTGGAGGTGGGGCTCAGGTGGAGCGGGACCGTGGAGGTGGCAG  
 CGAGGTTCAACTGCTTGAATCTGGAGGAGGCTAGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTTGTGCAGTAAAGCG  
 GCATCGACCTGAGCAATACGCCATCAACTGGGTGAGACAAGCTCCGGGGAAGTGTTAGAATGGATCGGTATAATA  
 TGGCCAGTGGGACGACCTTTTATGCTACATGGGCGAAAGGATTTACAATAGCCGGGACAAATAGCAAAAACAC  
 CGTGTATCCAAAATGAACCTTTCGAGCAGAGGACACGGCGGTACTATTGTGCTCGCACTGTCCAGGTTATA  
 GCACCTGCACCTACTTCGATCTGTTGGGACAAGGACCTGGTACTGTTTCAAGTTAA

## (б) ДНК, кодирующая тяжелую цепь A26-645 (gH5) (SEQ ID NO:22)

GAAGTTCAGCTGGTTCAGTCTGGAGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTCTTGTGCAGCAAGCGG  
 TTTACGTTCAACAACCTACGGTATCCACTGGATTCTGTCAGGCACCAGTAAAGGCTGGAATGGGTAGCCTCTATCT  
 CTCGCTCTGGTGGTTCGACGTAACCGTACTCTGTCAAAGTCTGTTCCACATCTCTGATGACGCGAAAAAC  
 TCTCCGTACTGCAAAATGAACCTCTGCGTGCAGAAGATACCGCAGTGTACTACTGCGCTACTGGTGGTGAAGGTAT  
 CTTCGACTACTGGGTGAGGTACCCCTGGTAACTGTCTCGAGCGCTTCTACAAAGGGCCCAAGCGTTTTCCCACTGG  
 CTCGCTCTTAAATCCACCTCTGGTGGTACGGCTGCACCTGGTGGTGGTGAAGACTACTTCCAGAACCCAGTT  
 ACCGTGTCTGGAACTCTGGTGCACCTCTGGTGTTCACACCTTCCAGCAGTCTCCAGTCTTCTGGTCTGTA  
 CTCCTCTGTCTAGCGTGGTACCGTCTCCGTTCTTCTCTGGTACTCAGACCTACATCTGCAACGTCACCCACAAAC  
 CGTCCAAACCAAGTTCGACAAAAAAGTTCGAGCGAAATCCTGTAGTGGAGGTGGGGCTCAGGTGGAGCGGGAC  
 GGTGGAGGTGGCAGCGAGTTCAACTGCTTGAATCTGGAGGAGCCTAGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTC  
 TTGTGCAGTAAAGGCATCGACTGAGCAATACGCCATCAACTGGGTGAGACAAGCTCCGGGGAAGTGTTAGAAT  
 GGATCGGTATAATATGGGCCAGTGGGACGACCTTTTATGCTACATGGGCGAAAGGATTTACAATAGCCGGGAC  
 AATAGCAAAAACCCGTGTATCTCCAAAATGAACCTTTCGAGCAGAGGACACGGCGGTACTATTGTGCTCGCAC  
 TGTCCAGGTTATAGCACTGCACCTACTTCGATCTGTTGGGACAAGGACCTGGTACTGTTTCAAGTTAA

Фиг. 16

(а) ДНК, кодирующая легкую цепь A26-645 (gL4), содержащая лидерную последовательность *OmpA E. coli* (SEQ ID NO:23)

ATGAAAAAGACAGCTATCGCAATTGCAGTGGCGTGGCTGGTTTCGCGACCGTTCGCAAGCTGATATCCAGATGAC  
 CCAGAGCCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGCGATCGTGTACTATTACCTGTGCAACCCAGAGCATCTACA  
 ACCTCTGGCTTGGTATCAGCAGAAACCGGGTAAAGCGCCAAAACCTCTGATCTACAACCGCAACACTCTGCATCT  
 GGTGTTCCGTCTCGTTTCTCTGCGTCTGGTCTGGTACGGACTACTCTGACCATCTCCTCTCTCCAGCCGGAAGA  
 TTTCCGCGACTACTTCCAGCAGTACTACGATTACCCACTGACGTTTGGTGGTGGTACCAAGTTGAGATCAAA  
 GTACCGTTGCAGCTCCATCCGTTCTCATCTTCCACCGTTCGACGCAACAGCTCAAAATCTGGTACTGCTTCTGCT  
 TGCCTCTGAAACCTCTATCCCGTGAAGCGAAAGTCCAGTGGAAAGTTCGACAACCGCCTCCAGTCTGGTAACTC  
 TCAGGAATCTGTGACGCAACAGGACTCCAAAGACTCCACCTACTCTGTCTAGCACCTGACTCTGTCCAAAGCAG  
 ACTACGAGAAACCAAAAGTGTACGCTTGCAGAGTTACCCATCAGGGTCTGAGCTCTCCGGTACCAAACTCTTAAT  
 AGAGGGAGTGTGGTGGCGTGGCAGTGGTGGAGGTTCCGGAGGTGGCGGTTCCAGACATCAAAATGACCCAGAG  
 TCCTTCATCGGTATCCGCTCCGTTGGCGATAGGGTACTATTACATGTCAAAGCTCTCTAGCGTCTGGAGCAATT  
 TCTATCTGGTATCAACAGAAACCGGGGAAGGCTCCAAAACCTCTGATTATGAAAGCTCGAAACTCACCAGTGA  
 GTTCCGTCAAGATTCAAGTGGCTTGGATCAGGGACAGACTTACGTTGACAATCAGTTCGCTGCAACCAAGGACTT  
 TGGACCTACTATTGTGGTGGAGTTACAGTAGCATAAGTATACGACATTTGGTGGGTAAGTGGTGGAAATCA  
 AACGTACCTAA

## (б) ДНК, кодирующая легкую цепь A26-645 (gL4) (SEQ ID NO:24)

GATATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGTCTCTCCGCCAGCGTAGGCGATCGTGTACTATTACCTGTGCAAC  
 CCAGAGCATCTACAACGCTCTGGCTTGGTATCAGCAGAAACCGGGTAAAGCGCCAAAACCTCTGATCTACAACCGCA  
 ACCTCTGCATACTGGTGTCCGCTCTGTTCTCTGCGTCTGGTCTGGTACGGACTACTCTGACCATCTCCTCT  
 CTCGAGCCGGAAGATTCGCGACCTACTACTGCCAGCAGTACTACGATTACCCACTGACGTTGGTGGTGGTACCCAA  
 AGTTGAGATCAAACTACGGTTGACGCTCCATCCGTTCTCATCTTCCACCGTCTGACGAACAGCTCAAACTCTGGTA  
 CTGCTCTGTCTGTTGGCTCTGAAACCTCTATCCCGTGAAGCGAAAGTCCAGTGGAAAGTTCGACAACCGCCTC  
 CAGTCTGGTAACTCTCAGGAATCTGTGACCGCAACAGGACTCCAAAGACTCCACCTACTCTGTCTAGCACCTGAC  
 TCTGTCCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTGTACGCTTGGCAAGTTACCCATCAGGGTCTGAGCTCTCCGGTTA  
 CCAAATCTTTAATAGAGGGAGTGTGGTGGCGTGGCAGTGGTGGAGGTTCCGGAGGTGGCGGTTCCAGACATA  
 CAAATGACCCAGAGTCTTATCGGTATCCGCTCCGTTGGCGATAGGGTACTATTACATGTCAAAGCTCTCCTAG  
 CGTCTGGAGCAATTTCTATCTGGTATCAACAGAAACCGGGGAAGGCTCCAAAACCTCTGATTATGAAAGCTCCGA  
 AACTCACCAGTGGAGTCCGTCGAAGATTCAAGTGGCTCTGGATCAGGGACAGACTTACGTTGACAATCAGTTCGCTG  
 CAACCCAGGACTTTCGACCTACTATTGTGGTGGAGTTACAGTAGCATAAGTATACGACATTTGGTGGGTAAGTGGTGGGTA  
 TAAGGTGGAAATCAACGTACCTAA

Фиг. 17

## (а) ДНК, кодирующая тяжелую цепь A26-645 (gH5), содержащая лидерную последовательность В72.3 (SEQ ID NO:25)

ATGGAATGGTCTGGGTCTTCTGTTTTCTCTTCTGTCACAACCGGGTGCACAGGAGGTGCAGCTCGTCGAGTC  
 TGGAGGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTTGTGCAGCAAGCGGTTTACAGTTACACCAACTACG  
 GTATCCACTGGATTCGTCAGGCACCAAGGTAAGGTCTGGAATGGGTAGCCCTATCTCTCCGTCTGGTGGTCTGACG  
 TACTACCGTGACTCTGTCAAAGGTCGTTTACCATCTCTCGTGATGACGCGAAAAACTCTCCGTACCTGCAGATGAA  
 CTCTCTGCGTGCAGAAGATACCGCAGTGTACTACTGCGCTACTGGTGGTGAAGGTATCTTCGACTACTGGGTGACG  
 GTACCTCGTAACTGTCTCAAGCGCTTCTACAAGGGCCCATCGGTCTTCCCTGGCACCTCTCCAAGAGCACC  
 TCTGGGGCAGCAGCGCCCTGGGTGCTCAAGGACTACTTCCCGAACCCTGACGGTGTCTGGAACTCAGG  
 CGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCTGGACTACTTCCCTCAGCAGCGTGGTGA  
 CCGTGGCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACCAAGGTGGAC  
 AAGAAGTTGAGCCCAAATCTTGTCCGGAGGTGGCGGTTCCGGAGGTGGCGGTACCGGTGGCGGTGGATCCGAAGT  
 CCAGCTGCTTGAATCCGGAGGCGGACTCGTGCAGCCCGGAGGCAGTCTTCCGTGTCTGCGCTGTATCTGGAATCG  
 ACCTGAGCAATTACGCCATCAACTGGGTGAGACAGGCACCTGGGAAATGCCTCGAATGGATCGGCATTATATGGCT  
 AGTGGGACGACCTTTATGTACATGGGCGAAGGTAGATTCACAATCTCACGGGATAATAGTAAGAACAACAGTGT  
 CCTGCAGATGAACCTCCGAGCAGAGGATACCGCCGTTTACTATTGTGCTCGCAGTCTCCAGGTTATAGCACTG  
 CACCTACTTTGATCTGTGGGGCAGGCACCTGGTCCCGTCTCGAGTTGA

## (б) ДНК, кодирующая тяжелую цепь A26-645 (gH5) (SEQ ID NO:26)

GAGGTGCAGCTCGTGCAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTTGTGCAGCAAGCGG  
 TTTACAGTTACCAACTACGGTATCCACTGGATTCGTCAGGCACCAAGGTAAGGTCTGGAATGGGTAGCCCTATCT  
 CTCCGTCTGGTGGTGCAGTACTACCGTACTCTGTCAAAGGTCGTTTACCATCTCTCGTGATGACGCGAAAAAC  
 TCTCCGTACCTGCAGATGAACCTCTGCGTGCAGAAGATACCGCAGTGTACTACTGCGCTACTGGTGGTGAAGGTAT  
 CTTCGACTACTGGGTGAGGTACCTCGTAACTGTCTCAAGCGCTTCTACAAGGGCCCATCGGTCTTCCCTGG  
 CACCTCTCCAAGAGCACCCTTGGGGCAGCAGCGCCCTGGGTGCTGCTGATCAAGGACTACTTCCCGAACCCTGGT  
 ACGGTGTCTGGAACCTCAGGCCTGACCGCGCTGCACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCTGGACTCTA  
 TCCCTCAGCAGCGTGGTGCAGTCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGC  
 CCAGCAACCAAGGTGGACAAAGTGTAGCCCAAATCTTGTCCGGAGGTGGCGGTTCCGGAGGTGGCGGTACC  
 GGTGGCGGTGGATCCGAAGTCCAGCTGCTTGAATCCGGAGGCGGACTCGTGCAGCCCGGAGGCAGTCTTCCGTGT  
 CTGCGTGTATCTGGAATCGACTGAGCAATTACGCCATCAACTGGGTGAGACAGGCACCTGGGAAATGCCTCGAAT  
 GGATCGGCATTATATGGGCTAGTGGGACGACCTTTTATGTACATGGGCGAAGGTAGATTCACAATCTCACGGGAT  
 AATAGTAAGAACAACAGTGTACTCTGCAGATGAACCTCCGAGCAGAGGATACCGCCGTTTACTATTGTGCTCGCAG  
 TGTCCAGGTTATAGCACTGCACCTACTTTGATCTGTGGGGCAGGCACCTGGTCCCGTCTCGAGTTGA

Фиг. 18

## (а) ДНК, кодирующая легкую цепь A26-645 (gL4), содержащая лидерную последовательность В72.3 (SEQ ID NO:27)

ATGTCAGTTCACACAGGTCGTGGGCTGCTTCTGTTGGCTCACCAGTGTAGGTGTGATATCCAGATGACCCA  
 GAGTCCAAGCAGTCTCTCCGACGCTAGGCGATCGTGTGACTATTACCTGTCGTGCAACCCAGAGCATCTACAACG  
 CTCTGGCTTGGTATCAGCAGAAACCGGGTAAAGCGCCAAAACCTCTGATCTACAACCGCAACACTCTGCATACC  
 GTTCCGTCTCGTTTCTGCGTCTGGTCTGGTACGGACTCTACTCTGACCATCTCCTCTCTGCAGCCGGAAGATT  
 CGCGACCTACTACTGCGAGCTACTACGATTACCCACTGACGTTTGGTGGTGGTACCAAGTTGAGATCAAACTGTA  
 CGGTGGCTGCACCATCTGTCTCATCTTCCCGCATCTGATGAGCAGTGAAGTCTGGCAGTGCCTCTGTTGTGTC  
 CTGCTGAATAACTTCTACCTAGAGAGGCCAAAGTCCAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTTCAATCCGGAACCTCCA  
 GGAGAGTGTCACTGAGCAGGACTCAAAGGACTCCACCTATAGCCTTAGCAGCAGACTGACACTGAGCAAGGCTGACT  
 ACCAGAAACACAAGGTCACGCTGCGAAGTGCACATCAAGGCCCTGAGCTCACCCGTGACAAAGAGCTTTAAACAGG  
 GGAGATGTGTGGAGGTGGCTCTGCGGTGGTGGCTCCGGAGCGGAGGAAGCGACATCCAGATGACCCAGAGCC  
 TTCTCTGTAAAGCGCCAGTGTGCGGAGACAGTACTATTACCTGCGAAAGCTCCCTTCACTGCTGGTCCAATTTTC  
 TATCTGTGACAGCAAAAGCCCGGAAAGGCTCCTAAATGCTGATCTACGAAGCAAGCAACTCACCAGCGGGGTG  
 CCCAGAGGTTACAGCGGAGTGGTCTGGAAGTACTTACCTGACAACTCTCTCACTCCAGCCGAGGACTTCGC  
 CACCTATTACTGCGGTGGAGGTTACAGTAGCATAAGTATACGACATTTGGATGCGGCACATAAAGTGGAAATCAAGC  
 GTACCTGA

## (б) ДНК, кодирующая легкую цепь A26-645 (gL4) (SEQ ID NO:28)

GATATCCAGATGACCCAGAGTCCAAGCAGTCTCTCCGACGCTAGGCGATCGTGTGACTATTACCTGTCGTGCAAC  
 CCAGAGCATCTACAACGCTTGGCTTGGTATCAGCAGAAACCGGGTAAAGCGCCAAAACCTCTGATCTACAACCGCA  
 ACACCTGCTGATACCGGTGTTCCGTCTCGTTTCTGCGTCTGGTCTGGTACGGACTCTACTCTGACCATCTCCTCT  
 CTGACGCGGAAAGATTTCGCGACCTACTACTGCGCAGTACTACGATTACCCACTGACGTTTGGTGGTGGTACCAA  
 AGTTGAGATCAAACGTACGGTGGTGCACCATCTGTCTTCTATCTTCCCGCATCTGATGAGCAGTGAAGTCTGGCA  
 CTGCTCTGTTGTGCTGCTGCTGAATAACTTCTACCTAGAGAGGCCAAAAGTCCAGTGGAAAGGTGGATAACGCGCTT  
 CAATCCGGAACCTCCAGGAGAGTGTCACTGAGCAGGACTCAAAGGACTCCACCTATAGCCTTAGCAGCAGACTGAC  
 ACTGAGCAAGGCTGACTACGAGAAACACAAGGCTTACGCTGCGAAGTGCACATCAAGGCCCTGAGCTCACCCTGTA  
 CAAAGAGCTTTAAAGGGGAGAGTGGTGGAGGTGGCTCTGCGGTGGTGGCTCCGGAGCGGAGGAAGCGACATC  
 CAGATGACCCAGAGCCCTTCTCTGTAAGCGCCAGTGTGCGGAGCAGAGTACTATTACCTGCGCAAGCTCCCTTTC  
 AGTCTGGTCCAAATTTCTATCTGTGACAGCAAAAGCCCGGAAAGGCTCCTAAATGCTGATCTACGAAGCAAGCA  
 AACTCACCAGCGCGTGCACAGGTTACGCGCAGTGGTCTGGAAGTACTTTACCTGACAACTCTCTCACTC  
 CAGCCGAGGACTTCGCCACCTATTACTGCGGTGGAGGTTACAGTAGCATAAGTATACGACATTTGGATGCGGCAC  
 TAAAGTGGAAATCAAGCGTACTCTGA

Фиг. 19

(a) Вариабельный домен тяжелой цепи антитела к альбумину (без дс)  
(SEQ ID NO:29)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKLEWIGIIWASGTTFYATWAKGRFTISRDNKNT  
VYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLTVTVSS

(b) Вариабельный домен тяжелой цепи антитела к альбумину (дс) (SEQ ID NO:30)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKLEWIGIIWASGTTFYATWAKGRFTISRDNKNT  
VYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLTVTVSS

(c) Вариабельный домен легкой цепи антитела к альбумину (без дс) (SEQ ID NO:31)

DIQMTQSPSSVSASVGDVVTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPKGKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFRSGSGSGDTFLTITIS  
SLQPEDFATYYCGGYSISDITTFGGGKVEIKRT

(d) Вариабельный домен легкой цепи антитела к альбумину (дс) (SEQ ID NO:32)

DIQMTQSPSSVSASVGDVVTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPKGKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFRSGSGSGDTFLTITIS  
SLQPEDFATYYCGGYSISDITTFGGGKVEIKRT

(e) Линкер 1 (SEQ ID NO:33) SGGGSGGGGTGGGGS

(f) Линкер 2 (SEQ ID NO:34) GGGSGGGSGGGGS

645 gH5gL4, специфичное к альбумину (SEQ ID NO:35)

GAGGTTCAAGTGTGGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTCTTGTGCAGTAAGCGG  
CATCGACCTGTCCAACACCGGATTAACGGGTACGTCAGGCACCGGGTAAAGGTCTGGAATGGATCGGCATCATCT  
GGCCTCTGGTACGACCTTCTACGCTACTTGGGCCAAAGTTCGTTTACACCATCTCCCGTGACAACTTAAAAACACC  
GTGTACCTGACAGATGAACTCTTGCCTGCGGAAGACACTGCGGTTTACTATTGCGCGCGTACCGTTCGGGGTATTC  
TACTGCACCGTACTTGCACCTGTGGGTGAGGGTACTTGGTTACCGTCTCGAGTGGAGGTGGCGGTCTGGCGGTG  
CGGTTCCGGTGGCGGTGGATCGGGAGGTGGCGGTCTGTATATCCAGATGACCCAGAGTCCAAGCAGTGTTCGGCC  
AGCGTAGCGATCGTGTGACTATTACCTGTGAGTCTCTCCGAGCGTTTGGTCCAACTTCTGAGCTGTACACAGCA  
GAAACCGGGTAAAGCCCGAACTGTGATCTACGAGGCGTCTAAACTGACCTCTGGTGTACCGTCCCGTTTCTCTG  
CCTTGGCTCTGGTACGGACTTCACTCTGACCATCTCTCTCTGACCGCGGAAGACTTTGCAACGTAAGTACTGCGGT  
GGTGGTACTCTTCCATCTCTGACACACCGTTCGGTGGAGGCACCAAGTTGAAATCAAACGTACGCATCACCATCA  
CCATCACCATCACCATCAC

645 gH5gL4, специфичное к альбумину (SEQ ID NO:36)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKLEWIGIIWASGTTFYATWAKGRFTISRDNKNT  
VYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLTVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGDIQMTQSPSSVSA  
SVGDVVTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPKGKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFRSGSGSGDTFLTITISLQPEDFATYYC  
GGYSISDITTFGGGKVEIKRTHNNNNNNNNNN

Фиг. 20а

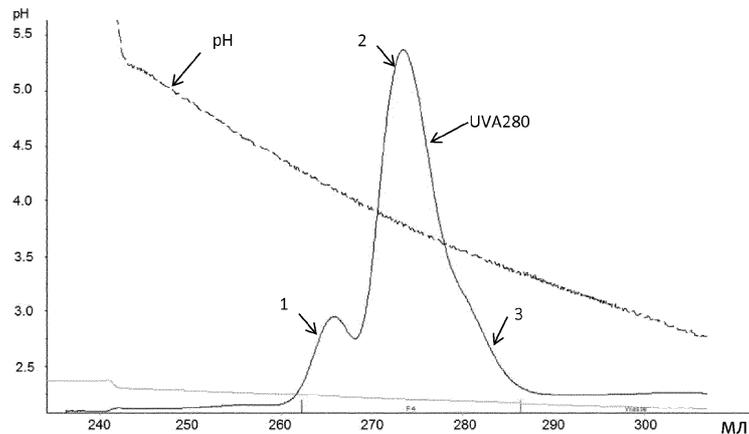
645 gH5gL4ds, специфичное к альбумину (SEQ ID NO:37)

GAGGTTCAAGTGTGGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTCTTGTGCAGTAAGCGG  
CATCGACCTGTCCAACACCGGATTAACGGGTACGTCAGGCACCGGGTAAAGGTCTGGAATGGATCGGCATCATCT  
GGCCTCTGGTACGACCTTCTACGCTACTTGGGCCAAAGTTCGTTTACACCATCTCCCGTGACAACTTAAAAACACC  
GTGTACCTGACAGATGAACTCTTGCCTGCGGAAGACACTGCGGTTTACTATTGCGCGCGTACCGTTCGGGGTATTC  
TACTGCACCGTACTTGCACCTGTGGGTGAGGGTACTTGGTTACCGTCTCGAGTGGAGGTGGCGGTCTGGCGGTG  
CGGTTCCGGTGGCGGTGGATCGGGAGGTGGCGGTCTGTATATCCAGATGACCCAGAGTCCAAGCAGTGTTCGGCC  
AGCGTAGCGATCGTGTGACTATTACCTGTGAGTCTCTCCGAGCGTTTGGTCCAACTTCTGAGCTGTACACAGCA  
GAAACCGGGTAAAGCCCGAACTGTGATCTACGAGGCGTCTAAACTGACCTCTGGTGTACCGTCCCGTTTCTCTG  
CCTTGGCTCTGGTACGGACTTCACTCTGACCATCTCTCTCTGACCGCGGAAGACTTTGCAACGTAAGTACTGCGGT  
GGTGGTACTCTTCCATCTCTGACACACCGTTCGGTGGAGGCACCAAGTTGAAATCAAACGTACGCATCACCATCA  
CCATCACCATCACCATCAC

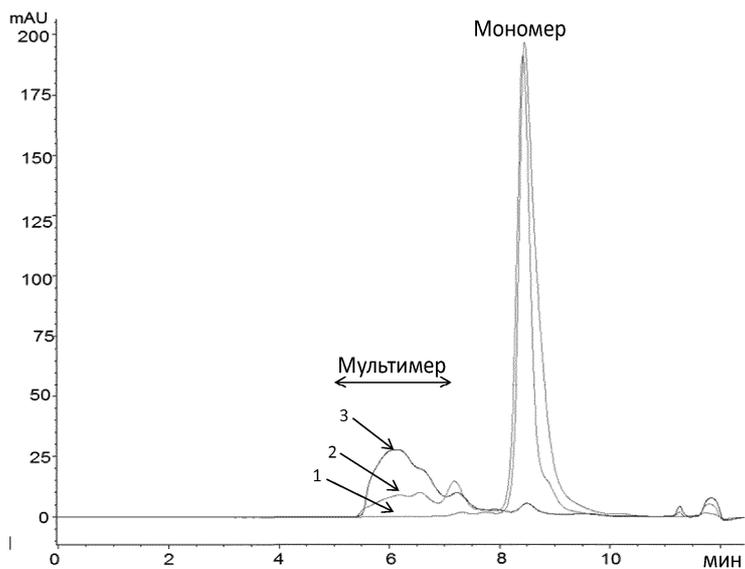
645 gH5gL4ds, специфичное к альбумину (SEQ ID NO:38)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKLEWIGIIWASGTTFYATWAKGRFTISRDNKNT  
VYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLTVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGDIQMTQSPSSVSA  
SVGDVVTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPKGKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFRSGSGSGDTFLTITISLQPEDFATYYC  
GGYSISDITTFGGGKVEIKRTHNNNNNNNNNN

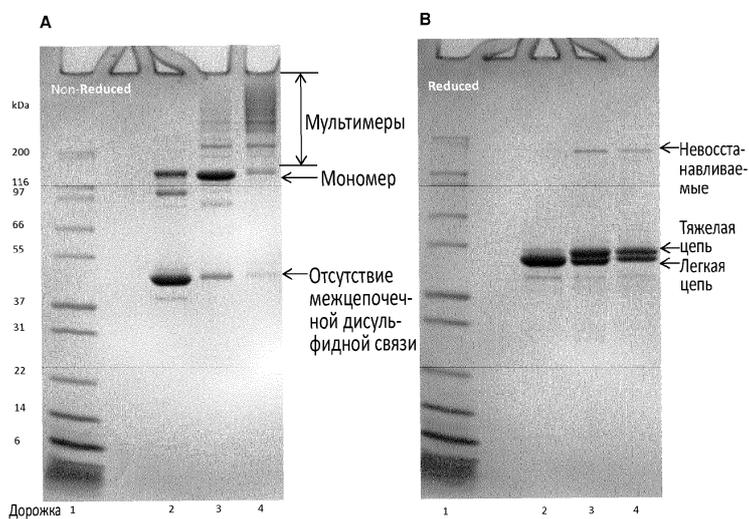
Фиг. 20б



Фиг. 21

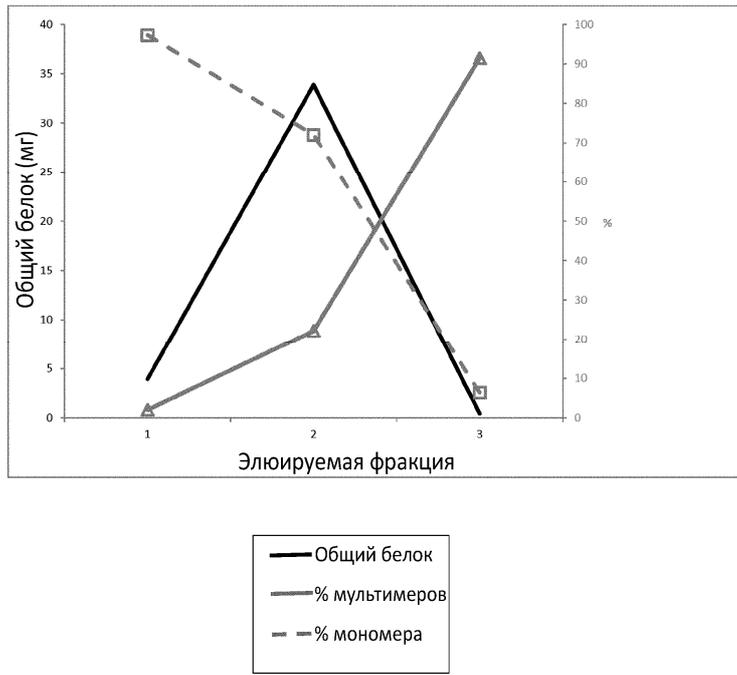


Фиг. 22

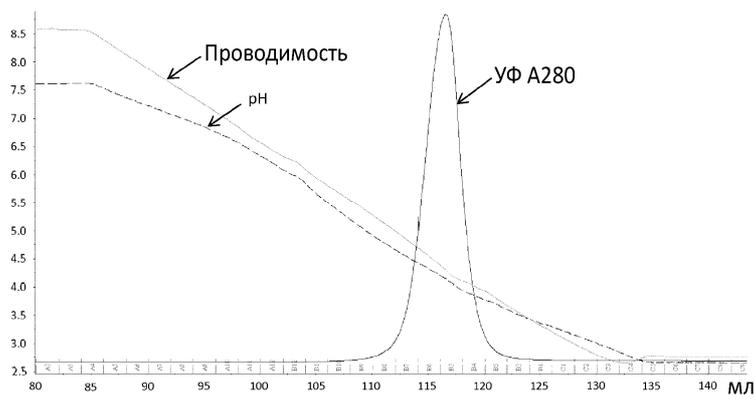


Дорожка	Образец
1	Маркеры молекулярной массы (Novex Mk12)
2	Фракция 1
3	Фракция 2
4	Фракция 3

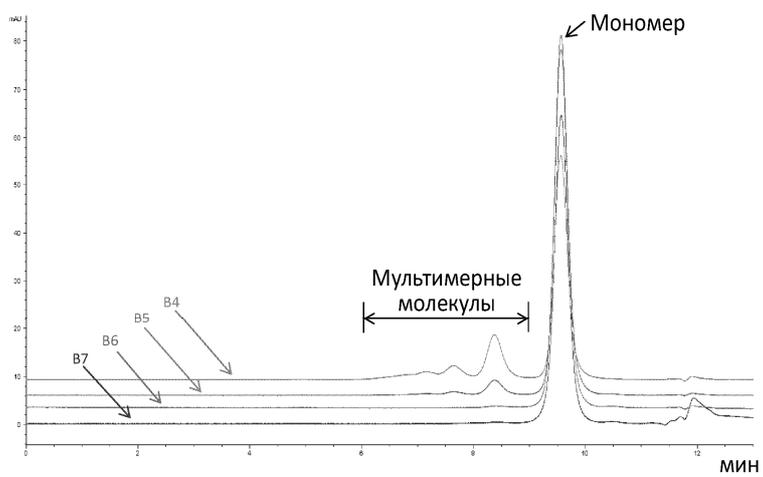
Фиг. 23



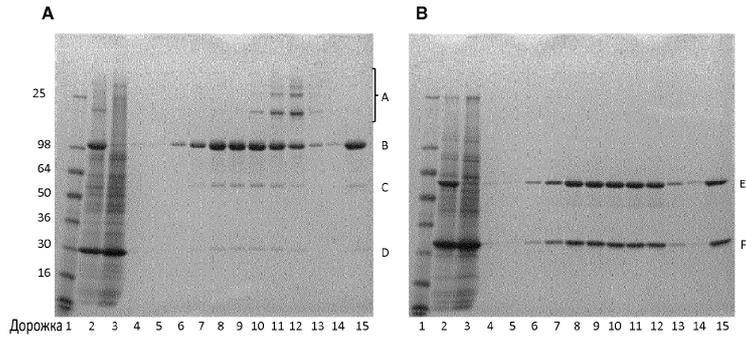
Фиг. 24



Фиг. 25

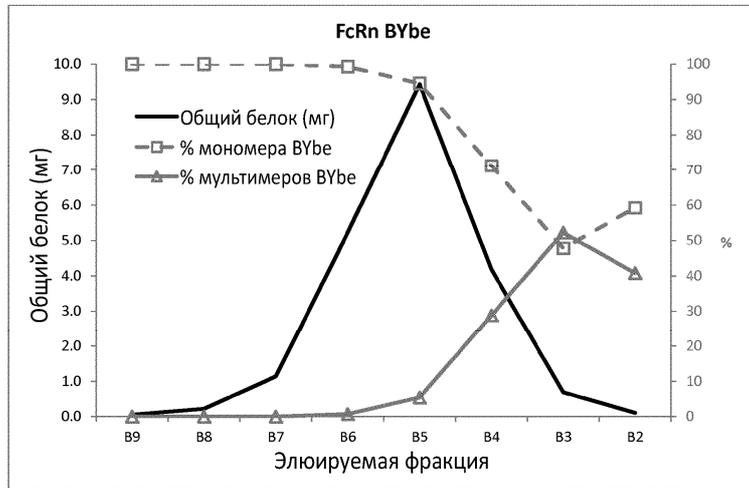


Фиг. 26

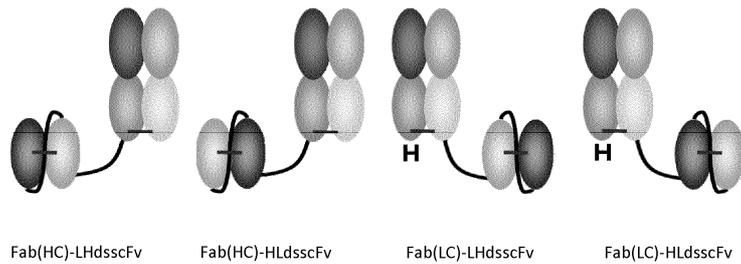


- Ключ:
- A: Мультимеры VYbe
  - B: Мономер VYbe
  - C: Не связанная дисульфидными связями тяжелая цепь
  - D: Не связанная дисульфидными связями легкая цепь
  - E: Восстановленная тяжелая цепь
  - F: Восстановленная легкая цепь
- Дорожка: 1 Маркер молекулярной массы (See Blue)  
 2 Загрузка MabSelect (очищенный от примесей супернатант культуры)  
 3 Прошедшая MabSelect фракция (F3)  
 4 Промывка PBS (F4)  
 5 Промывка фосфатом/цитратом (F5)  
 6 Фракция B9  
 7 Фракция B8  
 8 Фракция B7  
 9 Фракция B6  
 10 Фракция B5  
 11 Фракция B4  
 12 Фракция B3  
 13 Фракция B2  
 14 Фракция B1  
 15 Эталонный стандарт (белок G и очищенный на S200 VYbe)

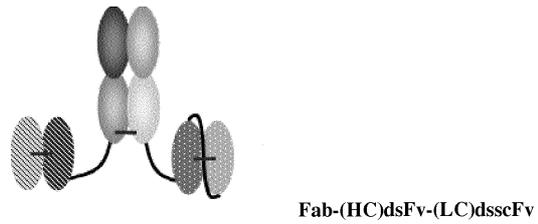
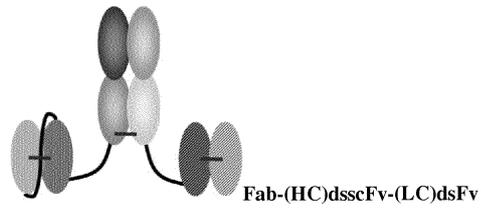
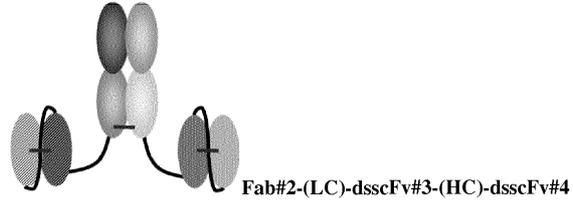
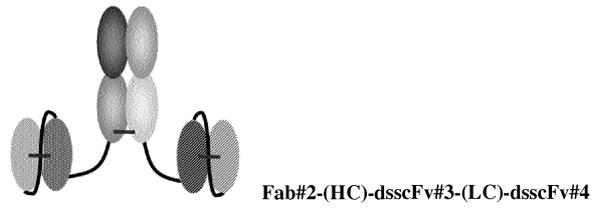
Фиг. 27



Фиг. 28



Фиг. 29



Фиг. 30