(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 041608 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.11.14

(21) Номер заявки
201890041

(22) Дата подачи заявки
2016.06.15

(51) Int. Cl. ***C07K 16/24*** (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(54) ГЕТЕРОДИМЕРНЫЙ ПОЛИСПЕЦИФИЧНЫЙ ФОРМАТ АНТИТЕЛ

(31) **15001758.0**
(32) **2015.06.15**
(33) **EP**
(43) **2018.07.31**
(86) **PCT/EP2016/001002**
(87) **WO 2016/202457 2016.12.22**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
НУМАБ ТЕРАПЬЮТИКС АГ (CH)

(72) Изобретатель:
Мейер Себастьян, Урех Дэвид (CH)

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

(56) WO-A1-2014122529
WO-A1-2011086091
WO-A1-2012135345
WO-A2-2012088290
WO-A1-2014022540
WO-A1-2014180577
WO-A1-2013003652
WO-A1-2014180754
WO-A1-2010132872

(57) Изобретение относится к новому гетеродимерному полиспецифичному формату множества вариабельных доменов антител, включающему основу из двух разделенных пар вариабельных доменов, где оба вариабельных домена легких цепей и оба когнатных вариабельных домена тяжелых цепей расположены в тандеме на двух отдельных белковых цепях соответственно.

041608 B1

041608 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к новому гетеродимерному полиспецифичному формату множества вариабельных доменов антител, включающему основу из двух разделенных пар вариабельных доменов, где оба вариабельных домена легких цепей и оба когнатных вариабельных домена тяжелых цепей расположены в тандеме на двух отдельных белковых цепях соответственно.

Уровень техники

За последние сорок лет с момента создания первых моноклональных антител [R17] антитела становятся все более важным классом биомолекул для исследовательских, диагностических и терапевтических целей.

В качестве терапевтических агентов антитела разрабатываются в направлении более рационально подобранных функциональных возможностей, что, таким образом, улучшает и расширяет присущие им свойства. Примеры включают в себя оптимизацию эффекторных функций с помощью гликоинженерии [R18], специфичную локализацию, например переход через гематоэнцефалический барьер [R19] или настраиваемое время полужизни, например, путем усиления связывания с FcRn [R20].

Дополняющим подходом функционализации антител является объединение специфичного связывания с различными мишенями в одной молекуле для создания би- или полиспецифичных антител или фрагментов антител, что обеспечивает альтернативные механизмы действия, такие как перенацеливание Т-клеток, например, проиллюстрированное биспецифичным антителом Блинатумомабом или триспецифичным антителом Катумаксомабом.

Несмотря на то что на сегодняшний момент разработано большое количество различных форматов полиспецифичных антител [R21], текущий репертуар форматов би- и полиспецифичных антител все еще имеет значительные технические проблемы в производстве и низкую гибкость, причем только несколько форматов позволяют три- и полиспецифичное связывание, и еще меньшее количество форматов поддерживает образование гетеродимерных белков.

Ранее были предложены различные полиспецифичные форматы. Концептуально эти форматы можно отнести к трем категориям: a) одноцепочечные полиспецифичные форматы, где различные связывающиеся с мишенями домены расположены все на одной белковой цепи, экспрессирующейся с одного гена; b) гомо- би- и гомо-мультимерные форматы, где различные связывающиеся с мишенями домены расположены на идентичных белковых цепях, которые собираются с использованием мультимеризующего домена, что приводит к образованию би-/поливалентных и, возможно, также полиспецифичных комплексов; и c) гетеродимерные форматы, где связывающиеся с мишенями домены расположены на различных белковых цепях, а сборка двух белковых цепей обеспечивается гетеродимеризующим доменом.

Гетеродимерные полиспецифичные форматы в принципе имеют преимущество в том, что связывающие домены с различной специфичностью и аффинностью легко могут быть протестированы в различных комбинациях путем простой перестановки двух гетеродимеризующихся белковых цепей, позволяя тем самым поиск оптимальных комбинаций специфичности и аффинности напрямую в конечном формате без необходимости утомительного клонирования.

Такой скрининг в конечном формате продукта требуется в тех случаях, когда связывающие свойства и/или сила связывания различных доменов должны быть тщательно согласованы друг с другом для достижения оптимальной силы действия биспецифичного белка, одновременно минимизируя риск неспецифичных эффектов. В клинической практике это означает оптимальную эффективность при минимальном риске развития побочных эффектов. Ситуациями, где требуются такие оптимальные комбинации, могут являться, например, одновременное ингибирование двух провоцирующих заболевание цитокинов, которые продуцируются в процессе заболевания в различных концентрациях. В этой ситуации терапевтический биспецифичный белок должен обеспечивать эффективное ингибирование обоих цитокинов в одной и той же терапевтической дозе.

Другим примером, где в полиспецифичной молекуле должны быть согласованы характеристики связывающихся с мишенями доменов, является терапия раковых заболеваний, где цитотоксическое антитело направлено на две мишени на поверхности опухолевых клеток. В то время как две мишени антитела на клеточной поверхности в этой ситуации могут коэкспрессироваться исключительно на раковых клетках, они могут экспрессироваться по отдельности в различных здоровых тканях. В терапии опухолевых заболеваний для достижения наилучшей эффективности при низком риске неблагоприятных побочных эффектов цитотоксическое антитело предпочтительно должно связываться с клеткой, когда обе мишени коэкспрессируются, но не должно связываться с тканями, экспрессирующими только одну из двух мишеней. Для достижения этой цели аффинности двух связывающихся с мишенями доменов должны быть подобраны таким образом, чтобы с одной стороны аффинность отдельных доменов к своей мишени была слишком слабой, чтобы привести к лизису клеток, а с другой стороны кооперативная авидность в результате совместного связывания биспецифичной молекулы с обоими мишенями на раковой клетке была достаточной, чтобы вызвать лизис клеток. Из-за геометрических ограничений в результате одновременного связывания с различными макромолекулами, иммобилизованными на поверхности клеток, комбинация доменов для достижения максимального кооперативного связывания является не только функцией аф-

финности, но также и эпитопов, и может быть определена только путем тестирования различных комбинаций доменов в фактическом формате продукта.

Нативное антитело IgG-типа можно рассматривать как гомодимерный формат.

Для того чтобы увеличить количество специфичностей связывания в гомодимерном формате антител, использующем классическую IgG-архитектуру в качестве каркаса, могут быть добавлены дополнительные связывающие фрагменты, такие как одноцепочечные Fv [R15], Fv [R16], однодоменные фрагменты [например, нанотела: Huang et al., Expert Rev Mol Diagn. 10 (2010):777-85] или альтернативные каркасы [например, финомеры: Schlatter et al., MAbs. 4 (2012) 497-508] на амино- или карбокси-конец обеих тяжелой и легкой цепей. Одно из преимуществ этого подхода состоит в том, что би- и триспецифичные конструкции могут быть получены с помощью обычного IgG в качестве каркасного домена, что позволяет использовать большинство технологий производства и модификации, которые были разработаны для обычных IgG. Однако из-за гомодимерной природы традиционных Fc-областей этот подход всегда будет приводить по меньшей мере к двум идентичным связывающим доменам на молекулу и, следовательно, к двухвалентному связыванию с определенной мишенью. Это может быть не всегда желательно, в частности: (a) если только кооперативное связывание с двумя мишенями должно привести к желаемому эффекту; (b) если молекулярная масса не должна дополнительно увеличиваться. Кроме того, этот подход часто страдает от плохой стабильности доменов присоединяемых связывающих фрагментов, что делает их непригодными в использования в фармацевтике.

Концепция слияния с дополнительными связывающими доменами для увеличения количества специфичностей связывания может быть также применена к Fab-фрагментам [R14] или к другим антиген-связывающим фрагментам IgG [R23]. Вследствие гетеродимерной природы Fab, состоящего из тяжелой и легкой цепей, Fab-фрагмент может быть использован в качестве гетеродимеризующего домена. Fab-фрагмент, например, был использован для конструирования так называемого Tribody. В этом формате scFv-фрагменты слиты с карбоксиконцами обоих легкой и тяжелой цепей Fab, давая в результате действительно гетеродимерную три-специфичную молекулу. Связывание легкой цепи и тяжелой цепи в Fab происходит главным образом за счет взаимодействия между CL и CH1, которые дополнительно соединены ковалентной дисульфидной связью [R2] Проблемами этого формата являются: (a) ограничение стабильности наименее стабильным компонентом, которым, наиболее вероятно, является присоединяемый scFv; и (b) ограничение числа специфичностей связывания максимум тремя мишенями.

В качестве подхода для снятия ограничений гомодимерных биспецифичных форматов были предложены гетеродимерные IgG [R31]. Простая коэкспрессия двух различных моноклональных антител в одной клетке с очень низкой вероятностью приводит к сборке гетеродимерных биспецифичных IgG, где две различные тяжелые цепи образуют пару друг с другом, и две различные легкие цепи будут образовывать пары с их соответствующими тяжелыми цепями [R24]. Однако это также может привести к: a) неправильному образованию пар между тяжелыми и легкими цепями с различной специфичностью; и b) смесям различных комбинаций тяжелых цепей, дающих в результате моно- и биспецифичные варианты. Для устранения этих трудностей были предложены несколько подходов, которые создают искусственную асимметрию молекул. В концепции "выпуклость-впадина" [R3, R4] используется генно-инженерная модификация поверхности взаимодействия между тяжелыми цепями или тяжелой цепью и легкой цепью, чтобы направить связывание коэкспрессирующихся цепей в желаемую конфигурацию. В другом подходе методика CrossMab [R5] позволяет селективное образование пар между генно-инженерно модифицированными тяжелой и легкой цепями. Недостатком этих методик является то, что любую остаточную фракцию не образовавших пары молекул очень трудно отделить от продукта. Поэтому, другие методики сфокусированы на проблеме разделения путем создания отличающихся связывающих свойств для моно- и биспецифичных связывающих молекул [R22], а с другой стороны - допускают потери выхода, вызванные стохастическим распределением вариантов.

Еще одним ограничением гетеродимерных форматов на основе IgG является то, что все они должны содержать эффекторный домен Fc. Формат, в котором гетеродимеризация будет определяться связывающимися с мишенями доменами, направленными на любую желаемую мишень, позволит увеличить количество специфичностей связывания/функциональностей при той же самой или более низкой молекулярной массе. Молекулы с более низким молекулярным весом более эффективно проникают в ткани-мишени (например, в солидные опухоли) и, таким образом, способствуют повышению эффективности при той же самой или более низкой дозе. Такие низкомолекулярные форматы могут быть дополнительно генно-инженерно модифицированы, чтобы иметь время полужизни в сыворотке, сравнимое с таковым у IgG, путем простого добавления, например, связывающего домена, который взаимодействует с сывороточным альбумином.

В альтернативном подходе для придания желаемой полиспецифичности используются слитые белки, не принадлежащие к классу антител, например scFv-фрагменты. Примерами таких слитых белков являются Dock-and-Lock [R25], барназа-барстар [R26], jun-fos [R27], TNF [R28] или HSA [R29]. Эти концепции имеют общее свойство в том, что они добавляют по меньшей мере одну пару доменов, которые взаимодействуют гетеродимерным образом, объединяя би- или полиспецифичные связывающие домены. Эти гетеродимеризующиеся домены напрямую не вовлечены в связывание мишеней, тем не менее, они

увеличивают молекулярную массу белка аналогично первой константной области (C1) в формате Tribody. Кроме того, они могут дать риск повышения иммуногенности у человека за счет включения эпитопов и последовательностей животных.

В отличие от взаимодействия между CL и CH1, обсуждаемого выше, связывание образующих паратоп доменов VL и VH, как правило, рассматривается как слабое. Однако существует несколько концепций гетеродимерных фрагментов антител, которые состоят исключительно из вариабельных доменов антител. Подходы, такие как диантитела [R6], DART [R10] и tandab [R7, R8], среди прочего, предлагают элегантный и минималистичный подход к созданию гомо- и гетеродимерных биспецифичных и би- тетра-валентных сборок. Наиболее важными ограничениями этих стратегий форматирования являются: (a) добавление дополнительных специфичностей связывания путем слияния, например, scFv с амино- или карбоксиконцом любой цепи диантител, или DART может привести к образованию внутрицепочечных пар вариабельных доменов легкой и тяжелой цепей, таким образом делая гетеродимеризацию двух белковых цепей очень проблематичной; (b) вследствие наблюдаемого ранее слабого связывания между поверхностями вариабельных доменов легкой и тяжелой цепей эти форматы страдают низкой стабильностью мономеров и плохой продуцируемостью, так что считаются необходимыми дополнительные генно-инженерные модификации, такие как введение междоменных дисульфидных связей [R12] для стабилизации поверхности связывания.

Для создания полиспецифичных одноцепочечных тандемных Fv-антител Киприянов и др. [R30] предложили конструкцию, содержащую две белковые цепи, каждая из которых состоит из двух разделенных Fv-доменов, расположенных в следующем порядке VL-(линкер 1)-VH-(линкер 2)-VL-(линкер 3)-VH. Для создания гетеродимерных тетраспецифичных белков гетеродимер будет состоять из двух белковых цепей с приведенной ниже архитектурой. Цепь 1: VLA-(линкер 1)-VHA-(линкер 12)-VLB-(линкер 13)-VHC, и цепь B: VLD-(линкер 1)-VHD-(линкер 2)-VLC-(линкер 3)-VHB, где связывание FvB и FvC будет обуславливать гетеродимеризацию двух цепей (см. фиг. 10A). Для того чтобы предотвратить внутрицепочечное связывание, которое приводит к тандемному одноцепочечному Fv(scFv2)-подобному формату, а также чтобы усилить гетеродимеризацию двух мономерных белковых цепей, были предложены укороченные линкеры в положениях линкера 3 максимум из 10 аминокислот (EP1293514 A1). Предлагаемая организация двух разделенных вариабельных доменов с линкером 2 по меньшей мере из 15 аминокислот тем не менее дает возможность вторым вариабельным доменам связываться с N-концевыми доменами, что приводит к одноцепочечному диантителo(scDb)-подобному формату, состоящему из несовпадающих пар VH/VL, которые в свою очередь, скорее всего, не могут связываться со своей мишенью. Кроме того, существует также возможность образования гетеродимера, в котором бы все вариабельные домены тяжелых и легких цепей на белковой цепи 1 образовывали бы пары с вариабельными доменами тяжелых и легких цепей на белковой цепи 2 соответственно, тем самым предотвращая образование конечных scFv (scFvA и scFvD) и приводя к образованию пар между некогнатными вариабельными доменами. Тандемные побочные продукты scFv (scFv2) или scDb-типа могут являться причиной очень высокой доли белка, наблюдаемой при кажущейся молекулярной массе, из немультимеризованных белковых цепей [R30].

В теории, образование scDb-подобных структур в описанном выше подходе может быть дополнительно снижено за счет укорачивания также и второго линкера (линкера 2) между двумя разделенными вариабельными доменами. Однако это ограничивает гибкость конструкции, что во многих случаях может негативно повлиять на диапазон доступных эпитопов, которые позволяют одновременное связывание двух целей. Эти геометрические ограничения являются особенно проблемными, когда требуется одновременное связывание двух мембранных белков.

Однако наиболее важно, что оба мономера могут образовывать гомодимерные фрагменты (см. фиг. 10B), так что статистически до двух третей димерных продуктов может состоять из двух гомодимеров, тогда как только одна треть будет состоять из желаемого гетеродимера.

В общем, производство сильно нуждается в гетеродимерных полиспецифичных форматах, которые позволяют простую перестановку и последующую характеристику различных связывающих доменов в конечном формате. Основными проблемами таких форматов являлись: (a) относительно низкая эффективность специфичной гетеродимеризации, которая приводит к неоптимальному выходу продукта; и (b) необходимость использовать либо не связывающие мишень белки в качестве гетеродимеризующихся доменов, либо генно-инженерно модифицированные гетеродимеризующиеся Fc-эффекторные домены, что снижает возможность изменять время полужизни белка в сыворотке и ограничивает гибкость при добавлении новых функциональных возможностей без увеличения молекулярной массы.

Таким образом, желательно, чтобы оптимальный гетеродимерный полиспецифичный формат исключительно состоял бы из связывающих мишень доменов и позволял бы регулировать геометрию молекулы, например, путем свободного изменения длины линкеров между различными связывающими доменами для преодоления геометрических ограничений, определяемых взаимодействующими партнерами (мишенями). Решение этой проблемы, а именно модификация порядка расположения вариабельных доменов на мономерных цепях, до сих пор не было показано или не предлагалось в предшествующем уровне техники.

Сущность изобретения

Данное изобретение относится к новому гетеродимерному полиспецифичному формату множества вариабельных доменов антител, включающему основу из двух разделенных пар вариабельных доменов, где оба вариабельных домена легких цепей и оба когнатных вариабельных домена тяжелых цепей расположены в тандеме на двух отдельных белковых цепях соответственно, тем самым обуславливая гетеродимеризацию двух белковых цепей. До двух дополнительных связывающих доменов, в частности связывающих доменов на основе антител, таких как scFv-фрагменты, слиты с амино- или карбоксиконцом каждой белковой цепи, в результате позволяя получить гетеродимерный белок, способный специфично связывать до шести мишеней (гексаспецифичный).

Таким образом, в первом аспекте настоящее изобретение относится к гетеродимерному белку, содержащему первый и второй одноцепочечный белок, где указанный первый одноцепочечный белок содержит первую аминокислотную последовательность, состоящую из (от N- к С-концу):

(ia) первого VL-домена,

(iia) первого полипептидного линкера и

(iiia) второго VL-домена; и

где указанный второй одноцепочечный белок содержит вторую аминокислотную последовательность, состоящую из (от N- к С-концу):

(ib) первого VH-домена,

(iib) второго полипептидного линкера и

(iiib) второго VH-домена; и

где указанный первый VL-домен образует первую когнатную пару вариабельных доменов со специфичностью к первому антигену-мишени, с любым указанным первым или указанным вторым VH-доменом, и указанный второй VL-домен образует вторую когнатную пару вариабельных доменов со специфичностью ко второму антигену-мишени с другим из указанных VH-доменов, и где по меньшей мере один из указанных первого или второго одноцепочечного белка дополнительно содержит

(iv) по меньшей мере один дополнительный домен в качестве третьего функционального домена, который слит посредством третьего полипептидного линкера с указанной первой или указанной второй аминокислотной последовательностью, где, необязательно, указанный гетеродимерный белок не содержит когнатную пару первого и второго иммуноглобулинового константного домена, где указанный первый иммуноглобулиновый константный домен содержится в указанном первом одноцепочечном белке, и где указанный второй иммуноглобулиновый константный домен содержится в указанном втором одноцепочечном белке.

Во втором аспекте настоящее изобретение относится к одной или двум нуклеотидным последовательностям, кодирующим указанные первый и второй одноцепочечные белки.

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к одному или двум векторам, содержащим указанные одну или две нуклеотидные последовательности.

В четвертом аспекте настоящее изобретение относится к клетке-хозяину или клеткам-хозяевам, содержащим один или два вектора.

В четвертом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения первого и второго одноцепочечных белков или гетеродимерного белка согласно настоящему изобретению, включающему в себя: (i) получение нуклеиновой кислоты или нуклеиновых кислот по настоящему изобретению, либо вектора или векторов по настоящему изобретению, экспрессию указанных нуклеиновой кислоты или нуклеиновых кислот, либо указанных вектора или векторов, и сбор указанных первого и второго одноцепочечных белков или указанного гетеродимерного белка из системы экспрессии; или (ii) получение клетки-хозяина или клеток-хозяев по настоящему изобретению, культивирование указанных клетки-хозяина или клеток-хозяев, и сбор указанных первого и второго одноцепочечных белков или указанного гетеродимерного белка из клеточной культуры.

В пятом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей гетеродимерный белок по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

В шестом аспекте настоящее изобретение относится к гетеродимерному белку по настоящему изобретению для применения при лечении заболевания, в частности заболевания человека, более конкретно заболевания человека, выбранного из ракового, воспалительного и аутоиммунного заболевания, где по меньшей мере одна из указанных когнатных пар VL- и VH-доменов или указанных третьего, четвертого, пятого или шестого функционального домена способна специфично взаимодействовать с мишенью, имеющей терапевтическую значимость при соответствующем заболевании.

В седьмом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, страдающего от заболевания, в частности заболевания человека, более конкретно заболевания человека, выбранного из ракового, воспалительного и аутоиммунного заболевания, включающему в себя введение субъекту эффективного количества гетеродимерного белка по настоящему изобретению, где по меньшей мере одна из указанных когнатных пар VL- и VH-доменов или указанных третьего, четвертого, пятого или шестого функционального домена способна специфично взаимодействовать с мишенью, имеющей терапевтическую значимость при соответствующем заболевании.

Конкретные варианты осуществления настоящего изобретения изложены в прилагаемых зависимых пунктах формулы изобретения.

Чертежи

На фиг. 1 показано схематическое изображение сборки 1 (см. пример 1).

На фиг. 2 показано схематическое изображение сборки 3 (см. пример 1).

На фиг. 3 показано схематическое изображение сборки 5 (см. пример 1).

На фиг. 4 показано схематическое изображение сборки 7 (см. пример 1).

На фиг. 5 показаны эксклюзионные хроматограммы после 1-ступенчатой очистки. (A) Сборка 1; (B) сборка 3; (C) сборка 5; (D) сборка 7.

На фиг. 6 показан ДСН-ПААГЭ-анализ после 1-ступенчатой очистки: панель A: PRO356 (сборка 1): восстановительные условия: дорожка 4; невосстановительные условия: дорожка 10; PRO357 (сборка 3): восстановительные условия: дорожка 5; невосстановительные условия: дорожка 11; PRO358 (сборка 5) восстановительные условия: дорожка 6; невосстановительные условия: дорожка 12; PRO355 (сборка 7) восстановительные условия: дорожка 3; невосстановительные условия: дорожка 9. Панель B: повторение ДСН-ПААГЭ с более низкой температурой во время подготовки образцов, показывающей выраженную сшивку PRO357 (сборка 3) при невосстановительных условиях.

На фиг. 7 показано содержание белка после 28-дневного хранения при 37°C (1 г/л) (фиг. 7B) по сравнению с хранением при 4°C (фиг. 7A): PRO356 (сборка 1); PR0357 (сборка 3); PRO358 (сборка 5); PRO355 (сборка 7).

На фиг. 8 показано содержание мономера после 28-дневного хранения при 37°C (1 г/л) (фиг. 8B) по сравнению с хранением при 4°C (фиг. 8A): PRO356 (сборка 1); PR0357 (сборка 3); PRO358 (сборка 5); PRO355 (сборка 7).

На фиг. 9 показан ДСН-ПААГЭ-анализ стабильности образцов после инкубации в течение четырех недель при 37°C: PRO356 (сборка 1): восстановительные условия: дорожка 4; невосстановительные

средств на основе полиспецифичных антител, полученных когнатной гетеродимеризацией) были иммобилизованы на сенсорном чипе, и 4 антигена вводили в указанной последовательности. Полученные сенсограммы показывают RU-сдвиги, согласующиеся с одновременным взаимодействием со всеми четырьмя антигенами каждого формата MATCH.

На фиг. 12 показаны результаты анализа количества связывающих относительно неактивных MATCH-молекул. MATCH-молекулы предварительно инкубировали с избытком TNF (антигена для одного из образующих димер Fv-доменов), и комплекс разгоняли с условия: дорожка 10; PRO357 (сборка 3): восстановительные условия: дорожка 5; невосстановительные условия: дорожка 11; PRO358 (сборка 5) восстановительные условия: дорожка 6; невосстановительные условия: дорожка 12; PRO355 (сборка 7) восстановительные условия: дорожка 3; невосстановительные условия: дорожка 9.

На фиг. 10 показано схематическое изображение полиспецифичных одноцепочечных тандемных Fv-антител по Киприянову с соавт. [R30]: VL-домены: серый фон; VH-домены: белый фон; когнатные пары указаны с помощью такого же закрашивания. (A) Схематическое изображение отдельных цепей и гетеродимерного продукта. (B) Схематическое изображение потенциальных гомодимеров.

На фиг. 11 показаны результаты SPR-эксперимента, где MATCH-молекулы (молекулы терапевтических помощью эксклюзионной ВЭЖХ. Полученные хроматограммы анализировали, чтобы рассчитать долю "активных" (связывающих) относительно "неактивных" MATCH-молекул. Анализ выявил от 11,4 до 4,7% неактивного белка при наложении на стабильный пик.

Подробное описание изобретения

В данном изобретении авторы представляют новый формат, обеспечивающий количественную гетеродимерную сборку двух белковых цепей, содержащих несколько вариабельных доменов антител. Этот формат состоит из основы из двух разделенных пар вариабельных доменов (двух Fv-фрагментов), где оба вариабельных домена легкой цепи и оба вариабельных домена тяжелой цепи расположены на отдельной белковой цепи, таким образом способствуя гетеродимеризации двух белковых цепей. До двух дополнительных вариабельных доменов в scFv-формате с высокой внутри- и междоменной стабильностью слиты с амино- и/или карбоксильным концом каждой пептидной цепи, в результате позволяя получить гетеродимерный белок, способный специфично связывать до шести мишеней (гексаспецифичный).

Таким образом, в первом аспекте настоящее изобретение относится к гетеродимерному белку, содержащему первый и второй одноцепочечный белок, где указанный первый одноцепочечный белок содержит первую аминокислотную последовательность, состоящую из (от N- к C-концу):

(ia) первого VL-домена,

(iia) первого полипептидного линкера и

(iiia) второго VL-домена; и

где указанный второй одноцепочечный белок содержит вторую аминокислотную последовательность, состоящую из (от N- к C-концу):

(ib) первого VH-домена,

(iib) второго полипептидного линкера и

(iiib) второго VH-домена; и

где указанный первый VL-домен образует первую когнатную пару вариабельных доменов со специфичностью к первому антигену-мишени, с любым указанным первым или указанным вторым VH-доменом, и указанный второй VL-домен образует вторую когнатную пару вариабельных доменов со специфичностью ко второму антигену-мишени с другим из указанных VH-доменов, и где по меньшей мере один из указанных первого или второго одноцепочечного белка дополнительно содержит

(iv) по меньшей мере один дополнительный домен в качестве третьего функционального домена, который слит посредством третьего полипептидного линкера с указанной первой или указанной второй аминокислотной последовательностью.

В данном описании и формуле изобретения, которые следуют ниже, если контекст не требует иного, слово "содержать" и его вариации, такие как "содержит" и "содержащий", следует понимать как подразумевающие включение указанного целого числа, композиции или стадии, либо группы целых чисел или стадий, в то время как любые дополнительное целое число, композиция или стадия, либо группа целых чисел, композиций или стадий также могут, необязательно, присутствовать, включая варианты осуществления, в которых не присутствуют никаких дополнительных целого числа, композиции или стадии, либо групп целых чисел, композиций или стадий. В отношении таких последних вариантов осуществления настоящего изобретения термин "содержащий", поэтому включает в себя более узкий термин "состоящий из".

В тексте данной спецификации цитируются несколько документов. Каждый из документов, цитируемых в данном описании (включая все патенты, патентные заявки, научные публикации, спецификации производителя, инструкции, номера последовательностей в базе данных GenBank и т.д.), независимо от расположения в тексте, тем самым включен путем ссылки в полном объеме, насколько это возможно по соответствующему патентному законодательству. Ничто в данном документе не должно быть истолковано как допущение того, что изобретение не имеет права на противопоставление такого раскрытия на основании предшествующего изобретения.

В контексте настоящего изобретения термины "VL-домен" и "VH-домен" относятся к вариабельному домену легкой цепи и вариабельному домену тяжелой цепи соответственно антител. В контексте настоящего изобретения термин "антитело" относится к молекулам иммуноглобулинов и иммунологически активным участкам молекул иммуноглобулинов, т.е. к молекулам, которые содержат антигенсвязывающий сайт, который специфично связывается с антигеном, т.е. включающим участки антител, содержащие по меньшей мере один антигенсвязывающий фрагмент антитела.

В контексте настоящего изобретения, антитело или любая связывающая молекула в общем считаются "специфично связывающимися" с антигеном (в случае антитела) или с когнатным связывающим партнером (в случае связывающей молекулы в общем), если они имеют константу диссоциации K_D с указанным антигеном/когнатным связывающим партнером в качестве мишени, составляющую 100 мкМ или менее, предпочтительно 50 мкМ или менее, предпочтительно 30 мкМ или менее, предпочтительно 20 мкМ или менее, предпочтительно 10 мкМ или менее, предпочтительно 5 мкМ или менее, более предпочтительно 1 мкМ или менее, более предпочтительно 900 нМ или менее, более предпочтительно 800 нМ или менее, более предпочтительно 700 нМ или менее, более предпочтительно 600 нМ или менее, более предпочтительно 500 нМ или менее, более предпочтительно 400 нМ или менее, более предпочтительно 300 нМ или менее, более предпочтительно 200 нм или менее, еще более предпочтительно 100 нм или менее, еще более предпочтительно 90 нМ или менее, еще более предпочтительно 80 нМ или менее, еще более предпочтительно 70 нМ или менее, еще более предпочтительно 60 нМ или менее, еще более предпочтительно 50 нМ или менее, еще более предпочтительно 40 нМ или менее, еще более предпочтительно 30 нМ или менее, еще более предпочтительно 20 нМ или менее и еще более предпочтительно 10 нМ или менее.

В контексте настоящего изобретения термин "функциональные домены" относится к белковому домену, имеющему определенную функцию, например ферментативную активность или специфичное связывание с когнатным лигандом, где указанный белковый домен представляет собой структурированный домен, имеющий, по меньшей мере, вторичный структурный элемент. Способы для определения наличия вторичной структуры в полипептидах или белках, такие как рентгеновская кристаллография, круговой дихроизм (CD), колебательный круговой дихроизм (VCD), ЯМР или ИК-Фурье, или для прогнозирования наличия вторичной структуры в полипептидах, такие как PEP-FOLD (Shen et al., J. Chem. Theor. Comput. 10 (2014) 4745-4758), хорошо известны специалисту в данной области техники. В конкретных вариантах осуществления указанный белковый домен представляет собой структурированный домен, имеющий третичную структуру. В конкретных вариантах осуществления указанный белковый домен содержит по меньшей мере примерно 20 аминокислотных остатков (см. Heitz et al., Biochemistry 38 (1999) 10615-25), в частности по меньшей мере примерно 50 аминокислотных остатков, более конкретно по меньшей мере примерно 100 аминокислотных остатков.

В контексте настоящего изобретения термин "полипептидный линкер" относится к линкеру, состоящему из цепи аминокислотных остатков, соединенных пептидными связями, который соединяет два домена, каждый из которых прикреплен к одному концу линкера. В конкретных вариантах осуществле-

ния этот полипептидный линкер имеет непрерывную цепь из 2-30 аминокислотных остатков (например, из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 аминокислотных остатков). В конкретных вариантах осуществления данный полипептидный линкер не является структурированным полипептидом. Как уже упоминалось выше, способы для определения наличия вторичной структуры в полипептидах, такие как рентгеновская кристаллография, круговой дихроизм (CD), колебательный круговой дихроизм (VCD), ЯМР или ИК-Фурье, или для прогнозирования наличия вторичной структуры в полипептидах, такие как PEP-FOLD (Shen et al., J. Chem. Theor. Comput. 10 (2014) 4745-4758), хорошо известны специалисту в данной области техники.

Настоящее изобретение характеризуется следующим.

Использованием вариабельных доменов антител для создания гетеродимерного формата, где оба VL расположены на одной белковой цепи, тогда как соответствующие VH расположены на второй белковой цепи.

Домен для создания гетеродимера позволяет добавление дополнительных функциональных доменов, таких как связывающие домены, для создания три-, тетра-, пента- или гексаспецифичных молекул.

Многочисленными примерами высокоэффективного образования пар у сборок гетеродимеризующихся основ.

Простым решением для комбинаторного скрининга множества пулов связывающих доменов, которые имеют общий домен для создания гетеродимера.

В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к гетеродимерному белку, в котором указанный первый или второй одноцепочечный белок дополнительно содержат (v) четвертый функциональный домен, который слит посредством четвертого полипептидного мостика с указанной первой или указанной второй аминокислотной последовательностью.

В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к гетеродимерному белку, в котором указанныk первый или второй одноцепочечный белок дополнительно содержат

(vi) пятый функциональный домен, который слит посредством пятого полипептидного мостика с указанной первой или указанной второй аминокислотной последовательностью.

В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к гетеродимерному белку, в котором указанный первый или второй одноцепочечный белок дополнительно содержат

(vii) шестой функциональный домен, который слит посредством шестого полипептидного мостика с указанной первой или указанной второй аминокислотной последовательностью.

В конкретных вариантах осуществления указанный гетеродимерный белок содержит указанный третий и указанный четвертый функциональные домены. В таких вариантах осуществления указанный гетеродимерный белок является четырехвалентным, в конкретных вариантах осуществления, указанный гетеродимерный белок является тетраспецифичным.

В конкретных вариантах осуществления указанный гетеродимерный белок содержит указанный третий, указанный четвертый, указанный пятый и указанный шестой функциональные домены. В таких вариантах осуществления указанный гетеродимерный белок является шестивалентным, в конкретных вариантах осуществления, указанный гетеродимерный белок является гексаспецифичным.

В конкретных вариантах осуществления указанный гетеродимерный белок не содержит когнатную пару первого и второго иммуноглобулинового константного домена, где указанный первый константный иммуноглобулиновый домен содержится в указанном первом одноцепочечном белке, и где указанный второй константный иммуноглобулиновый домен содержится в указанном втором одноцепочечном белке. В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере один из указанного первого и указанного второго одноцепочечных белков не содержит константный иммуноглобулиновый домен. В конкретном варианте осуществления оба указанный первый и указанный второй одноцепочечные белки не содержат константный иммуноглобулиновый домен.

В конкретных вариантах осуществления указанный гетеродимерный белок не содержит когнатную пару первого белкового взаимодействующего домена, содержащегося в указанном первом одноцепочечном белке, и второго белкового взаимодействующего домена, содержащегося в указанном втором одноцепочечном белке, помимо когнатных пар (i) указанного первого VL-домена и указанного первого VH-домена, и (ii) указанного второго VL-домена и указанного второго VH-домена.

В конкретных вариантах осуществления указанный первый полипептидный линкер состоит из 5-20 аминокислотных остатков, в частности 6-15 аминокислотных остатков. В конкретных вариантах осуществления указанный полипептидный линкер имеет последовательность $(G_mS)_n$; причем m независимо выбирают из 2, 3 и 4; и выбирают из 1, 2, 3, 4 и 5.

В частных других вариантах осуществления изобретения указанный первый полипептидный линкер состоит из 11-20 аминокислотных остатков, в частности из 11-15 аминокислотных остатков. В конкретных вариантах осуществления указанный полипептидный линкер имеет последовательность $(G_mS)_n$; причем m независимо выбирают из 2, 3 и 4 и n выбирают из 3, 4 и 5.

В конкретных вариантах осуществления изобретения указанный второй полипептидный линкер состоит из 5-20 аминокислотных остатков, в частности из 6-15 аминокислотных остатков. В конкретных вариантах осуществления указанный полипептидный линкер имеет последовательность $(G_mS)_n$; причем

m независимо выбирают из 2, 3 и 4; и n выбирают из 1, 2, 3, 4 и 5.

В частных других вариантах осуществления изобретения указанный второй полипептидный линкер состоит из 11-20 аминокислотных остатков, в частности из 11-15 аминокислотных остатков. В конкретных вариантах осуществления указанный полипептидный линкер имеет последовательность $(G_mS)_n$; причем m независимо выбирают из 2, 3 и 4 и n выбирают из 3, 4 и 5.

В конкретных вариантах осуществления изобретения указанный третий, четвертый, пятый и/или шестой полипептидные линкеры независимо состоят из 8-20 аминокислотных остатков, в частности из 10-15 аминокислотных остатков. В конкретных вариантах осуществления указанные полипептидные линкеры независимо друг от друга имеют последовательность $(G_mS)_n$; причем m независимо выбирают из 2, 3 и 4, в частности из 4; и n выбирают из 1, 2, 3, 4 и 5, в частности из 2 и 3.

В конкретных вариантах осуществления указанный первый VL-домен (ia) и указанный первый VH-домен (ib) образуют первую когнатную пару вариабельных доменов со специфичностью к первому антигену-мишени, а указанной второй VL-домен (iia) и указанный второй VH-домен (iib) образуют вторую когнатную пару вариабельных доменов со специфичностью ко второму антигену-мишени. В таком варианте осуществления изобретения указанный первый и указанный второй одноцепочечный белок образуют указанный гетеродимерный белок в параллельном расположении указанных одноцепочечных белков.

В частных таких вариантах осуществления изобретения указанный первый полипептидный линкер состоит из 10-20 аминокислотных остатков, в частности из 12-17 аминокислотных остатков, в частности из 15 аминокислотных остатков. В конкретных вариантах осуществления изобретения указанный полипептидный линкер имеет последовательность $(G_mS)_n$; причем m независимо выбирают из 2, 3 и 4, в частности из 4; и n выбирают из 1, 2, 3, 4 и 5, в частности из 3.

В частных таких вариантах осуществления изобретения указанный второй полипептидный линкер состоит из 10-20 аминокислотных остатков, в частности из 12-17 аминокислотных остатков, в частности из 15 аминокислотных остатков. В конкретных вариантах осуществления изобретения указанный полипептидный линкер имеет последовательность $(G_mS)_n$; причем m независимо выбирают из 2, 3 и 4, в частности из 4; и n выбирают из 1, 2, 3, 4 и 5, в частности из 3.

В частных таких вариантах осуществления изобретения указанные третий, четвертый, пятый и/или шестой полипептидные линкеры независимо состоят из 10-20 аминокислотных остатков, в частности из 12-17 аминокислотных остатков, в частности из 15 аминокислотных остатков. В конкретных вариантах осуществления изобретения указанный полипептидный линкер имеет последовательность $(G_mS)_n$; причем m независимо выбирают из 2, 3 и 4, в частности из 4; и n выбирают из 1, 2, 3, 4 и 5, в частности из 3.

В частных других вариантах осуществления указанный первый VL-домен (ia) и указанный второй VH-домен (iib) образуют первую когнатную пару вариабельных доменов со специфичностью к первому антигену-мишени, а указанной второй VL-домен (iia) и указанный первый VH-домен (ib) образуют вторую когнатную пару вариабельных доменов со специфичностью ко второму антигену-мишени. В таком варианте осуществления изобретения указанный первый и указанный второй одноцепочечный белок образуют указанный гетеродимерный белок в антипараллельном расположении указанных одноцепочечных белков.

В частных таких вариантах осуществления изобретения указанный первый полипептидный линкер состоит из 5-12 аминокислотных остатков, в частности из 5-10 аминокислотных остатков, в частности из 6 аминокислотных остатков. В конкретных вариантах осуществления изобретения указанный полипептидный линкер имеет последовательность $(G_mS)_n$; причем m независимо выбирают из 2, 3 и 4, в частности из 2; и n выбирают из 1, 2, 3, 4 и 5, в частности из 2.

В частных таких вариантах осуществления изобретения указанный второй полипептидный линкер состоит из 5-12 аминокислотных остатков, в частности, из 6-10 аминокислотных остатков, в частности из 8 аминокислотных остатков. В конкретных вариантах осуществления изобретения указанный полипептидный линкер имеет последовательность $(G_mS)_n$; причем m независимо выбирают из 2, 3 и 4, в частности из 3; и n выбирают из 1, 2, 3, 4 и 5, в частности из 2.

В частных таких вариантах осуществления изобретения указанные третий, четвертый, пятый и/или шестой полипептидные линкеры независимо состоят из 10-20 аминокислотных остатков, в частности из 8-12 аминокислотных остатков, в частности из 10 аминокислотных остатков. В конкретных вариантах осуществления изобретения указанный полипептидный линкер имеет последовательность $(G_mS)_n$; причем m независимо выбирают из 2, 3 и 4, в частности из 4; и n выбирают из 1, 2, 3, 4 и 5, в частности из 2.

В конкретных вариантах осуществления изобретения указанные третий, четвертый, пятый и или шестой функциональные домены независимо выбирают из списка связывающих доменов, токсинов, ферментов, гормонов, сигнальных белков и альбуминов.

В конкретных вариантах осуществления изобретения указанные третий, четвертый, пятый и/или шестой функциональные домены независимо выбирают из связывающих доменов.

В частных таких вариантах осуществления связывающие домены независимо выбирают из списка связывающих доменов на основе антител, включая, но не ограничиваясь этим, scFv, Fab и одиночные вариабельные домены антител, однодоменные антитела на основе VNAR-структуры из акулы, и связывающих доменов на основе альтернативных каркасов, включающих, но ограниченных доменами на ос-

нове анкиринов, финомерами, авимерами, антикалинами, фибронектинами и связывающими сайтами, встроенными в константные области антител (например, по технологии F-star).

В частных такие вариантах осуществления изобретения указанными связывающими доменами являются связывающие домены на основе антител, выбранные из одноцепочечных Fv-фрагментов и одиночных вариабельных доменов антител.

В некоторых таких вариантах осуществления изобретения порядок расположения вариабельных доменов в таком одноцепочечном Fv-фрагменте выбирают из (от N-конца к C-концу) VL-(линкер)-VH и VH-(линкер)-VL. В некоторых вариантах осуществления изобретения порядок расположения вариабельных доменов является одинаковым для всех одноцепочечных Fv-фрагментов, содержащихся в гетеродимерном белке. В некоторых вариантах осуществления три VL-домена соединены друг с другом с помощью указанного первого полипептидного линкера и одного из указанных третьего, четвертого и пятого полипептидных линкеров соответственно, например, где одноцепочечный Fv-фрагмент в порядке VL-(линкер)-VH является C-концевым от указанной первой аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления три VH-домена соединены друг с другом с помощью указанного второго полипептидного линкера и одного из указанных третьего, четвертого и пятого полипептидных линкеров соответственно, например, где одноцепочечный Fv-фрагмент в порядке VL-(линкер)-VH является N-концевым от указанной второй аминокислотной последовательности (см. фиг. 1 и 4). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере один из указанного первого и указанного второго одноцепочечных белков содержит аминокислотную последовательность, состоящую из трех VL-доменов или трех VH-доменов соответственно, соединенных двумя полипептидными линкерами.

В некоторых других вариантах осуществления вариабельный домен любого такого связывающего домена на основе антитела, который напрямую связан через соответствующий линкер с N- и/или C-концом указанной первой или второй аминокислотной последовательности, представляет собой: (a) VH-домен в случае, когда он слит с указанной первой аминокислотной последовательностью, и (b) VL-домен в случае, когда он слит с указанной второй аминокислотной последовательностью. Таким образом, VH-домен слит с N- и/или C-концом основной области VL-линкер-VL, а VL-домен слит с N- и/или C-концом основной области VH-линкер-VH (см., например, фиг. 3).

В конкретных вариантах осуществления изобретения указанные третий, четвертый, пятый и/или шестой связывающие домены являются одноцепочечными Fv-фрагментами.

В частных таких вариантах осуществления изобретения полипептидный линкер, соединяющий вариабельные домены указанных одноцепочечных Fv-фрагментов, состоит из 15-25 аминокислотных остатков, в частности из 20 аминокислотных остатков. В конкретных вариантах осуществления изобретения указанный полипептидный линкер имеет последовательность $(GGGGS)_n$, причем n выбирают из 3, 4 и 5, в частности из 4.

В конкретных вариантах осуществления изобретения по меньшей мере один из указанных вариабельных доменов антитела содержит CDR-области, полученные из родительского кроличьего антитела.

В конкретных вариантах осуществления изобретения по меньшей мере один из указанных вариабельных доменов антител содержит каркасные области антител человека.

В частных таких вариантах осуществления изобретения по меньшей мере один из указанных VL-доменов содержит: (i) каркасные области I-III из Vκ человека; (ii) CDR-домены CDR1, CDR2 и CDR3 и (iii) каркасную область IV, которую выбирают из:

a) последовательности зародышевой линии Vλ человека для IV каркасной области, в частности последовательности зародышевой линии Vλ, выбранной из списка SEQ ID NO 16-22 согласно WO 2014/206561;

b) последовательности на основе Vλ, которая представляет собой (bi) консенсусную последовательность Vλ из последовательностей зародышевой линии Vλ человека для IV каркасной области, в частности, SEQ ID NO 17 согласно WO 2014/206561; или (bii) консенсусную последовательность Vλ из перестроенных последовательностей Vλ человека для IV каркасной области, в частности, консенсусную последовательность Vλ, выбранную из списка SEQ ID NO 16 и 17 согласно WO 2014/206561; и

c) последовательности на основе Vλ, которая имеет одну или две мутации, в частности одну мутацию, по сравнению с ближайшей последовательностью зародышевой линии Vλ человека для IV каркасной области.

В некоторых вариантах осуществления когнатная пара одного из указанного первого и указанного второго VL- и VH-доменов является специфичной к антигену, выбранному из списка раковая мишень; и мишень, присутствующая на иммунных эффекторных клетках, такая как CD3.

В частных таких вариантах осуществления указанные третий, четвертый, пятый и/или шестой связывающие домены представляют собой одноцепочечные Fv-фрагменты со специфичностью к мишени, выбранной из списка раковая мишень; и мишень, присутствующая на иммунных эффекторных клетках, такая как CD3.

В контексте настоящей заявки термин "мишень" относится к когнатному связывающему партнеру

связывающего домена, такому как антиген антитела, который специфично связывается с таким связывающим доменом.

В конкретных вариантах осуществления указанной мишенью является раковая мишень, в частности антиген или эпитоп, который присутствует на поверхности одного или более типов опухолевых клеток или ассоциированных с опухолью клеток в повышенной концентрации и/или в другой стерической конфигурации по сравнению с поверхностью неопухолевых клеток. В частности, указанная раковая мишень присутствует на поверхности одного или более типов опухолевых клеток или опухолевых стромальных клеток, но не на поверхности неопухолевых клеток.

В других конкретных вариантах осуществления указанная мишень представляет собой антиген или эпитоп, которые преимущественно экспрессируются на клетках, участвующих в аутоиммунных заболеваниях. В других вариантах осуществления изобретения указанный антиген или эпитоп преимущественно экспрессируются в клетках, участвующих в воспалительном заболевании.

В конкретных вариантах осуществления указанная мишень представляет собой мишень, присутствующую на иммунных эффекторных клетках. В конкретных вариантах осуществления указанной мишенью является CD3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения указанный первый и указанный второй одноцепочечный белок выбирают из следующего списка, где VLA, VLB, VHA и VHB соответствуют указанным первому и второму VL- и VH-доменам, а VLC, VLD, VLE, VLF, VHC, VHD, VHE и VHF являются частью одноцепочечных фрагментов с линкером, соответствующим указанным третьему, четвертому, пятому и/или шестому функциональным доменам соответственно, связанному с помощью третьего, четвертого, пятого и/или шестого линкеров (LINKER3, LINKER4, LINKER5 и LINKER6) с основным доменом (выделенным полужирным шрифтом); все конструкции записаны в направлении от N-конца к С-концу.

A (параллельное расположение 6Fv):

Цепь 1: VLC-(линкер)-VHC-(LINKER3)-**VLA-(LINKER1)-VLB-**(LINKER4)-VLD-(linker)-VHD

Цепь 2: VLE-(линкер)-VHE-(LINKER5)-**VHA-(LINKER2)-VHB-**(LINKER6)-VLF-(линкер)-VHF

B (антипараллельное расположение 6Fv):

Цепь 1: VLC-(линкер)-VHC-(LINKER3)-**VLA-(LINKER1)-VLB-**(LINKER4)-VLD-(linker)-VHD

Цепь 2: VLE-(линкер)-VHE-(LINKER52)-**VHB-(LINKER2)-VHA-**(LINKER6)-VLF-(линкер)-VHF

C1 (антипараллельное расположение 4 Fv) (см. фиг.1):

Цепь 1: VLC-(линкер)-VHC-(LINKER3)-**VLA-(LINKER1)-VLB**

Цепь 2: VLD-(линкер)-VHD-(LINKER4)-**VHB-(LINKER2)-VHA**

C2 (антипараллельное расположение 4 Fv) (см. фиг.3):

Цепь 1: VLC-(линкер)-VHC-(LINKER3)-**VLA-(LINKER1)-VLB**

Цепь 2: **VHB-(LINKER2)-VHA-**(LINKER4)-VLD-(линкер)-VHD

C3 (антипараллельное расположение 4 Fv):

Цепь 1: **VLA-(LINKER1)-VLB-**(LINKER3)-VLC-(линкер)-VHC

Цепь 2: VLD-(линкер)-VHD-(LINKER4)-**VHB-(LINKER2)-VHA**

C4 (антипараллельное расположение 4 Fv):

Цепь 1: **VLA-(LINKER1)-VLB-**(LINKER3)-VLC-(линкер)-VHC

Цепь 2: **VHB-(LINKER2)-VHA-**(LINKER4)-VLD-(линкер)-VHD

D1 (параллельное расположение 4 Fv) (см. фиг.4):

Цепь 1: VLC-(линкер)-VHC-(LINKER3)-**VLA-(LINKER1)-VLB**

Цепь 2: VLD-(линкер)-VHD-(LINKER4)-**VHA-(LINKER2)-VHB**

D2 (параллельное расположение 4 Fv):

Цепь 1: VLC-(линкер)-VHC-(LINKER3)-**VLA-(LINKER1)-VLB**

Цепь 2: **VHA-(LINKER2)-VHB-**(LINKER4)-VLD-(линкер)-VHD

D3 (параллельное расположение 4 Fv):

Цепь 1: **VLA-(LINKER1)-VLB-**(LINKER3)-VLC-(линкер)-VHC

Цепь 2: VLD-(линкер)-VHD-(LINKER4)-**VHA-(LINKER2)-VHB**

D4 (параллельное расположение 4 Fv):

Цепь 1: **VLA-(LINKER1)-VLB-**(LINKER3)-VLC-(линкер)-VHC

Цепь 2: **VHA-(LINKER2)-VHB-**(LINKER4)-VLD-(линкер)-VHD

В этом формате локализация двух разделенных вариабельных доменов тяжелых цепей VHB и VHC на одной белковой цепи и двух соответствующих вариабельных доменов легких цепей VLB и VLC на другой белковой цепи (VH-VH/VL-VL) предотвращает образование пар между доменами одной цепи,

приводящее к неактивным подобным одноцепочечным диантителам (scDb) структурам, как это было бы в случае, если бы для обеспечения гетеродимеризации была использована ориентация VH-VL/VH-VL обычного диантитела аналогично конструкции, предложенной Куприяновым и др. В противоположность этому, ориентация VH-VH/VL-VL позволяет образование исключительно гетеродимерных белков, способных специфично связывать от 2 до 6 мишеней.

Существует теоретическая возможность, что образование пар между VH/VL доменами связывающего мишени A и B основного домена VHA-VHB/VLA-VLB приведет к неактивному основному домену из-за неправильного спаривания VHA с VLB и VHB с VLA, приводящего в результате к образованию пар VHA-VLB и VHB-VLA. Неожиданно и удивительно, но такие неактивные варианты не были до сих пор обнаружены. Без привязки к какой-либо конкретной гипотезе димеризация может быть сдвинута в сторону когнатного спаривания за счет более эффективной упаковки CDR когнатных пар, в отличие от потенциальных помех для упаковки, возникающих в несовпадающих парах.

В целях дальнейшего усиления гетеродимеризации в направлении образования активных пар в основном домене VH-VH/VL-VL, технологии "выпуклость-впадина" или аналогичные технологии могут быть применены в одной паре VL/VH (или при реципрокном применении - в обоих парах VL/VH) основного домена VH-VH/VL-VL. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения образование активных пар в основном домене VH-VH/VL-VL указанного гетеродимерного белка дополнительно усиливается технологией, выбранной из: технологии "выпуклость-впадина" и межцепочечные цистеиновые мостики.

Во втором аспекте настоящее изобретение относится к одной или двум нуклеотидным последовательностям, кодирующим указанные первый и второй одноцепочечные белки.

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к одному или двум векторам, содержащим указанные одну или две нуклеотидные последовательности.

В четвертом аспекте настоящее изобретение относится к клетке-хозяину или клеткам-хозяевами, содержащим один или два вектора.

В четвертом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения первого и второго одноцепочечных белков или гетеродимерного белка согласно настоящему изобретению, включающему в себя: (i) получение нуклеиновой кислоты или нуклеиновых кислот по настоящему изобретению, либо вектора или векторов по настоящему изобретению, экспрессию указанных нуклеиновой кислоты или нуклеиновых кислот, либо указанных вектора или векторов, и сбор указанных первого и второго одноцепочечных белков или указанного гетеродимерного белка из системы экспрессии; или (ii) получение клетки-хозяина или клеток-хозяев по настоящему изобретению, культивирование указанных клетки-хозяина или клеток-хозяев, и сбор указанных первого и второго одноцепочечных белков или указанного гетеродимерного белка из клеточной культуры.

В пятом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей гетеродимерный белок по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

В шестом аспекте настоящее изобретение относится к гетеродимерному белку по настоящему изобретению для применения при лечении заболевания, выбранного из ракового, воспалительного и аутоиммунного заболевания, где по меньшей мере одна из указанных когнатных пар VL- и VH-доменов или указанных третьего, четвертого, пятого или шестого функционального домена способна специфично взаимодействовать с мишенью, имеющей терапевтическую значимость при соответствующем заболевании.

В седьмом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, страдающего от заболевания, выбранного из ракового, воспалительного и аутоиммунного заболевания, включающему в себя введение субъекту эффективного количества гетеродимерного белка по настоящему изобретению, где по меньшей мере одна из указанных когнатных пар VL- и VH-доменов или указанных третьего, четвертого, пятого или шестого функционального домена способна специфично взаимодействовать с мишенью, имеющей терапевтическую значимость при соответствующем заболевании.

Литература.

R1. Skerra, A., and Plückthun, A. (1988). Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli. Science 240, 1038-1041.

R2. Röthlisberger et al., (2005). Domain interactions in the Fab fragment: A comparative evaluation of the single-chain Fv and Fab format engineered with variable domains of different stability. J Mol Biol 347, 773-789.

R3. Ridgway et al., 1996. 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. Protein Eng. 9, 617-621.

R4. Zhu (1997) Remodeling domain interfaces to enhance heterodimer formation. Protein Sci. 6, 781-788

R5. Schaefer, W., et al., 2011b. Immunoglobulin domain crossover as a generic approach for the production of bispecific IgG antibodies. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108, 11187-11192.

R6. Holliger et al.,. "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 6444-6448.

R7. Arndt et al., 1999. Abispecific diabody that mediates natural killer cell cytotoxicity against xeno-transplantated human Hodgkin's tumors. Blood 94, 2562-2568.

R8. Kipriyanov et al., 1999. Bispecific tandem diabody for tumor therapy with improved antigen binding and pharmacokinetics. J. Mol. Biol. 293, 41-56.

R9. Alt et al., 1999. Novel tetravalent and bispecific IgG-like antibody molecules combining single-chain diabodies with the immunoglobulin gamma1 Fc or CH3 region. FEBS Lett. 454, 90-94.

R10. Johnson et al., 2010. Effector cell recruitment with novel Fv-based dual-affinity re-targeting protein leads to potent tumor cytolysis and in vivo B-cell depletion. J. Mol. Biol.399, 436-449.

R11. De Jonge et al., (1995) Production and characterization of bispecific single-chain antibody fragments. Mol. Immunol. 32, 1405-1412.

R12. Reiter et al., (1994) Engineering interchain disulfide bonds into conserved framework regions of Fv fragments: improved biochemical characteristics of recombinant immunotoxins containing disulfide-stabilized Fv. Protein Eng. 7, 697-704.

R13. Pack, P., and Plückthun, A. (1992). Miniantibodies: Use of amphipathic helices to produce functional, flexibly linked dimeric Fv fragments with high avidity in Escherichia coli. Biochemistry 31, 1579-1584.

R14. Schoonjans et al., Fab chains as an efficient heterodimerization scaffold for the production of recombinant bispecific and trispecific antibody derivatives. J Immunol. 2000 Dec 15;165(12):7050-7.

R15. Orcutt et al., 2009. A modular IgG-scFv bispecific antibody topology. Pro-tein Eng. Des. Sel. 23, 221-228.

R16. Wu, C. et al., 2007. Simultaneous targeting of multiple disease mediators by a dual-variable-domain immunoglobulin. Nat.Biotechnol. 25, 1290-1297.

R17. "mAbs"; Köhler & Milstein, Nature. 256 (1975) 495-7

R18. Umaña et al., 1999. Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibody-dependent

cellular cytotoxic activity. Nat. Biotechnol. 17, 176-180

R19. Yu, Y. J. et al. Sci. Trans. Med. 3, 84ra44 (2011).

R20. Hinton PR. et al., 2004. Engineered human IgG antibodies with longer serum half-lives in primates. J Biol Chem. 279(8):6213-6.

R21. Spiess et al., 2015. Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies. Mol Immunol. 2015 Jan 27.

R22. Davis et al., 2013. Readily isolated bispecific antibodies with native immunoglobulin format. US Patent 8,586,713. Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

R23. Shahied LS, et al., Bispecific minibodies targeting HER2/neu and CD16 exhibit improved tumor lysis when placed in a divalent tumor antigen binding format. J Biol Chem. 2004 Dec 24;279(52):53907-14. Epub 2004 Oct 7.

R24. Milstein.C and Cuello.A.C. (1983) Nature, 305, 537-54

R25. Chang et al., The dock and lock method: a novel platform technology for building multivalent, multifunctional structures of defined composition with retained bioactivity. Clin Cancer Res. 2007 Sep 15;13(18 Pt 2):5586s-5591s.

R26. Deyev et al., (2003). Design of multivalent complexes using the barnase· barstar module. Nature biotechnology, 21(12), 1486-1492.

R27. Pack, P., and Plückthun, A. (1992). Miniantibodies: Use of amphipathic helices to produce functional, flexibly linked dimeric Fv fragments with high avidity in Escherichia coli. Biochemistry 31, 1579-1584.

R28. Halin et al. (2003). Synergistic therapeutic effects of a tumor targeting antibody fragment, fused to interleukin 12 and to tumor necrosis factor α. Cancer research, 63(12), 3202-3210.

R29. D. Müller et al., Improved pharmacokinetics of recombinant bispecific antibody molecules by fusion to human serum albumin J. Biol. Chem., 282 (2007), pp. 12650-12660

R30. EP1293514

R31. Milstein C, and Cuello AC (1983) Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry. Nature 305:537-540

Примеры

Пример 1. Конструирование полиспецифичных форматов.

Для создания гетеродимерных полиспецифичных форматов, названных "получаемыми с помощью когнатной гетеродимеризации терапевтическими средствами на основе полиспецифичных антител (MATCH)", были выбраны четыре хорошо охарактеризованных вариабельных домена, мишенями которых являются альфа-фактор некроза опухолей человека (TNF), рецептор интерлейкина-5 человека (IL5R), эпсилон-цепь CD3 человека (CD3) и рецептор интерлейкина-23 (IL23R) соответственно. Исходя из известных характеристик связывания соответствующих вариабельных доменов в формате scFv, активность и, таким образом, правильное объединение когнатных пар VL/VH оценивали в контексте полиспецифичных молекул. Соответствующие вариабельные домены на периферии молекулы были расположены либо на аминоконце, либо на карбоксиконце каждой белковой цепи в качестве одноцепочечных Fv-фрагментов (scFv), или были расположены в основном гетеродимеризующемся домене. В отличии от периферийных scFv-фрагментов, для которых VL и VH расположены на одной белковой цепи, когнатные вариабельные домены VL и VH основного домена расположены на двух различных белковых цепях. В представленных ниже примерах связывающие мишени домены, расположенные в двух основных доменах, связываются с CD3 или TNF соответственно. Вариабельные домены, связывающиеся с IL23R или IL5R, были использованы для периферийных scFv-модулей, которые были слиты с N- или C-концом основного домена с использованием гибкого аминокислотного линкера из 10 или 15 аминокислот.

Для того чтобы исследовать различные варианты сборки основного гетеродимера, представленного в данном изобретении, одновременно были сконструированы параллельная, а также антипараллельная ориентации когнатных пар вариабельных доменов, причем каждый из которых имел один или два дополнительных scFv-модуля, соединенных с N или C-концом основного домена.

В антипараллельной компоновке основной домен был сконструирован в ориентации VHA-

VHB/VLB-VLA от N-конца к С-концу каждой белковой цепи (белковые цепи с 1 по 9). В одном варианте осуществления изобретения тетраспецифичный формат образован N-концевым слиянием одного scFv-модуля с каждой из двух белковых цепей (конструкции, состоящие из белковых цепей 1+2). Соответствующий триспецифичный формат содержит scFv-модуль, слитый только с одной из двух белковых цепей (конструкции 1+5). Для того чтобы исследовать возможные эффекты стабилизации сборки основного домена путем генно-инженерного введения дисульфидных мостиков, описанные выше два формата были получены также с С-концевым цистеином, что приводит к перекрестной сшивке когнатных Fv в основном домене каждой белковой цепи. Соответствующие гетеродимерные форматы состоят из белковых цепей 3+4 для тетраспецифичного формата и белковых цепей 4+6 для триспецифичного формата. В варианте антипараллельного расположения scFv-модуль, расположенный на цепи, содержащей тандем VH в основном домене, был слит с С-концом вместо N-конца и был объединен с белковой цепью, содержащей собранный scFv модуль на N-конце, давая в результате тетраспецифичный формат (белковые цепи 1+7), или с белковой цепью, содержащей только основной домен, давая в результате триспецифичный формат (белковые цепи 5+7).

В параллельной компоновке основной домен был сконструирован в ориентации VHA-VHB/VLA-VLB от N-конца к С-концу каждой белковой цепи. Тетраспецифичный формат с обоими scFv-модулями, слитыми с N-концевой стороной основных доменов, получали путем совместной экспрессии белковых цепей 9+10. Соответствующую триспецифичную сборку с scFv-модулем исключительно на цепи, содержащей тандемный VH, получали путем совместной экспрессии белковых цепей 10+11.

Для создания конструкций, описанных в табл. 1, аминокислотные последовательности для Fv-доменов и линкеров были обратно транслированы в соответствующие нуклеотидные последовательности, которые были синтезированы de novo.

Кодирующие последовательности были собраны и клонированы с помощью стандартных методов молекулярной биологии (см., например, Sambrook, J., et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual) в подходящий экспрессионный вектор (например, pcDNA3.1, Invitrogen) для секреции рекомбинантного белка.

Пример 2. Экспрессия и очистка.

Экспрессию сборок полиспецифичных форматов проводили путем котрансфекции конструкций в суспензионную клеточную линию (например, CHO-S Freestyle™, Invitrogen) с использованием протокола транзиентной экспрессии генов (система Freestyle™ MAX). Комбинация коэкспрессированных экспрессионных векторов для создания сборок полиспецифичных форматов описана в табл. 2. После культивирования в течение нескольких дней супернатант клеток, секретирующих фрагменты антител, собирали для очистки. Белки сорбировали на подходящей аффинной смоле (например, Capto L., GE Healthcare), интенсивно промывали и элюировали сдвигом pH. Элюированные белки нейтрализовали, и заменяли буфер, получая очищенные пулы. Белки были проанализированы с помощью эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-HPLC) (табл. 3 и фиг. 5) и электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГЭ) (фиг. 6) для оценки чистоты и с помощью УФ-видимой спектроскопии для оценки содержания белка. Концентрацию белка доводили до требуемого уровня и проводили анализ стабильности.

С использованием процедуры одностадийной аффинной хроматографии все конструкции могли быть элюированы в высокочистой и мономерной фракции (фиг. 5 и 6), что подтверждает эффективное и правильное образование пар когнатных вариабельных доменов. Кроме того, при SDS-PAGE в невосстанавливающих условиях фракция PRO357 мигрировала почти количественно при размере ковалентно связанного гетеродимера (примерно 106 кДа), поддерживая соответствующие связи между цепями MATCH и демонстрируя высокую эффективность и практически полное образование дисульфидной связи между цепями. Из-за структурных ограничений образование этой дисульфидной связи между неправильно спаренными вариабельными доменами очень маловероятно. Таким образом, этот результат наводит на мысль, что гетеродимеризация происходила почти исключительно между когнатными парами вариабельных доменов.

Пример 3. Оценка стабильности при хранении.

Эффективная димеризация цепей MATCH была дополнительно продемонстрирована с помощью замечательной гомогенности белкового содержания в образцах, очищенных на белке L. Белок анализировали в течение четырех недель хранения при 4 и 37°С в отношении олигомеризации с помощью SE-HPLC и деградации с помощью ДСН-ПААГЭ (см. фиг. 7-9). До начала исследования концентрацию образцов доводили до 1 г/л и отмечали момент времени t0. Содержание мономера определяли количественно путем разделения образцов на Shodex KW-402.5-4F (Showa Denko) и оценки полученных хроматограмм. Для расчета относительной процентной доли мономера белка площадь мономерного пика делили на общую площадь пиков, которые не могут быть отнесены к матриксу образца. Деградацию белка оценивали с помощью ДСН-ПААГЭ-анализа на гелях Any kD™ Mini-Protean TGX (Bio-Rad Laboratories) и окрашивали Кумасси бриллиантовым синим. Концентрацию белка контролировали в разные моменты времени с помощью УФ-видимой спектроскопии на спектрофотометре Infinite M200 Pro, оснащенном

планшетом Nanoquant (Tecan Group Ltd.).

Пример 4. Термическая денатурация.

Средняя точка перехода для термической денатурации испытанных конструкций была определена с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF), по существу как описано Niesen (Niesen et al., Nat Protoc. 2 (2007) 2212-21). Анализ DSF выполняется в приборе для количественной ПЦР (например, MX3005p, Agilent Technologies). Образцы разводили в буфере (цитрат-фосфатный буфер, pH 6,4, 0,25 M NaCl), содержащем конечную концентрацию 5x Sypro оранжевого в общем объеме 25 мкл. Измерения образцов проводили в трех повторах, и программировали режим линейного изменения температуры 25-96°C. Флуоресцентный сигнал регистрировали, и необработанные данные анализировали с помощью GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.).

Пример 5. Определение аффинности.

Аффинности связывания индивидуальных связывающих мишени доменов в одноцепочечном Fv(scFv)-формате, а также очищенных гетеродимерных тетраспецифичных конструкций, с рекомбинантными белками-мишенями - рецептором IL-5 человека (IL5R), внеклеточным доменом рецептора IL-23 человека (IL23R), моноцепью гамма-эпсилон CD3 человека (CD3) - были измерены с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием SPR-инструмента MASS-1 (Sierra Sensors). Для измерений аффинности (проводимых в проточном HEPES-буфере: 0,01 M HEPES, 0,15 M NaCl, 0,05% Tween) белки-мишени - внеклеточный домен гетеродимерного одноцепочечного CD3γδ человека (произведенный в лаборатории авторов), IL5R человека (R&D Systems), IL23R человека (Trenzyme) и TNF человека (Peprotech) - иммобилизовали в количестве 100-250 RU на сенсорном чипе (SPR-2 Affinity Sensor High Capacity Amine, Sierra Sensor) с использованием буферных систем, оптимизированных для каждой отдельной мишени с использованием стандартной процедуры связывания по аминогруппам. Для TNFα человека (TNF) использовали стандартный аминный сенсор. Двукратные серийные разведения очищенных гетеродимерных тетраспецифичных конструкций в диапазоне от 90 до 0,703 нМ вводили в проточную ячейку в течение 3 мин (20 мкл/мин) и оставляли для диссоциации на 720 с. После каждого цикла введения, поверхности регенерировали 45-секундным вторым введением 10 мМ глицина-HCl, pH 1,5. Аффинность рассчитывали путем подгонки сенсограмм для по меньшей мере шесть концентраций, так чтобы средний хи-квадрат составлял менее 10% от R_{max}. Для TNF не было выполнено никаких серийных разведений, а только измерения при одной концентрации 90 нМ. Из данных дважды вычитают фон (вычитают референсный канал и контрольный цикл).

Аффинность гетеродимерных тетраспецифичных конструкций связывания с каждой из четырех мишеней, как правило, очень близка с аффиностью отдельных связывающих доменов (scFv), используемых в тетраспецифичном формате, включая те CDR, чья иммунная реактивность, предположительно, зависит от правильной димеризации (т.е. те, которые представлены образующими Fv-димер, мишенью которых являются TNFα и CD3ε соответственно). Это демонстрирует полную функциональность каждого вариабельного домена в тетраспецифичных конструкциях и подтверждает правильность сборки когнатных пар вариабельных доменов.

Кроме того, каждый из трех полиспецифичных форматов был способен связывать все четыре антигена-мишени одновременно, по-видимому, независимо от порядка взаимодействия с антигеном, как продемонстрировано SPR-анализом иммобилизованного MATCH белка (фиг. 11).

Важно признать, что в то время как эти данные указывают на правильную сборку между MATCH-цепями, они не обязательно указывают на отсутствие некогнатного связывания вариабельных доменов, в частности "перевернутого" образования пар между MATCH-цепями, которое продуцирует химерные пары CDR. Было высказано предположение, что пары CDR влияют на эффективность ассоциации VL-VH, и полученные авторами данные SE-HPLC, ДСН-ПААГЭ и SPR, по-видимому, позволяют предположить, что образование когнатных пар в MATCH-цепях является весьма предпочтительным. Однако в попытке оценить степень образования "перевернутых" пар для MATCH-цепей авторы провели SE-HPLC-анализ антител и комплексов антиген-антитело после инкубации MATCH-белков с мольным эквивалентом тримерного TNFα (т.е. 3-кратным избытком эпитопа TNFα). При применении этого способа анализа для родительского анти-TNFα scFv (данные не показаны) SE-HPLC хроматограммы показали дискретные пики, соответствующие трем различным популяциям комплекса антиген-антитело, отражающим неравные размеры комплексов TNFα с 1, 2 и 3 scFv. Кроме того, наблюдался пик, который согласуется с наличием остаточного, не находящегося в комплексе TNFα в растворе, тогда как не находящийся в комплексе scFv полностью отсутствовал в растворе, что подтверждает применение этого способа для идентификации "неактивного" анти-TNFα антитела.

Разделение MATCH-белка и комплексов MATCH-антиген было менее эффективно из-за большой молекулярной массы полиспецифичных молекул. Однако результаты авторов (фиг. 12) также четко показали наличие трех популяций комплексов MATCH-TNFα и остаточного не находящегося в комплексе TNFα. Кроме того, "образование плеч" у пика комплекса 1xMATCH:TNFα позволяет предположить наличие неактивного, но димерного MATCH-белка. Для оценки доли неактивного MATCH-белка в растворе, пики деконволюировали с использованием программного обеспечения PeakFit v.1.2, предполагая га-

уссово распределение для каждого пика, и наносили на график, чтобы оптимизировать степень согласия (фиг. 12). Этот анализ показал, что доля неактивного MATCH-белка находилась в диапазоне от 4,7 до 11,4% (PRO357<PRO356<PRO355) от общего содержания MATCH-белка.

Таблица 1

Конструкции

Цепи белков		Линкер 1	Основной домен Fv 1	Линкер 2	Основной домен Fv 2	Линкер 3	
1	scFv (αIL23R)	GGGGSGGGGS	VL (αTNFa)	GGSGGS	VL (αCD3)		
2	scFv (αIL5R)	GGGGSGGGGS	VH (αCD3)	GGSGGS	VH (αTNFa)		
3	scFv (αIL23R)	GGGGSGGGGS	VL (αTNFa)	GGSGGS	VL (αCD3)		GSC
4	scFv (αIL5R)	GGGGSGGGGS	VH (αCD3)	GGSGGS	VH (αTNFa)		GSC
5			VL (αTNFa)	GGSGGS	VL (αCD3)		
6			VL (αTNFa)	GGSGGS	VL (αCD3)		GSC
7			VH (αCD3)	GGGSGGGS	VH (αTNFa)	GGGGSGGGGS	scFv (αIL5R)
8			VL (αTNFa)	GGSGGS	VL (αCD3)		
9	scFv (αIL23R)	GGGGSGGGGSGGGGS	VL (αTNFa)	GGGGSGGGGSGGGGS	VL (αCD3)		
10	scFv (αIL5R)	GGGGSGGGGSGGGGS	VH (αCD3)	GGGGSGGGGSGGGGS	VH (αTNFa)		
11			VL (αTNFa)	GGGGSGGGGSGGGGS	VL (αCD3)		

Таблица 2

Сборки полиспецифичных форматов

ID белка (Numab)	Сборка	Белковая цепь 1	Белковая цепь 2
PRO356	1 (см. фиг. 1)	1	2
PRO469	2	1	5
PRO357	3 (см. фиг. 2)	3	4
PRO470	4	4	6
PRO358	5 (см. фиг. 3)	1	7
PRO471	6	5	7
PRO355	7 (см. фиг. 4)	9	10
PRO468	8	10	11

Таблица 3

Эксклюзионные хроматограммы после 1-стадийной очистки

ID белка (внутренний)	ID сборки	Содержание мономера	Фигура
PRO356	Сборка 1	93,9	5A
PRO357	Сборка 3	94,4	5B
PRO358	Сборка 5	93,9	5C
PRO355	Сборка 7	90,4	5D

Таблица 4

Средняя точка денатурации для белков, определенная с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии

ID белка (внутренний)	ID сборки	Tm [°C]
PRO356	1	67,99
PRO469	2	67,24
PRO357	3	71,27
PRO470	4	70,34
PRO358	5	68,51
PRO471	6	67,98
PRO355	7	67,33
PRO468	8	66,67

Таблица 5

Аффинность гетеродимерных тетраспецифичных конструкций

ID белка	Аффинность к IL5R [M]	Аффинность к CD3 M]	Аффинность к IL23R [M]	Аффинность к TNF [M]
scFvs	2,32E-10	8,57E-09	1,50E-10	2,02E-10
PRO355	1,03E-10	2,01E-08	6,54E-10	3,30E-10
PRO356	1,26E-10	7,14E-09	3,41E-10	2,01E-10
PRO357	1,28E-10	6,69E-09	3,58E-10	1,81E-10
PRO358	2,12E-10	5,60E-09	4,14E-10	2,11E-10

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гетеродимерная конструкция на основе антитела, содержащая, по меньшей мере, первую и вторую когнатные пары вариабельных доменов со специфичностью к первому и второму антигенам-мишеням соответственно, содержащая первый и второй одноцепочечные белки, где указанный первый одноцепочечный белок содержит первую аминокислотную последовательность, состоящую из (от N- к С-концу):

(ia) первого VL-домена,

(iia) первого полипептидного линкера и

(iiia) второго VL-домена; и

где указанный второй одноцепочечный белок содержит вторую аминокислотную последовательность, состоящую из (от N- к С-концу):

(ib) первого VH-домена,

(iib) второго полипептидного линкера и

(iiib) второго VH-домена; и

где указанный первый VL-домен образует первую когнатную пару вариабельных доменов со специфичностью к первому антигену-мишени с любым указанным первым или указанным вторым VH-доменом и указанный второй VL-домен образует вторую когнатную пару вариабельных доменов со специфичностью ко второму антигену-мишени с другим из указанных VH-доменов, и где по меньшей мере один из указанных первого или второго одноцепочечного белка дополнительно содержит

(iv) по меньшей мере один дополнительный домен в качестве третьего функционального домена, который слит посредством третьего полипептидного линкера с указанной первой или указанной второй аминокислотной последовательностью, где указанная гетеродимерная конструкция не содержит: ни (i) когнатную пару первого и второго иммуноглобулинового константного домена, где указанный первый иммуноглобулиновый константный домен содержится в указанном первом одноцепочечном белке, и где указанный второй иммуноглобулиновый константный домен содержится в указанном втором одноцепочечном белке, ни (ii) любую дополнительную пару гетеродимеризующих доменов, кроме указанных первого и второго VL- и VH-доменов (ia-iiia) и (ib-iiib), в которой один гетеродимеризующий домен указанной дополнительной пары гетеродимеризующих доменов расположен в указанном первом одноцепочечном белке, а другой гетеродимеризующий домен расположен в указанном втором одноцепочечном белке.

2. Гетеродимерная конструкция по п.1, дополнительно содержащая:

(v) четвертый функциональный домен, который слит посредством четвертого полипептидного мостика с указанной первой или указанной второй аминокислотной последовательностью;

(vi) четвертый и пятый функциональные домены, которые слиты через четвертый и пятый полипептидные линкеры соответственно с указанной первой и/или указанной второй аминокислотной последовательностью; или

(vi) четвертый, пятый и шестой функциональные домены, которые слиты через четвертый, пятый и шестой полипептидные линкеры соответственно с указанной первой и указанной второй аминокислотной последовательностью.

3. Гетеродимерная конструкция по п.1 или 2, где указанный первый полипептидный линкер состоит из 5-20 аминокислотных остатков, в частности из 6-15 аминокислотных остатков.

4. Гетеродимерная конструкция по любому из пп.1-3, где: (a) указанный первый VL-домен (ia) и указанный первый VH-домен (ib) образуют первую когнатную пару вариабельных доменов со специфичностью к первому антигену-мишени, а указанный второй VL-домен (iiia) и указанный второй VH-домен (iiib) образуют вторую когнатную пару вариабельных доменов со специфичностью ко второму антигену-мишени; или (b) указанный первый VL-домен (ia) и указанный второй VH-домен (iiib) образуют первую когнатную пару вариабельных доменов со специфичностью к первому антигену-мишени, а указанной второй VL-домен (iiia) и указанный первый VH-домен (ib) образуют вторую когнатную пару вариабельных доменов со специфичностью ко второму антигену-мишени.

5. Гетеродимерная конструкция по любому из пп.1-3, где указанный третий, четвертый, пятый и/или шестой функциональные домены независимо выбраны из списка связывающих доменов, токсинов,

ферментов, гормонов, сигнальных белков и альбуминов.

6. Гетеродимерная конструкция по п.5, где указанные третий, четвертый, пятый и/или шестой функциональные домены независимо выбраны из связывающих доменов.

7. Гетеродимерная конструкция по п.6, где указанные связывающие домены независимо выбраны из списка связывающих доменов на основе антител и связывающих доменов на основе альтернативных каркасов.

8. Гетеродимерная конструкция по п.7, где указанные связывающие домены выбраны из связывающих доменов на основе антител, выбранных из списка scFv-фрагментов, Fab-фрагментов и отдельных вариабельных доменов антител.

9. Гетеродимерная конструкция по п.7, где указанные связывающие домены выбраны из связывающих доменов на основе альтернативных каркасов, выбранных из списка доменов на основе анкиринов, финомеров, авимеров, антикалинов и связывающих сайтов, встроенных в константные области антител.

10. Гетеродимерная конструкция по любому из пп.1-9, где по меньшей мере один из указанных вариабельных доменов антител содержит CDR-области, полученные из родительского антитела кролика.

11. Гетеродимерная конструкция по любому из пп.1-10, где по меньшей мере один из указанных вариабельных доменов антител содержит каркасные области антитела человека.

12. Гетеродимерная конструкция по любому из пп.1-11, где когнатная пара одного из указанных первого и второго VL- и VH-доменов является специфичной для антигена, выбранного из списка раковой мишени; и мишени, присутствующей на иммунных эффекторных клетках, в частности CD3.

13. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая первый и второй одноцепочечные белки гетеродимерной конструкции по любому из пп.1-12.

14. Набор для экспрессии первого и второго одноцепочечных белков гетеродимерной конструкции по любому из пп.1-12, содержащий первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первый одноцепочечный белок указанной гетеродимерной конструкции, и вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую указанный второй одноцепочечный белок.

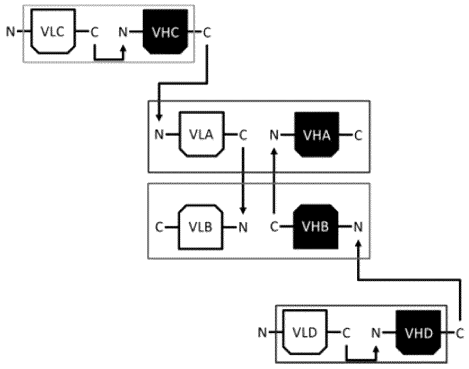
15. Вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты по п.13 или две последовательности нуклеиновой кислоты набора по п.14.

16. Набор для экспрессии первого и второго одноцепочечных белков гетеродимерной конструкции по любому из пп.1-12, содержащий два вектора, где указанный первый вектор содержит первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую указанный первый одноцепочечный белок, и где второй вектор содержит вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую указанный второй одноцепочечный белок.

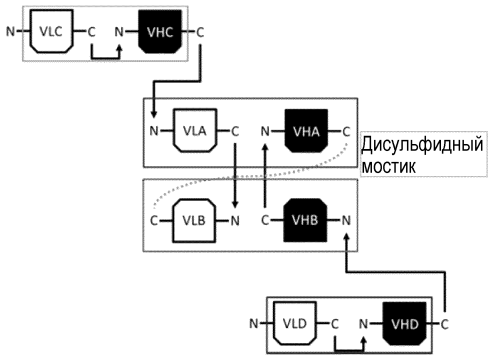
17. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.15 или два вектора набора по п.16.

18. Способ получения гетеродимерной конструкции по любому из пп.1-12, или первого и второго одноцепочечных белков указанной гетеродимерной конструкции, включающий: (i) получение последовательности нуклеиновой кислоты по п.13 или двух последовательностей нуклеиновой кислоты набора по п.14, или вектора по п.15 или двух векторов набора по п.16, экспрессию указанной последовательности нуклеиновой кислоты или указанных двух последовательностей нуклеиновой кислоты, или указанного вектора или указанных двух векторов, и сбор указанной гетеродимерной конструкции из экспрессионной системы; или (ii) получение клетки-хозяина по п.17, культивирование указанной клетки-хозяина и сбор указанных первого и второго одноцепочечных белков или указанной гетеродимерной конструкции из культуры клеток.

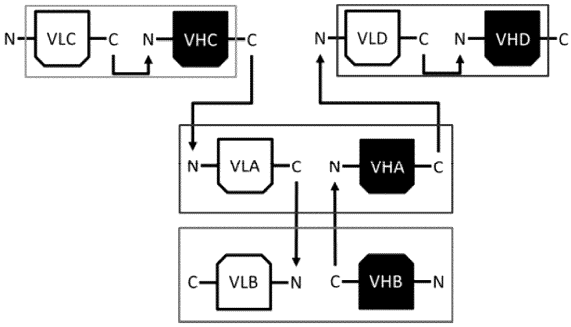
19. Фармацевтическая композиция, содержащая гетеродимерную конструкцию по любому из пп.1-12 и фармацевтически приемлемый носитель.



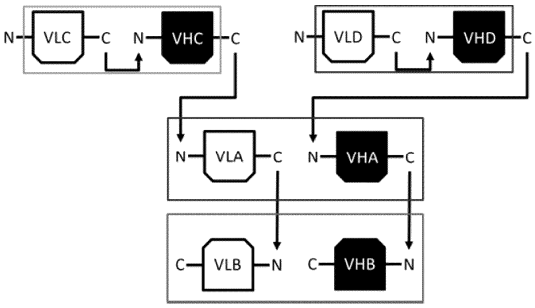
Фиг. 1



Фиг. 2

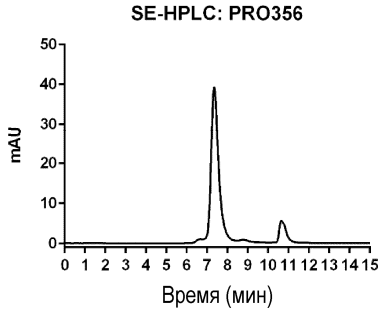


Фиг. 3

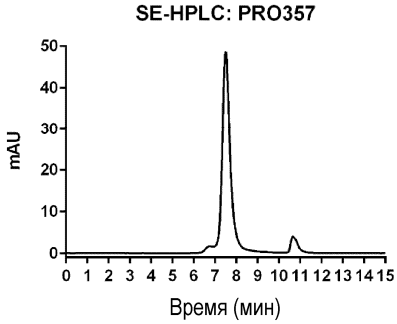


Фиг. 4

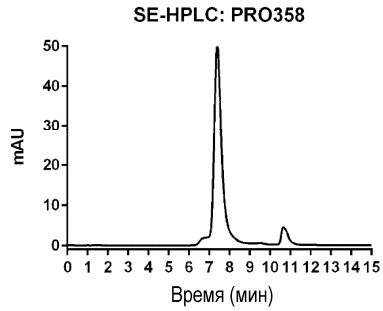
A:


SE-HPLC: PRO356
mAU
50
40
30
20
10
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
Время (мин)

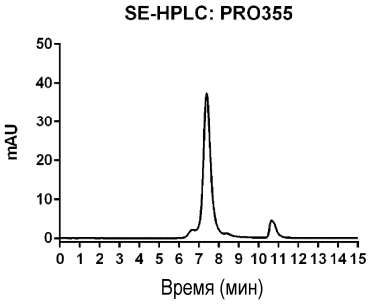
B:


SE-HPLC: PRO357
mAU
50
40
30
20
10
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
Время (мин)

C:

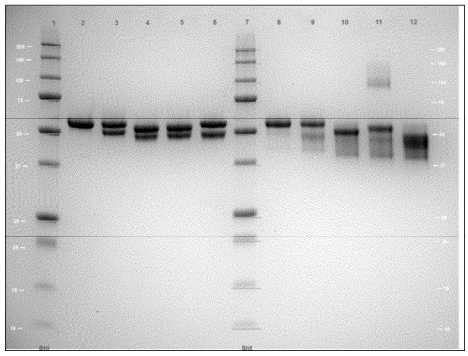

SE-HPLC: PRO358
mAU
50
40
30
20
10
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
Время (мин)

D:

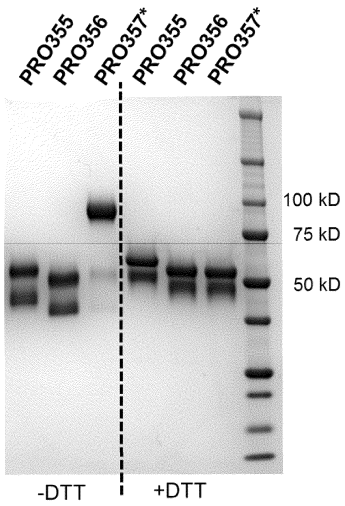

SE-HPLC: PRO355
mAU
50
40
30
20
10
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
Время (мин)

Фиг. 5

A



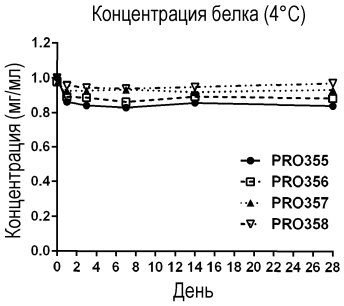
B:



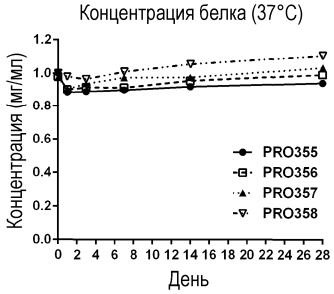
*Содержит дисульфидный мостик между цепями

Фиг. 6

A:



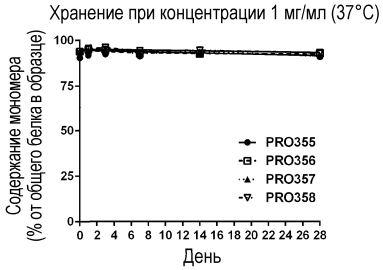
B:



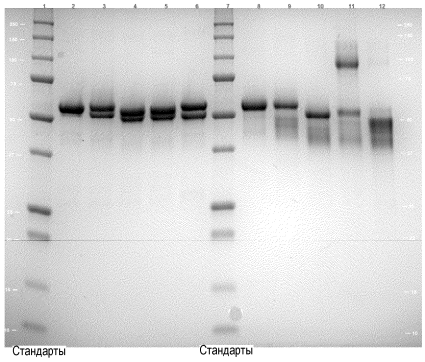
Фиг. 7

A:

B:

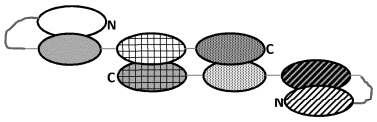


Фиг. 8

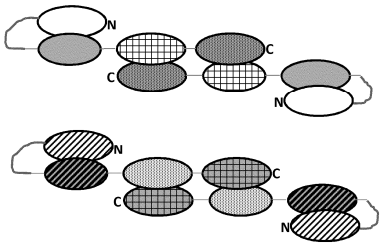


Фиг. 9

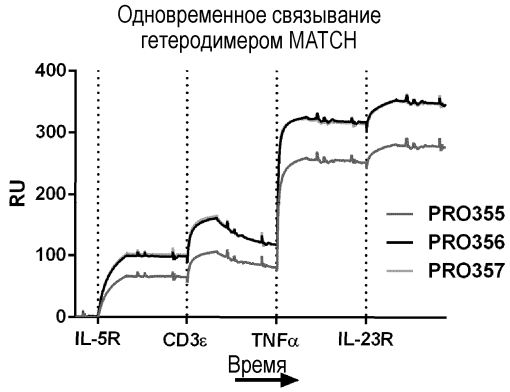
A:

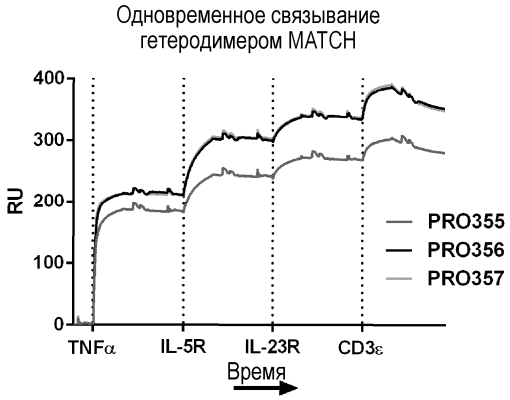


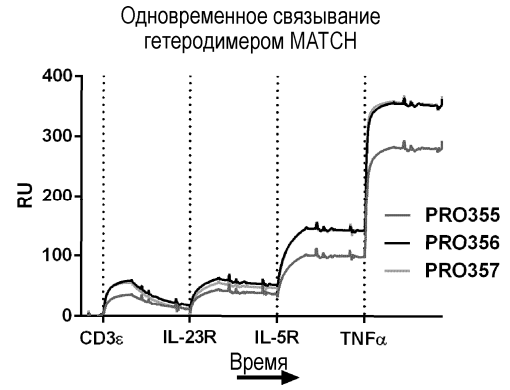
B:

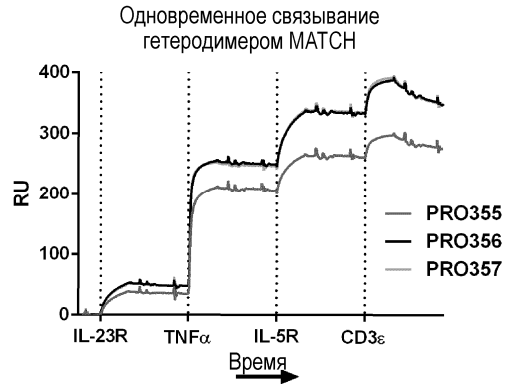


Фиг. 10

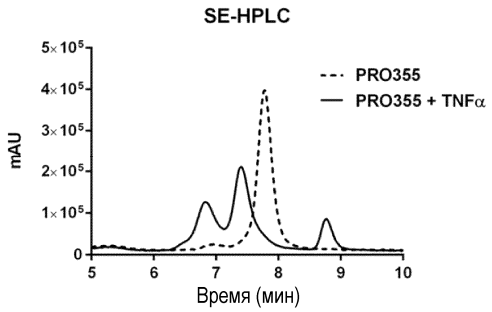

Одновременное связывание
гетеродимером MATCH
RU
400
300
200
100
0
IL-5R
CD3ε
TNFα
IL-23R
Время
PRO355
PRO356
PRO357

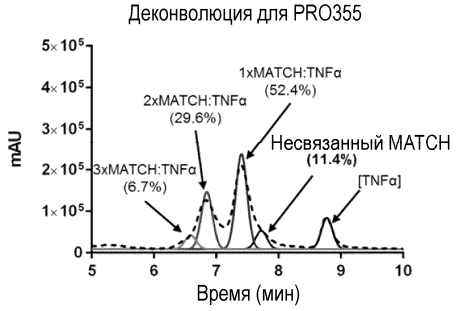

Одновременное связывание
гетеродимером MATCH
RU
400
300
200
100
0
TNFα
IL-5R
IL-23R
CD3ε
Время
PRO355
PRO356
PRO357

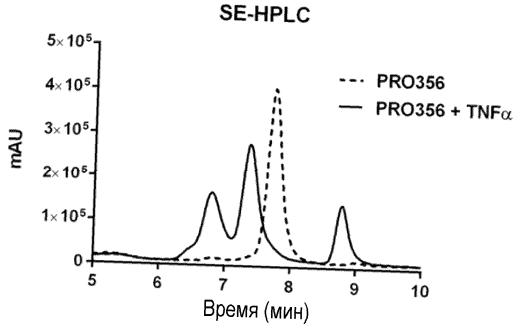

Одновременное связывание
гетеродимером MATCH
RU
400
300
200
100
0
CD3ε
IL-23R
IL-5R
TNFα
Время
PRO355
PRO356
PRO357

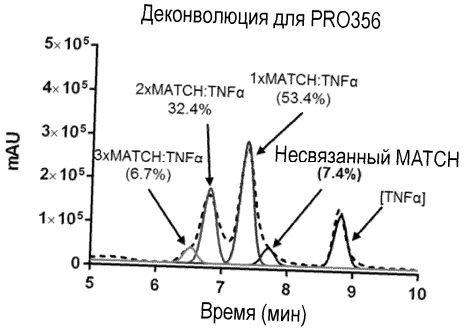

Одновременное связывание
гетеродимером MATCH
RU
400
300
200
100
0
IL-23R
TNFα
IL-5R
CD3ε
Время
PRO355
PRO356
PRO357

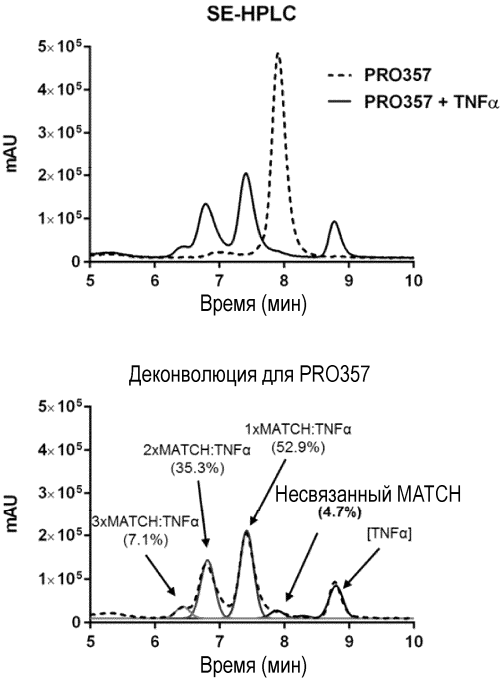
Фиг. 11


SE-HPLC
PRO355
PRO355 + TNFα
mAU
Время (мин)


Деконволюция для PRO355
1xMATCH:TNFα
(52.4%)
2xMATCH:TNFα
(29.6%)
Несвязанный MATCH
(11.4%)
3xMATCH:TNFα
(6.7%)
[TNFα]
mAU
Время (мин)


SE-HPLC
PRO356
PRO356 + TNFα
mAU
Время (мин)


Деконволюция для PRO356
2xMATCH:TNFα
32.4%
1xMATCH:TNFα
(53.4%)
3xMATCH:TNFα
(6.7%)
Несвязанный MATCH
(7.4%)
[TNFα]
mAU
Время (мин)


SE-HPLC
PRO357
PRO357 + TNFα
mAU
Время (мин)
Деконволюция для PRO357
1xMATCH:TNFα
(52.9%)
2xMATCH:TNFα
(35.3%)
Несвязанный MATCH
(4.7%)
3xMATCH:TNFα
(7.1%)
[TNFα]
mAU
Время (мин)

Фиг. 12