(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202291930 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.11.10

(22) Дата подачи заявки
2021.01.23

(51) Int. Cl. ***C07K 16/18*** (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) МУЛЬТИСПЕЦИФИЧНЫЕ АНТИТЕЛА, СОДЕРЖАЩИЕ ИХ КОМПОЗИЦИИ, ВЕКТОРЫ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

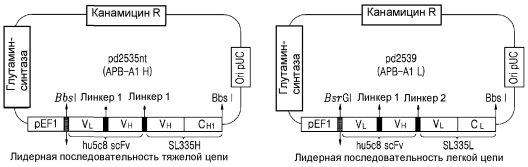
(31) **10-2020-0009565; 16/878,255**
(32) **2020.01.24; 2020.05.19**
(33) **KR; US**
(86) **PCT/IB2021/050519**
(87) **WO 2021/149015 2021.07.29**

(71) Заявитель:
ЭЙПРИЛБИО КО., ЛТД. (KR)

(72) Изобретатель:
Ча Санг Хун (KR)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Изобретение обеспечивает мультиспецифичные антитела, обладающие повышенной долгосрочной стабильностью in vivo, где указанные мультиспецифичные антитела содержат один или более биоактивных эффекторных фрагментов, связанных с любым из или обоими из N-конца и C-конца антигенсвязывающего фрагмента Fab, который связывается с человеческим сывороточным альбумином.



202291930 A1

202291930 A1

МУЛЬТИСПЕЦИФИЧНЫЕ АНТИТЕЛА, СОДЕРЖАЩИЕ ИХ КОМПОЗИЦИИ, ВЕКТОРЫ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно заявке на корейский патент № 10 2020 0009565, поданной 24 января 2020 г., и заявке на патент США № 16/878 255, поданной 19 мая 2020 г., описание каждой из которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, поданный в электронном виде в формате ASCII и полностью включенный в настоящую заявку посредством ссылки. Копия указанного файла в формате ASCII, созданная 19 января 2021 г., называется 2662-0001WO01_ Sequence Listing _ST25.txt и имеет размер 68 Кб.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0003] Настоящее изобретение относится к слитым конструкциям, содержащим антиген-связывающий фрагмент и биоактивные эффекторные фрагменты. Более конкретно, настоящее изобретение относится к мультиспецифичным антителам, содержащим два или более биоактивных эффекторных фрагментов, связанных с любым из или обоими из N-конца и C-конца антиген-связывающего фрагмента, который связывается с человеческим сывороточным альбумином.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Взаимодействие CD40-CD40L оказывает существенное влияние на формирование антитело-зависимых антиген-специфичных иммунных ответов, и аутоантитела вовлечены в патогенез различных аутоиммунных заболеваний. Для эффективного лечения указанных заболеваний исследовали различные CD40L- или CD40-специфичные антитела, способные ингибировать и/или подавлять взаимодействие CD40-CD40L. Например, моноклональные антитела против CD40L, IgG1 hu5c8 (BG-9588, руплизумаб, Antova™, Biogen, Кембридж, Массачусетс) и IDEC-131 (E6040, IDEC Pharmaceuticals, Сан-Диего, Калифорния) были изучены для лечения различных аутоиммунных заболеваний, включая, например, системную красную волчанку (СКВ) и идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ИТП), но

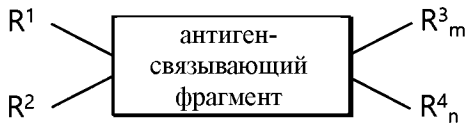
дальнейшая разработка таких антител была приостановлена из-за возникновения побочных эффектов, таких как тромбоэмболия. Таким образом, многими группами исследователей были предприняты попытки разработать подходы для решения проблемы тромбоэмболического побочного эффекта путем создания рекомбинантных Fc-фрагментов, и несколько таких подходов было представлено, включая, например, пегилированный Fab против CD40L, CDP7657 (дапиролизумаб пегол, Biogen) и белок слияния TN3-HSA, сконструированный таким образом, чтобы связываться с CD40L, VIB4920 (VIELABIO, Гейтерсберг, Мэриленд). В этой связи другими группами исследователей в качестве терапевтического агента, направленного на CD40, но не CD40L, разрабатывается антитело BI655064, обладающее ослабленной Fc-функцией (Boehringer Ingelheim, Германия), антитело блеселумаб типа IgG4 человека (Kyowa Kirin Pharmaceutical Development, Ла-Хойа, Калифорния) и т.д.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] Настоящее изобретение обеспечивает мультиспецифичные антитела, обладающие повышенным временем удержания *in vivo*. Настоящее изобретение также обеспечивает фармацевтические композиции, содержащие указанное мультиспецифичное антитело. Настоящее изобретение также обеспечивает способы получения указанного мультиспецифичного антитела.

[0006] Например, согласно настоящему изобретению, описаны новые терапевтические агенты для лечения аутоиммунных заболеваний, предназначенные для подавления сигнального пути CD40-CD40L с устранением при этом Fc-опосредованного тромбоэмболического побочного эффекта, вызванного антителом против CD40L. Для этого было разработано рекомбинантное биспецифичное антитело, способное поддерживать долгосрочную стабильность в сыворотке в отсутствие Fc-участка, представленное в формате (scFv против CD40L)$_2$-(Fab против HSA)-(Fv против TNF-α) путем связывания одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), состоящего из генов вариабельных участков V_H и V_L hu5c8 (антитела руплизумаба, связывающегося с CD40L), с N-концом Fab SL335. Кроме того, согласно настоящему изобретению описаны мультиспецифичные антитела, представленные в формате (scFv против CD40L)$_2$-(Fab против HSA)-(Fv против TNF-α) путем связывания Fv или dsFv, содержащего ген вариабельного участка антитела цертолизумаба пегола, связывающегося с TNF-α, с C-концом Fab SL335 биспецифичного антитела с помощью пептидного линкера, а также определенные функции и характеристики полученного белка антитела.

[0007] Согласно настоящему изобретению, описаны мультиспецифичные антитела, имеющие следующую структурную формулу:



где указанный антиген-связывающий фрагмент (Fab) представляет собой Fab антитела против сывороточного альбумина;

где R^1 и R^2 представляют собой биоактивные эффекторные фрагменты, связанные с N-концом Fab, где каждый из указанных фрагментов связан с вариабельным доменом тяжелой цепи или вариабельным доменом легкой цепи Fab;

где R^3 и R^4 представляют собой биоактивные эффекторные фрагменты, связанные с C-концом Fab, где каждый из указанных фрагментов связан с вариабельным доменом тяжелой цепи или вариабельным доменом легкой цепи Fab;

где m равен 0 или целому числу, составляющему 1 или более; и

где n равен 0 или целому числу, составляющему 1 или более. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, R^1 и R^2 представляют собой одинаковые или разные одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, R^3 и R^4 представляют собой одинаковые или разные Fv-фрагменты или стабилизированные дисульфидными связями Fv (dsFv)-фрагменты.

[0008] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, каждый из R^1, R^2, R^3 и R^4 может быть связан с Fab с помощью одного или более линкеров. Каждый линкер может содержать от 1 до 20 аминокислот. Каждый линкер может содержать аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:4. Каждый линкер может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:4.

[0009] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, Fab содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий

(a) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SYGIS (SEQ ID NO:61), CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность WINTYSGGTKYAQKFQG (SEQ ID NO:62), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность LGHCQRGICSDALDT (SEQ ID NO:63);

(b) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SYGIS (SEQ ID NO:61), CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RINTYNGNTGYAQRLQG (SEQ ID NO:64), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность LGHCQRGICSDALDT (SEQ ID NO:63);

(c) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность NYGIH (SEQ ID NO:65), CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO:66), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность DVHYYGSGSYYNAFDI (SEQ ID NO:67);

(d) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SYAMS (SEQ ID NO:68), CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность VISHDGGFQYYADSVKG (SEQ ID NO:69), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AGWLRQYGMDV (SEQ ID NO:70);

(e) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AYWIA (SEQ ID NO:71), CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность MIWPPDADARYSPSFQG (SEQ ID NO:72), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность LYSGSYSP (SEQ ID NO:73); или

(f) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AYSMN (SEQ ID NO:74), CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SISSSGRYIHYADSVKG (SEQ ID NO:75), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность ETVMAGKALDY (SEQ ID NO:76).

[0010] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, Fab содержит вариабельный домен легкой цепи, содержащий

(g) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSISRYLN (SEQ ID NO:77), CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASRLES (SEQ ID NO:78), и CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQSDSVPVT (SEQ ID NO:79);

(h) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSISSYLN (SEQ ID NO:80),

CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AASSLQS (SEQ ID NO:81), и CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQSYSTPPYT (SEQ ID NO:82);

(i) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSIFNYVA (SEQ ID NO:83), CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность DASNRAT (SEQ ID NO:84), и CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQRSKWPPTWT (SEQ ID NO:85);

(j) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASETVSSRQLA (SEQ ID NO:86), CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASSRAT (SEQ ID NO:87), и CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQYGSSPRT (SEQ ID NO:88);

(k) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSVSSSSLA (SEQ ID NO:89), CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASSRAT (SEQ ID NO:87), и CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QKYSSYPLT (SEQ ID NO:90); или

(l) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSVGSNLA (SEQ ID NO:91), CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASTGAT (SEQ ID NO:92), и CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQYYSFLAKT (SEQ ID NO:93).

[0011] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, Fab содержит

определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AYSMN (SEQ ID NO:74), CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SISSSGRYIHYADSVKG (SEQ ID NO:75), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность ETVMAGKALDY (SEQ ID NO:76), и

определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSVGSNLA (SEQ ID NO:91), CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASTGAT (SEQ ID NO:92), и

CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQYYSFLAKT (SEQ ID NO:93).

[0012] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, Fab содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности SEQ ID NO:94, 95, 96, 97, 98 или 99.

[0013] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, Fab содержит вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности SEQ ID NO:100, 101, 102, 103, 104 или 105.

[0014] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, Fab содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности SEQ ID NO:94, 95, 96, 97, 98 или 99, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности SEQ ID NO:100, 101, 102, 103, 104 или 105 соответственно.

[0015] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, Fab содержит домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45 (домен V_H-C_{H1}), и домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:46 (домен V_L-C_L).

[0016] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, каждый из R^1 и R^2 представляет собой scFv антитела против CD40L hu5c8. Каждый из R^1 и R^2 может представлять собой scFv антитела против CD40L hu5c8, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности SEQ ID NO:47 или SEQ ID NO:48. Каждый из R^1 и R^2 может представлять собой scFv антитела против CD40L hu5c8, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47 или SEQ ID NO:48.

[0017] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, каждый из R^3 и R^4 представляет собой один или более биоактивных эффекторных фрагментов, содержащих Fv против TNF-α, стабилизированный дисульфидной связью Fv против TNF-α (dsFv), Fv против IL-23, dsFv против IL-23, антитело против IFNAR1 и/или dsFv против IFNAR1. Каждый из R^3 и R^4 может представлять собой один или более биоактивных эффекторных фрагментов, содержащих Fv против TNF-α, содержащий аминокислотную последовательность тяжелой цепи, идентичную на 80%

последовательности SEQ ID NO:49, и аминокислотную последовательность легкой цепи, идентичную на 80% последовательности SEQ ID NO:50; стабилизированный дисульфидной связью Fv (dsFv) против TNF-α, содержащий аминокислотную последовательность тяжелой цепи, идентичную на 80% последовательности SEQ ID NO:51, и аминокислотную последовательность легкой цепи, идентичную на 80% последовательности SEQ ID NO:52; Fv против IL-23, содержащий аминокислотную последовательность тяжелой цепи, идентичную на 80% последовательности SEQ ID NO:53, и аминокислотную последовательность легкой цепи, идентичную на 80% последовательности SEQ ID NO:54; dsFv против IL-23, содержащий аминокислотную последовательность тяжелой цепи, идентичную на 80% последовательности SEQ ID NO:55, и аминокислотную последовательность легкой цепи, идентичную на 80% последовательности SEQ ID NO:56; антитело против IFNAR1, содержащее аминокислотную последовательность тяжелой цепи, идентичную на 80% последовательности SEQ ID NO:57, и аминокислотную последовательность легкой цепи, идентичную на 80% последовательности SEQ ID NO:58; и/или dsFv против IFNAR1, содержащий аминокислотную последовательность тяжелой цепи, идентичную на 80% последовательности SEQ ID NO:59, и аминокислотную последовательность легкой цепи, идентичную на 80% последовательности SEQ ID NO:60. Каждый из R^3 и R^4 может представлять собой один или более биоактивных эффекторных фрагментов, содержащих Fv против TNF-α, содержащий последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:49 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:50; стабилизированный дисульфидной связью Fv (dsFv) против TNF-α, содержащий последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:51 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:52, Fv против IL-23, содержащий последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:53 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:54, dsFv против IL-23, содержащий последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:55 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:56, антитело против IFNAR1, содержащее последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:57 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:58, и/или dsFv против IFNAR1, содержащий последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:59 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:60.

[0018] Согласно настоящему изобретению, описаны композиции, содержащие мультиспецифичные антитела, описанные в настоящей заявке, и вспомогательное вещество. Также, согласно настоящему изобретению, описаны фармацевтические

композиции, содержащие мультиспецифичные антитела, описанные в настоящей заявке, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

[0019] Также, согласно настоящему изобретению, описаны способы лечения аутоиммунного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, где указанные способы включают введение указанному субъекту фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке.

[0020] Дополнительно, согласно настоящему изобретению, описаны векторы экспрессии, содержащие:

(a) промотор,

(b) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антиген-связывающий фрагмент (Fab), который связывается с сывороточным альбумином, и

(c) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую биоактивный эффекторный фрагмент и линкер,

где указанный промотор, первая молекула последовательности нуклеиновой кислоты и вторая молекула нуклеиновой кислоты функционально связаны. Вторая молекула нуклеиновой кислоты может кодировать 2 или более биоактивных эффекторных фрагментов и линкеров.

[0021] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую Fab, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий

(a) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SYGIS (SEQ ID NO:61),

CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность WINTYSGGTKYAQKFQG (SEQ ID NO:62), и

CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность LGHCQRGICSDALDT (SEQ ID NO:63);

(b) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SYGIS (SEQ ID NO:61),

CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RINTYNGNTGYAQRLQG (SEQ ID NO:64), и

CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность LGHCQRGICSDALDT (SEQ ID NO:63);

(c) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность NYGIH (SEQ ID NO:65),

CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO:66), и

CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность DVHYYGSGSYYNAFDI (SEQ ID NO:67);

(d) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SYAMS (SEQ ID NO:68),

CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность VISHDGGFQYYADSVKG (SEQ ID NO:69), и

CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AGWLRQYGMDV (SEQ ID NO:70);

(e) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AYWIA (SEQ ID NO:71),

CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность MIWPPDADARYSPSFQG (SEQ ID NO:72), и

CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность LYSGSYSP (SEQ ID NO:73); или

(f) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AYSMN (SEQ ID NO:74),

CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SISSSGRYIHYADSVKG (SEQ ID NO:75), и

CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность ETVMAGKALDY (SEQ ID NO:76).

[0022] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую Fab, содержащий вариабельный домен легкой цепи, содержащий

(g) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSISRYLN (SEQ ID NO:77),

CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASRLES (SEQ ID NO:78), и

CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQSDSVPVT (SEQ ID NO:79);

(h) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSISSYLN (SEQ ID NO:80),

CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AASSLQS (SEQ ID NO:81), и

CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQSYSTPPYT (SEQ ID NO:82);

(i) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSIFNYVA (SEQ ID NO:83),

CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность DASNRAT (SEQ ID NO:84), и

CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQRSKWPPTWT (SEQ ID NO:85);

(j) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASETVSSRQLA (SEQ ID NO:86),

CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASSRAT (SEQ ID NO:87), и

CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQYGSSPRT (SEQ ID NO:88);

(k) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSVSSSSLA (SEQ ID NO:89),

CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASSRAT (SEQ ID NO:87), и

CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QKYSSYPLT (SEQ ID NO:90); или

(l) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSVGSNLA (SEQ ID NO:91),

CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASTGAT (SEQ ID NO:92), и

CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQYYSFLAKT (SEQ ID NO:93).

[0023] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую Fab, содержащий

определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AYSMN (SEQ ID NO:74), CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SISSSGRYIHYADSVKG (SEQ ID NO:75), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность ETVMAGKALDY (SEQ ID NO:76), и

определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSVGSNLA (SEQ ID NO:91), CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASTGAT (SEQ ID NO:92), и CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQYYSFLAKT (SEQ ID NO:93).

[0024] Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения, первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую Fab, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности SEQ ID NO:94, 95, 96, 97, 98 или 99.

[0025] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую Fab, содержащий вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности SEQ ID NO:100, 101, 102, 103, 104 или 105.

[0026] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую Fab, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности SEQ ID NO:94, 95, 96, 97, 98 или 99 и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности SEQ ID NO:100, 101, 102, 103, 104 или 105 соответственно. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты,

кодирующую Fab, содержащий домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45 (домен V_H-C_{H1}), и домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:46 (домен V_L-C_L).

[0027] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, биоактивные эффекторные фрагменты представляют собой Fv против TNF-α, dsFv против TNF-α, Fv против IL-23, dsFv против IL-23, Fv против IFNAR1 и/или dsFv против IFNAR1. Вторая молекула нуклеиновой кислоты может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность одной или более из последовательностей SEQ ID NO: 49-60.

[0028] Настоящее изобретение обеспечивает содержащие вектор экспрессии клетки-хозяева, такие как клетки животных, например, клеточная линия CHO.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0029] Приведенные выше и другие аспекты, признаки и преимущества конкретных вариантов реализации изобретения будут более очевидны из следующего далее описания с сопутствующими графическими материалами, в которых:

[0030] На Фигурах 1A и 1B представлены карты векторов и аминокислотные последовательности APB-A1.

[0031] На Фигурах 2A и 2B представлены результаты анализа с помощью ВЭЖХ и ДСН-ПААГ-электрофореза для APB-A1.

[0032] На Фигуре 3 представлен результат анализа массы APB-A1.

[0033] На Фигуре 4A и 4B представлены значения pI для APB-A1.

[0034] На Фигуре 5 представлено изменение величины заряда APB-A1.

[0035] На Фигуре 6 представлено одновременное связывание rhCD40L-APB-A1-HSA.

[0036] На Фигуре 7 представлен результат анализа с помощью проточной цитометрии.

[0037] На Фигурах 8A - 8D представлены результаты анализа *in vitro* для APB-A1.

[0038] На Фигурах 9A - 9D представлены эффекты различных иммунных комплексов (IC) на агрегацию тромбоцитов.

[0039] На Фигуре 10 представлены эффекты различных IC на уровень серотонина.

[0040] На Фигуре 11 представлены ФК значения для APB-A1 в различных концентрациях, измеренные на модели макаков-крабоедов.

[0041] На Фигурах 12A и 12B представлены результаты фармакокинетического анализа на макаках-крабоедах.

[0042] На Фигурах 13A - 13C представлены биспецифичные антитела на основе SAFA и векторы для экспрессии в клетках млекопитающих.

[0043] На Фигуре 14 показаны аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепи APB-B1.

[0044] На Фигурах 15A - 15D представлены конструкции биспецифичных антител, очищенных с помощью аффинной хроматографии для IgG- C_{H1} CaptureSelect.

[0045] На Фигурах 16A и 16B представлены конструкции APB-B1, очищенные с помощью 2-этапной хроматографии.

[0046] На Фигуре 17 представлен анализ сдвига термостабильности при различных условиях pH и буферной системы.

[0047] На Фигурах 18A - 18C представлены результаты определения с помощью ИФА специфичности связывания конструкций APB-B1 с тремя различными антигенами для сравнения с исходными антителами.

[0048] На Фигуре 19 представлен результат анализа одновременного связывания APB-B1a с тремя различными антигенами с помощью биослойной интерферометрии.

[0049] На Фигуре 20 представлены результаты связывания конструкций на основе SAFA с мембранами клеток D1.1, идентифицированного с помощью проточной цитометрии.

[0050] На Фигуре 21 представлены результаты ингибирования биспецифичными антителами на основе SAFA опосредованной TNF-α цитотоксичности, идентифицированного на мышиных клетках L929.

[0051] На Фигурах 22A - 22C представлены результаты определения способности APB-B1 ингибировать любое или оба из взаимодействий CD40L-CD40 и TNFα-TNFαR, идентифицированное на репортерных клетках HEK-blue™.

[0052] Фигура 23. ФК данные, полученные на обезьянах. Концентрации APB-A1 в плазме крови измеряли с использованием ФК-ИФА. Данные представляют собой среднее для проведенных экспериментов.

[0053] Фигуры 24A и 24B. Иммунофенотипирование (делящиеся B-клетки). По результатам иммунофенотипирования клеток периферической крови было отмечено пониженное содержание делящихся B-клеток в группах, получавших 30, 10 и/или 3 мг/кг APB-A1, по сравнению с контрольными группами на 1 день (Фигура 24A) и 11 день (Фигура 24B).

[0054] Фигура 25. Титр IgG против KLH в сыворотке. При измерении количества антител против KLH был отмечен пониженный титр антител IgG с 8 по 29 день в группах,

получавших 10 и 30 мг/кг APB-A1, по сравнению с контрольными группами (* P<0,05, ** P<0,01: значимое отличие от контроля).

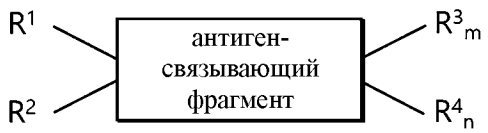
[0055] Фигура 26. Ki67-коложительные клетки подмышечного лимфатического узла (иммуногистохимическая оценка). По результатам гистопатологической и иммуногистохимической оценки на 29 день наблюдалось снижение количества клеток с положительной окраской антителами против Ki67 в герминативном центре подмышечных лимфатических узлов в группе, получавшей 10 и/или 30 мг/кг APB-A1.

[0056] Фигура 27. Концентрация APB-A1 в сыворотке в ФД исследовании. При ФК анализе наблюдалось практически пропорциональное дозе повышение значений Cmax и AUC0-t в группах, получавших 3 - 30 мг/кг APB-A1 при первом и втором введении дозы.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0057] Далее следует ссылка на подробное описание вариантов реализации, примеры которых проиллюстрированы в сопутствующих графических материалах, где одинаковые референсные числовые значения относятся к одинаковым элементам на протяжении всей заявки. В этом отношении варианты реализации настоящего изобретения могут иметь различные формы и не ограничиваются описанием, изложенным в настоящей заявке. Соответственно, ниже приведено описание вариантов реализации настоящего изобретения со ссылкой на фигуры исключительно для пояснения аспектов настоящего изобретения. При использовании в настоящей заявке термин «и/или» включает любые и все комбинации одного или более из связанных перечисленных элементов. Выражения, такие как «по меньшей мере один из», предшествующие перечню элементов, корректируют полный перечень указанных элементов и не корректируют отдельные элементы указанного перечня.

[0058] Согласно настоящему изобретению, предложены мультиспецифичные антитела, имеющие следующую структурную формулу:



где указанный антиген-связывающий фрагмент (Fab) представляет собой Fab антитела против сывороточного альбумина;

где R^1 и R^2 представляют собой биоактивные эффекторные фрагменты, связанные с N-концом Fab, где каждый из указанных фрагментов связан с вариабельным доменом тяжелой цепи или вариабельным доменом легкой цепи Fab;

где R^3 и R^4 представляют собой биоактивные эффекторные фрагменты, связанные с C-концом Fab, где каждый из указанных фрагментов связан с вариабельным доменом тяжелой цепи или вариабельным доменом легкой цепи Fab;

где m равен 0 или целому числу, составляющему 1 или более; и

где n равен 0 или целому числу, составляющему 1 или более.

[0059] Также предложены выделенные нуклеиновые кислоты (полинуклеотиды), такие как комплементарная ДНК (кДНК), кодирующая такие антитела. Дополнительно предложены векторы (например, векторы экспрессии) и клетки (например, клетки-хозяева), содержащие указанные нуклеиновые кислоты (полинуклеотиды), кодирующие такие антитела. Также предложены способы создания таких антител. Согласно другим аспектам настоящего изобретения, предложены способы получения и применения для индукции, повышения или усиления мультиспецифичной активности и лечения конкретных состояний, таких как аутоиммунные заболевания. Также предложены связанные композиции (например, фармацевтические композиции), наборы и способы выявления.

Терминология

[0060] При использовании в настоящей заявке термины «примерно» и «приблизительно» для преобразования численного значения или численного диапазона указывают на то, что отклонение на 5% - 10% вверх и на 5% - 10% вниз от указанного значения или диапазона остается в пределах подразумеваемого значения приведенного значения или диапазона.

[0061] При использовании в настоящей заявке термины «антитело» и «антитела» являются специальными терминами и могут использоваться взаимозаменяемо в настоящей заявке и относятся к молекуле, содержащей антиген-связывающий сайт, который специфично связывается с антигеном.

[0062] Антитела могут включать, например, моноклональные антитела, полученные рекомбинантным путем антитела, человеческие антитела, гуманизированные антитела, антитела с измененной поверхностью, гибридные антитела, иммуноглобулины, синтетические антитела, тетрамерные антитела, молекулы, содержащие две тяжелые цепи и две легкие цепи, мономер легкой цепи антитела, мономер тяжелой цепи антитела,

димер легкой цепи антитела, димер тяжелой цепи антитела, пару легкая цепь-тяжелая цепь антитела, интратела, антитела, представляющие собой гетероконъюгаты, однодоменные антитела, моновалентные антитела, одноцепочечные антитела или одноцепочечные Fv (scFv), камелизированные антитела, аффитела, Fab-фрагменты, $F(ab')_2$-фрагменты, связанные дисульфидными связями Fvs (sdFv), анти-идиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, анти-анти-Id антитела), биспецифичные антитела и мультиспецифичные антитела.

[0063] При использовании в настоящей заявке термины «мультиспецифичное антитело» и «мультиспецифичные антитела» являются специальными терминами и могут использоваться в отношении молекулы (молекул), содержащих более одного биоактивного эффекторного фрагмента или антиген-связывающего сайта, где каждый указанный антиген-связывающий сайт специфично связывается с антигеном. Мультиспецифичные антитела, описанные в настоящей заявке, могут содержать 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более связанных с ними биоактивных эффекторных фрагментов.

[0064] Антитела могут представлять собой любой тип (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY), любой класс (например, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1 или IgA_2) или любой подкласс (например, IgG_{2a} или IgG_{2b}) молекулы иммуноглобулина. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, антитела, описанные в настоящей заявке, представляют собой антитела IgG или их класс (например, человеческие IgG_1, IgG_2 или IgG_4) или подкласс. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, антитело представляет собой гуманизированное моноклональное антитело. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения, антитело представляет собой человеческое моноклональное антитело, например, которое представляет собой иммуноглобулин.

[0065] При использовании в настоящей заявке термины «биоэффекторный фрагмент», «антиген-связывающий домен», «антиген-связывающий участок», «антиген-связывающий сайт» и сходные термины относятся к частям молекул мультиспецифичных антител, которые содержат аминокислотные остатки, которые обеспечивают специфичность молекулы антитела в отношении антигена (например, определяющим комплементарность участкам (CDR)). Антиген-связывающий участок может происходить из любого вида животного, такого как грызуны (например, мышь, крыса или хомяк) и люди.

[0066] При использовании в настоящей заявке термины «вариабельный участок» или «вариабельный домен» используются взаимозаменяемо и являются общепринятыми в

данной области техники. Вариабельный участок, как правило, относится к части антитела, в целом, части легкой или тяжелой цепи, как правило, примерно к 110 - 120 аминокислотам на амино-конце в зрелой тяжелой цепи и примерно к 90 - 115 аминокислотам в зрелой легкой цепи, которые значительно различаются по последовательности между антителами и используются для связывания и обеспечения специфичности конкретного антитела в отношении его конкретного антигена. Вариабельность в последовательности сконцентрирована в участках, которые называются определяющими комплементарность участками (CDR), тогда как более высококонсервативные участки в вариабельном домене называются каркасными участками (FR). Без ограничения каким-либо конкретным механизмом или теорией, считается, что CDR легких и тяжелых цепей главным образом отвечают за взаимодействие и специфичность взаимодействия антитела с антигеном. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, вариабельный участок представляет собой человеческий вариабельный участок. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, вариабельный участок содержит CDR-участки грызунов или мышей и человеческие каркасные участки (FR). Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, вариабельный участок представляет собой вариабельный участок примата (например, не представляющего собой человека примата). Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, вариабельный участок содержит CDR-участки иммуноглобулина грызунов или мышей и каркасные участки (FR) иммуноглобулина примата (например, не представляющего собой человека примата).

[0067] Термины «VL» и «VL-домен» применяются взаимозаменяемо и относятся к вариабельному участку легкой цепи антитела.

[0068] Термины «VH» и «VH-домен» применяются взаимозаменяемо и относятся к вариабельному участку тяжелой цепи антитела.

[0069] Термин «нумерация Кэбата» и подобные термины признаны в данной области техники и относятся к системе нумерации аминокислотных остатков в вариабельных участках тяжелой и легкой цепи антитела или его антиген-связывающей части. Согласно конкретным аспектам, CDR антитела можно определять в соответствии с системой нумерации Кэбата (см., например, Kabat EA & Wu TT (1971) Ann NY Acad Sci 190: 382-391 and Kabat EA *et al.*, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). При использовании системы нумерации Кэбата CDR-участки в тяжелой цепи молекулы

антитела, как правило, присутствуют в положениях аминокислот от 31 до 35, которые необязательно могут включать одну или две дополнительные аминокислоты после 35 аминокислоты (называемые в системе нумерации Кэбата 35A и 35B) (CDR1), положениях аминокислот от 50 до 65 (CDR2) и положениях аминокислот от 95 до 102 (CDR3). При использовании системы нумерации Кэбата CDR-участки в легкой цепи молекулы антитела, как правило, присутствуют в положениях аминокислот от 24 до 34 (CDR1), положениях аминокислот от 50 до 56 (CDR2) и положениях аминокислот от 89 до 97 (CDR3). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, CDR-участки антител, описанных в настоящей заявке, были определены в соответствии со схемой нумерации Кэбата.

[0070] При использовании в настоящей заявке термин «константный участок» или «константный домен» являются взаимозаменяемыми и имеют общепринятое в данной области техники значение. Константный участок представляет собой часть антитела, например, карбокси-концевую часть легкой и/или тяжелой цепи, которая не вовлечена непосредственно в связывание антитела с антигеном, но которая может проявлять различные эффекторные функции, такие как взаимодействие с Fc-рецептором. Константный участок молекулы иммуноглобулина в целом имеет более консервативную аминокислотную последовательность по сравнению с вариабельным доменом иммуноглобулина.

[0071] При использовании в настоящей заявке термин «тяжелая цепь» со ссылкой на антитело может относиться к тяжелой цепи любого отдельного типа, например, альфа (α), дельта (δ), эпсилон (ε), гамма (γ) и мю (μ), на основе аминокислотной последовательности константного домена, где указанные типы дают начало классам антител IgA, IgD, IgE, IgG и IgM соответственно, включающим подклассы IgG, например, IgG_1, IgG_2, IgG_3 и IgG_4.

[0072] При использовании в настоящей заявке термин «легкая цепь» при использовании со ссылкой на антитело может относиться к легкой цепи любого отдельного типа, например, каппа (κ) или лямбда (λ), на основе аминокислотной последовательности константных доменов. Аминокислотные последовательности легких цепей хорошо известны в данной области техники. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, легкая цепь представляет собой легкую цепь иммуноглобулина человека.

[0073] «Аффинность связывания» в целом относится к суммарной силе нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антитела) и его

партнером связывания (например, антигеном). Если иное не указано, при использовании в настоящей заявке «аффинность связывания» относится к присущей молекулам аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами пары связывания (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X в отношении ее партнера Y может в целом быть выражена с помощью константы диссоциации (K_D). Аффинность можно измерить и/или выразить с помощью ряда способов, известных в данной области техники, включая, но не ограничиваясь указанными, константу равновесия процесса диссоциации (K_D) и константу равновесия процесса ассоциации (K_A). K_D рассчитывают из отношения k_{off}/k_{on}, тогда как K_A рассчитывают из отношения k_{on}/k_{off}. k_{on} относится к константе скорости ассоциации, например, антитела с антигеном, и k_{off} относится к диссоциации, например, антитела с антигеном. k_{on} и k_{off} можно определить с помощью методов, известных специалисту в данной области техники, таких как BIAcore® или KinExA.

[0074] При использовании в настоящей заявке «консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток замещается на аминокислотный остаток со сходной боковой цепью. Семейства аминокислотных остатков, содержащих боковые цепи, были определены в данной области техники. Указанные семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, один или более аминокислотных остатков в CDR-участке (участках) или в каркасном участке (участках) антитела могут быть замещены на аминокислотный остаток со сходной боковой цепью.

[0075] При использовании в настоящей заявке «эпитоп» представляет собой термин, принятый в данной области техники, и относится к локализованному участку антигена, с которым может специфично связываться антитело. Эпитоп может представлять собой, например, следующие друг за другом аминокислоты полипептида (линейный, или непрерывный эпитоп), или эпитоп может, например, объединяться из двух или более не следующих друг за другом участков полипептида или полипептидов (конформационный,

нелинейный эпитоп, эпитоп прерывистого типа, или не непрерывный эпитоп). Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, эпитоп, с которым связывается антитело, может быть определен с помощью, например, ЯМР-спектроскопии, исследований на основе рентгеноструктурной кристаллографии, ИФА-анализа, масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена (например, жидкостной хроматографии - масс-спектрометрии электрораспылением), матричных сканирующих анализов олигопептидов и/или картирования при мутагенеза (например, картирования при сайт-направленном мутагенезе). В случае рентгеноструктурной кристаллографии кристаллизацию можно проводить с использованием методов, известных в данной области техники (см., например, Giegé R *et al.,* (1994) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 50(Pt 4): 339-350; McPherson A (1990) Eur J Biochem 189: 1-23; Chayen NE (1997) Structure 5: 1269-1274; McPherson A (1976) J Biol Chem 251: 6300-6303). Кристаллы антитело:антиген можно изучать с использованием хорошо известных методов рентгенографии и их структуру можно уточнять с использованием компьютерной программы, такой как X-PLOR (Йельский Университет, 1992 г., поставляется компанией Molecular Simulations, Inc.; см., например, Meth Enzymol (1985), том 114 и 115, под ред. Wyckoff HW *et al.,*; патент США 2004/0014194) и BUSTER (Bricogne G (1993) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 49(Pt 1): 37-60; Bricogne G (1997) Meth Enzymol 276A: 361-423, ed Carter CW; Roversi P *et al.,* (2000) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 56(Pt 10): 1316-1323). Исследования по картированию при мутагенезе можно осуществлять с использованием способов, известных специалисту в данной области техники. Описание методов мутагенеза, включая методы аланин-сканирующего мутагенеза, см., например, в источниках Champe M *et al.,* (1995) J Biol Chem 270: 1388-1394, и Cunningham BC & Wells JA (1989) Science 244: 1081-1085. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, эпитоп антитела определяют с помощью исследований на основе аланин-сканирующего мутагенеза.

[0076] При использовании в настоящей заявке термины «иммуноспецифично связывается», «иммуноспецифично распознает», «специфично связывается» и «специфично распознает» являются аналогичными терминами при употреблении в отношении антител и относятся к молекулам, которые связываются с антигеном (например, эпитопом, иммунным комплексом или партнером связывания антиген-связывающего сайта) таким образом, как понятно специалисту в данной области техники. Например, молекула, которая специфично связывается с антигеном, может связываться с другими пептидами или полипептидами в целом с более низкой аффинностью по

результатам определения, например, с помощью иммуноанализов, инструмента BIAcore®, KinExA 3000 (Sapidyne Instruments, Boise, ID) или других анализов, известных в данной области техники. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, молекулы, которые иммуноспецифично связываются с антигеном, связываются с антигеном при K_A, которая по меньшей мере на 2 log, 2,5 log, 3 log, 4 log или больше превышает K_A при связывании указанной молекулы с другим антигеном.

[0077] Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения, молекулы, которые иммуноспецифично связываются с антигеном, не реагируют перекрестно с другими белками при сходных условиях связывания. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, молекулы, которые иммуноспецифично связываются с антигеном, не реагируют перекрестно с другими белками. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, предложено мультиспецифичное антитело, которое связывается со специфичным антигеном с более высокой аффинностью по сравнению с другим неродственным антигеном. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, предложено мультиспецифичное антитело, которое связывается с точно определенным антигеном (например, человеческим сывороточным альбумином) с аффинностью, превышающей на 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или более аффинность связывания с другим неродственным антигеном по результатам измерения, например, с помощью радиоиммуноанализа, поверхностного плазмонного резонанса или кинетического анализа исключения. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, степень связывания мультиспецифичного антитела, описанного в настоящей заявке, с неродственным белком составляет менее 10%, 15% или 20% от связывания антитела с точно определенным антигеном по результатам измерения с помощью, например, радиоиммуноанализа.

[0078] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, предложены мультиспецифичные антитела, которые связываются с человеческим антигеном с более высокой аффинностью по сравнению с антигенами других видов. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, предложены мультиспецифичные антитела, которые связываются с человеческим антигеном с аффинностью, превышающей на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% или более аффинность связывания с антигенами других видов, по результатам измерения с помощью, например, радиоиммуноанализа, поверхностного плазмонного резонанса или кинетического анализа исключения. Согласно некоторым

вариантам реализации настоящего изобретения, связывание мультиспецифичных антител, описанных в настоящей заявке, которые связываются с человеческим антигеном, с антигенными белками других видов составляет менее 10%, 15% или 20% от связывания указанного антитела с человеческим антигенным белком по результатам измерения с помощью, например, радиоиммуноанализа, поверхностного плазмонного резонанса или анализа кинетического исключения.

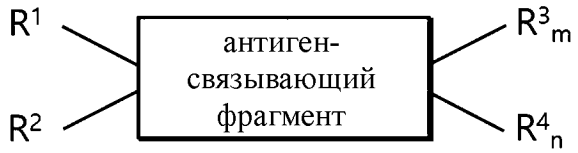
[0079] При использовании в настоящей заявке термин «клетка-хозяин» может представлять собой любой тип клетки, например, первичную клетку, клетку в культуре или клетку из клеточной линии. Согласно вариантам реализации настоящего изобретения, термин «клетка-хозяин» относится к клетке, трансфицированной молекулой нуклеиновой кислоты, и потомству или потенциальному потомству такой клетки. Потомство такой клетки не может быть идентичном исходной клетке, трансфицированной молекулой нуклеиновой кислоты, например, в связи с мутациями или воздействием окружающей среды, которые могут возникать в последующих поколениях, или интеграции молекулы нуклеиновой кислоты в геном клетки-хозяина.

[0080] При использовании в настоящей заявке термин «эффективное количество» в контексте введения терапевтического препарата субъекту относится к количеству указанного терапевтического препарата, которое приводит к достижению желаемого профилактического или терапевтического эффекта.

[0081] При использовании в настоящей заявке термины «субъект» и «пациент» являются взаимозаменяемыми. Субъект может представлять собой животное. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, субъект представляет собой млекопитающее, такое как не представляющее собой примата млекопитающее (например, корову, свинью, лошадь, кошку, собаку, крысу и т.д.) или представляющее собой примата млекопитающее (например, обезьяну или человека) или человека. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, субъект представляет собой макака-крабоеда. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, такие термины относятся к не представляющему собой человека животному (например, не представляющему собой человека животному, такому как свинья, лошадь, корова, кошка или собака). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, такие термины относятся к домашним или сельскохозяйственным животным. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, такие термины относятся к человеку.

Мультиспецифичные антитела

[0082] Согласно настоящему изобретению описаны мультиспецифичные антитела, имеющие следующую структурную формулу:



где указанный антиген-связывающий фрагмент (Fab) представляет собой Fab антитела против сывороточного альбумина;

где R^1 и R^2 представляют собой биоактивные эффекторные фрагменты, связанные с N-концом Fab, где каждый из указанных фрагментов связан с вариабельным доменом тяжелой цепи или вариабельным доменом легкой цепи Fab;

где R^3 и R^4 представляют собой биоактивные эффекторные фрагменты, связанные с C-концом Fab, где каждый из указанных фрагментов связан с вариабельным доменом тяжелой цепи или вариабельным доменом легкой цепи Fab;

где m равен 0 или целому числу, составляющему 1, 2, 3 или более; и

где n равен 0 или целому числу, составляющему 1, 2, 3 или более.

[0083] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, R^1 и R^2 представляют собой одинаковые или разные одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv) или одинаковые или разные Fv-фрагменты или стабилизированные дисульфидными связями Fv (dsFv)-фрагменты. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, R^3 и R^4 представляют собой одинаковые или разные scFv или Fv-фрагменты или dsFv-фрагменты.

[0084] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, каждый из R^1, R^2, R^3 и R^4 может быть связан с Fab с помощью одного или более линкеров. Каждый линкер может содержать, но не ограничивается указанными, от 1 до 20 аминокислот или любое количество или диапазон в указанном пределе, например 2, 3, 4 и т.д. Каждый линкер может содержать аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:4. Каждый линкер может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:4.

[0085] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, Fab содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий

(a) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SYGIS (SEQ ID NO:61), CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность WINTYSGGTKYAQKFQG (SEQ ID NO:62), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность LGHCQRGICSDALDT (SEQ ID NO:63);

(b) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SYGIS (SEQ ID NO:61), CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RINTYNGNTGYAQRLQG (SEQ ID NO:64), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность LGHCQRGICSDALDT (SEQ ID NO:63);

(c) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность NYGIH (SEQ ID NO:65), CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO:66), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность DVHYYGSGSYYNAFDI (SEQ ID NO:67);

(d) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SYAMS (SEQ ID NO:68), CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность VISHDGGFQYYADSVKG (SEQ ID NO:69), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AGWLRQYGMDV (SEQ ID NO:70);

(e) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AYWIA (SEQ ID NO:71), CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность MIWPPDADARYSPSFQG (SEQ ID NO:72), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность LYSGSYSP (SEQ ID NO:73); или

(f) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AYSMN (SEQ ID NO:74), CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SISSSGRYIHYADSVKG (SEQ ID NO:75), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность ETVMAGKALDY (SEQ ID NO:76).

[0086] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, Fab содержит вариабельный домен легкой цепи, содержащий

(g) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSISRYLN (SEQ ID NO:77),

CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASRLES (SEQ ID NO:78), и CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQSDSVPVT (SEQ ID NO:79);

(h) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSISSYLN (SEQ ID NO:80), CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AASSLQS (SEQ ID NO:81), и CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQSYSTPPYT (SEQ ID NO:82);

(i) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSIFNYVA (SEQ ID NO:83), CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность DASNRAT (SEQ ID NO:84), и CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQRSKWPPTWT (SEQ ID NO:85);

(j) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASETVSSRQLA (SEQ ID NO:86), CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASSRAT (SEQ ID NO:87), и CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQYGSSPRT (SEQ ID NO:88);

(k) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSVSSSSLA (SEQ ID NO:89), CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASSRAT (SEQ ID NO:87), и CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QKYSSYPLT (SEQ ID NO:90); или

(l) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSVGSNLA (SEQ ID NO:91), CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASTGAT (SEQ ID NO:92), и CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQYYSFLAKT (SEQ ID NO:93).

[0087] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, Fab содержит

определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AYSMN (SEQ ID NO:74), CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SISSSGRYIHYADSVKG (SEQ ID

NO:75), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность ETVMAGKALDY (SEQ ID NO:76), и

определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSVGSNLA (SEQ ID NO:91), CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASTGAT (SEQ ID NO:92), и CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQYYSFLAKT (SEQ ID NO:93) или любые комбинации CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, описанные выше.

[0088] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, Fab содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности SEQ ID NO:94, 95, 96, 97, 98 или 99.

[0089] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, Fab содержит вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности SEQ ID NO:100, 101, 102, 103, 104 или 105.

[0090] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, Fab содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности SEQ ID NO:94, 95, 96, 97, 98 или 99 и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности SEQ ID NO:100, 101, 102, 103, 104 или 105 соответственно, или любые комбинации вариабельного домена тяжелой цепи и вариабельного домена легкой цепи, описанных в настоящей заявке. Например, Fab может содержать вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную

по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности SEQ ID NO:99, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности SEQ ID NO:105.

[0091] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, Fab содержит домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности SEQ ID NO:45 (домен V_H-C_{H1}), и домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности SEQ ID NO:46 (домен V_L-C_L).

[0092] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, каждый из R^1, R^2, R^3 и R^4 может представлять собой биоактивный эффекторный фрагмент, такой как scFv антитела против CD40L hu5c8. Например, каждый из R^1, R^2, R^3 и R^4 может представлять собой scFv антитела против CD40L hu5c8, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности SEQ ID NO:47 или SEQ ID NO:48. Каждый из R^1, R^2, R^3 и R^4 может представлять собой scFv антитела против CD40L hu5c8, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47 или SEQ ID NO:48.

[0093] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, каждый из R^1 и R^2 может представлять собой биоактивный эффекторный фрагмент, такой как scFv антитела против CD40L hu5c8. Например, каждый из R^1 и R^2 может представлять собой scFv антитела против CD40L hu5c8, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на

90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности SEQ ID NO:47 или SEQ ID NO:48. Каждый из R^1 и R^2 может представлять собой scFv антитела против CD40L hu5c8, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47 или SEQ ID NO:48.

[0094] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, каждый из R^1, R^2, R^3 и R^4 представляет собой один или более биоактивных эффекторных фрагментов, содержащих, например, Fv против TNF-α, стабилизированный дисульфидной связью Fv (dsFv) против TNF-α, Fv против IL-23, dsFv против IL-23, антитело против IFNAR1 и/или dsFv против IFNAR1.

[0095] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, каждый из R^3 и R^4 представляет собой один или более биоактивных эффекторных фрагментов, содержащих, например, Fv против TNF-α, стабилизированный дисульфидной связью Fv (dsFv) против TNF-α, Fv против IL-23, dsFv против IL-23, антитело против IFNAR1 и/или dsFv против IFNAR1.

[0096] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, каждый из R^1, R^2, R^3 и R^4 может представлять собой один или более биоактивных эффекторных фрагментов, содержащих Fv против TNF-α, содержащий аминокислотную последовательность тяжелой цепи, идентичную по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности SEQ ID NO:49, и аминокислотную последовательность легкой цепи, идентичную по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности SEQ ID NO:50; стабилизированный дисульфидной связью Fv (dsFv) против TNF-α, содержащий аминокислотную последовательность тяжелой цепи, идентичную по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности SEQ ID NO:51, и аминокислотную последовательность легкой цепи, идентичную по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей

мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности SEQ ID NO:52; Fv против IL-23, содержащий аминокислотную последовательность тяжелой цепи, идентичную по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности SEQ ID NO:53, и аминокислотную последовательность легкой цепи, идентичную по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности SEQ ID NO:54; dsFv против IL-23, содержащий аминокислотную последовательность тяжелой цепи, идентичную по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности SEQ ID NO:55, и аминокислотную последовательность легкой цепи, идентичную по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности SEQ ID NO:56; антитело против IFNAR1, содержащее аминокислотную последовательность тяжелой цепи, идентичную по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности SEQ ID NO:57, и аминокислотную последовательность легкой цепи, идентичную по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности SEQ ID NO:58; и/или dsFv против IFNAR1, содержащий аминокислотную последовательность тяжелой цепи, идентичную по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности SEQ ID NO:59, и аминокислотную последовательность легкой цепи, идентичную по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей

мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности SEQ ID NO:60. Каждый из R^1, R^2, R^3 и R^4 может представлять собой один или более биоактивных эффекторных фрагментов, содержащих Fv против TNF-α, содержащий последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:49 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:50; стабилизированный дисульфидной связью Fv (dsFv) против TNF-α, содержащий последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:51 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:52; Fv против IL-23, содержащий последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:53 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:54; dsFv против IL-23, содержащий последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:55 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:56; антитело против IFNAR1, содержащее последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:57 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:58; и/или dsFv против IFNAR1, содержащий последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:59 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:60.

[0097] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, каждый из R^3 и R^4 может представлять собой один или более биоактивных эффекторных фрагментов, содержащих Fv против TNF-α, содержащий аминокислотную последовательность тяжелой цепи, идентичную по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности SEQ ID NO:49, и аминокислотную последовательность легкой цепи, идентичную по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности SEQ ID NO:50; стабилизированный дисульфидной связью Fv (dsFv) против TNF-α, содержащий аминокислотную последовательность тяжелой цепи, идентичную по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности SEQ ID NO:51, и аминокислотную последовательность легкой цепи, идентичную по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности SEQ ID NO:52; Fv против IL-23, содержащий аминокислотную последовательность тяжелой цепи,

идентичную по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности SEQ ID NO:53, и аминокислотную последовательность легкой цепи, идентичную по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности SEQ ID NO:54; dsFv против IL-23, содержащий аминокислотную последовательность тяжелой цепи, идентичную по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности SEQ ID NO:55, и аминокислотную последовательность легкой цепи, идентичную по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности SEQ ID NO:56; антитело против IFNAR1, содержащее аминокислотную последовательность тяжелой цепи, идентичную по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности SEQ ID NO:57, и аминокислотную последовательность легкой цепи, идентичную по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности SEQ ID NO:58; и/или dsFv против IFNAR1, содержащий аминокислотную последовательность тяжелой цепи, идентичную по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности SEQ ID NO:59, и аминокислотную последовательность легкой цепи, идентичную по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности SEQ ID NO:60.

Каждый из R^3 и R^4 может представлять собой один или более биоактивных эффекторных

фрагментов, содержащих Fv против TNF-α, содержащий последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:49 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:50; стабилизированный дисульфидной связью Fv (dsFv) против TNF-α, содержащий последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:51 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:52; Fv против IL-23, содержащий последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:53 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:54; dsFv против IL-23, содержащий последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:55 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:56; антитело против IFNAR1, содержащее последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:57 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:58; и/или dsFv против IFNAR1, содержащий последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:59 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:60.

[0098] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, мультиспецифичное антитело, описанное в настоящей заявке, содержит Fab против HSA (SL335), R^1 и R^2, каждый из которых представляет собой IgG против CD40L (руплизумаб), и R^3 и R^4, каждый из которых представляет собой IgG против TNF-α (адалимумаб) и/или Fab' против TNF-α (цертолизумаб). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, мультиспецифичное антитело, описанное в настоящей заявке, содержит Fab против HSA (SL335), R^1 и R^2, каждый из которых представляет собой scFv против CD40L (hu5c8), и каждый из m и n в R^3m и R^4n представляет собой 0.

[0099] Согласно конкретным аспектам, мультиспецифичное антитело, описанное в настоящей заявке, может быть описано только по его VL-домену или только по его VH-домену или только по его 3 CDR-участкам VL-домена или только по его 3 CDR-участкам VH-домена. См., например, источник Rader C *et al.*, (1998) PNAS 95: 8910-8915, полностью включенный в настоящую заявку посредством ссылки, который описывает процесс гуманизирования мышиного антитела против αvβ3 путем идентификации комплементарной легкой цепи или тяжелой цепи соответственно из библиотеки легких цепей или тяжелых цепей человеческих иммуноглобулинов с получением вариантов гуманизированного антитела, обладающих такой же высокой или более высокой аффинностью по сравнению с исходным антителом. См. также источник Clackson T *et al.*, (1991) Nature 352: 624-628, который полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки, в котором описаны способы получения антител, которые связываются со специфичным антигеном с помощью специфичного VL-домена (или VH-домена), и скрининга библиотеки для поиска комплементарных вариабельных доменов.

В результате скрининга было получено 14 новых партнеров для специфичного VH-домена и 13 новых партнеров для специфичного VL-домена, которые представляли собой сильные партнеры связывания по результатам анализа с помощью ИФА. См. также источник Kim SJ & Hong HJ, (2007) J Microbiol 45: 572-577, который полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки и в котором описаны методы получения антител, которые связываются со специфичным антигеном с помощью специфичного VH-домена, и скрининга библиотеки (например, библиотеки VL иммуноглобулина человека) для поиска комплементарных VL-доменов; выбранные VL-домены, в свою очередь, можно применять как руководство при выборе дополнительных комплементарных (например, человеческих) VH-доменов.

[0100] Согласно конкретным аспектам, CDR-участки антитела могут быть определены в соответствии с системой нумерации Чотиа, которая относится к расположению структурных петель иммуноглобулина (см., например, Chothia C & Lesk AM, (1987), J Mol Biol 196: 901-917; Al-Lazikani B *et al.*, (1997) J Mol Biol 273: 927-948; Chothia C *et al.*, (1992) J Mol Biol 227: 799-817; Tramontano A *et al.*, (1990) J Mol Biol 215(1): 175-82; и патент США №. 7 709 226). Как правило, при использовании правил нумерации Кэбата, петля CDR-H1 по нумерации Чотиа присутствует в аминокислотах 26 - 32, 33 или 34 тяжелой цепи, петля CDR-H2 по нумерации Чотиа присутствует в аминокислотах 52 - 56 тяжелой цепи, и петля CDR-H3 по нумерации Чотиа присутствует в аминокислотах 95 - 102 тяжелой цепи, тогда как петля CDR-L1 по нумерации Чотиа присутствует в аминокислотах 24 - 34 легкой цепи, петля CDR-L2 по нумерации Чотиа присутствует в аминокислотах 50 - 56 легкой цепи и петля CDR-L3 по нумерации Чотиа присутствует в аминокислотах 89 - 97 легкой цепи. Конец петли CDR-H1 по нумерации Чотиа при нумерации с использованием правил нумерации Кэбата варьирует между H32 и H34 в зависимости от длины петли (в связи с тем, что в соответствии с системой нумерации Кэбата в H35A и H35B внесены инсерции; если отсутствуют и 35A, и 35B, петля заканчивается на 32; если присутствует только 35A, петля заканчивается на 33; если присутствуют 35A и 35B, петля заканчивается на 34).

[0101] Согласно конкретным аспектам настоящего изобретения, предложены мультиспецифичные антитела, которые специфично связываются с сывороточным альбумином (например, человеческим сывороточным альбумином) и содержат в VL CDR-участки VL по нумерации Чотиа. Согласно конкретным аспектам настоящего изобретения, предложены антитела, которые специфично связываются с сывороточным альбумином (например, человеческим сывороточным альбумином) и содержат в VH

CDR-участки VH по нумерации Чотиа. Согласно конкретным аспектам настоящего изобретения, предложены антитела, которые специфично связываются с сывороточным альбумином (например, человеческим сывороточным альбумином) и содержат в VL CDR-участки VL по нумерации Чотиа и содержат в VH CDR-участки VH по нумерации Чотиа. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, антитела, которые специфично связываются с сывороточным альбумином (например, человеческим сывороточным альбумином), содержат один или более CDR, в котором CDR-участки по системе нумерации Чотиа и CDR-участки по системе нумерации Кэбата имеют одинаковую аминокислотную последовательность. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, предложены антитела, которые специфично связываются с сывороточным альбумином (например, человеческим сывороточным альбумином) и содержат комбинации CDR-участков по системе нумерации Кэбата и CDR-участков по системе нумерации Чотиа.

[0102] Согласно конкретным аспектам, CDR-участки антитела могут быть определены в соответствии с системой нумерации IMGT, как описано в источнике Lefranc M-P, (1999) The Immunologist 7: 132-136 и Lefranc M-P *et al.*, (1999) Nucleic Acids Res 27: 209-212. В соответствии со схемой нумерации IMGT, CDR1 VH находится в положениях 26 - 35, CDR2 VH находится в положениях 51 - 57, CDR3 VH находится в положениях 93 - 102, CDR1 VL находится в положениях 27 - 32, CDR2 VL находится в положениях 50 – 52, и CDR3 VL находится в положениях 89 - 97.

[0103] Согласно конкретным аспектам, CDR-участки антитела могут быть определены в соответствии с источником MacCallum RM *et al.*, (1996) J Mol Biol 262: 732-745. См. также, например, Martin A. “Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains,” *Antibody Engineering*, под ред. Kontermann and Dübel, Глава 31, с. 422-439, Springer-Verlag, Берлин (2001).

[0104] Согласно конкретным аспектам, CDR-участки антитела могут быть определены в соответствии со схемой нумерации AbM, которая относится к AbM-ипревариабельным участкам и обеспечивает компромисс между CDR-участками по системе нумерации Кэбата и структурными петлями по системе нумерации Чотиа и применяются программой моделирования антител AbM, Oxford Molecular (Oxford Molecular Group, Inc.).

[0105] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, положение одного или более CDR-участков в участке VH (например, CDR1, CDR2 или CDR3) и/или участке VL (например, CDR1, CDR2 или CDR3) антитела, описанного в настоящей

заявке, может варьировать по одному, двум, трем, четырем, пяти или шести положениям аминокислот, при условии что иммуноспецифичное связывание с антигеном сохраняется (например, по существу сохраняется, например, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%). Например, положение, определяющее CDR антитела, описанного в настоящей заявке, может варьировать в результате сдвига границы N-конца и/или C-конца CDR на одну, две, три, четыре, пять или шесть аминокислот по сравнению с положением CDR мультиспецифичного антитела, описанного в настоящей заявке, при условии что иммуноспецифичное связывание с антигеном (антигенами) сохраняется (например, по существу сохраняется, например, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%). Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения, длина одного или более CDR-участков в участке VH (например, CDR1, CDR2 или CDR3) и/или VL (например, CDR1, CDR2 или CDR3) антитела, описанного в настоящей заявке, может варьировать (например, быть короче или длиннее) на одну, две, три, четыре, пять, или более аминокислот, при условии что иммуноспецифичное связывание с антигеном (антигенами) сохраняется (например, по существу сохраняется, например, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%).

[0106] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, CDR1 VL, CDR2 VL, CDR3 VL, CDR1 VH, CDR2 VH и/или CDR3 VH, описанные в настоящей заявке, могут быть на одну, две, три, четыре, пять или более аминокислот короче чем один или более из CDR-участков, описанных в настоящей заявке, при условии что иммуноспецифичное связывание с антигеном (антигенами) сохраняется (например, по существу сохраняется, например, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%). Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения, CDR1 VL, CDR2 VL, CDR3 VL, CDR1 VH, CDR2 VH и/или CDR3 VH, описанные в настоящей заявке, могут быть на одну, две, три, четыре, пять или более аминокислот длиннее чем один или более из CDR-участков, описанных в настоящей заявке, при условии что иммуноспецифичное связывание с антигеном (антигенами) сохраняется (например, по существу сохраняется, например, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере ан 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%).

Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения, амино-конец CDR1 VL, CDR2 VL, CDR3 VL, CDR1 VH, CDR2 VH и/или CDR3 VH, описанных в настоящей заявке, может быть увеличен на одну, две, три, четыре, пять или более аминокислот по сравнению с одним или более из CDR-участков, описанных в настоящей заявке, при условии что иммуноспецифичное связывание с антигеном (антигенами) сохраняется (например, по существу сохраняется, например, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения, карбокси-конец CDR1 VL, CDR2 VL, CDR3 VL, CDR1 VH, CDR2 VH и/или CDR3 VH, описанных в настоящей заявке, может быть увеличен на одну, две, три, четыре, пять или более аминокислот по сравнению с одним или более из CDR-участков, описанных в настоящей заявке, при условии что иммуноспецифичное связывание с антигеном (антигенами) сохраняется (например, по существу сохраняется, например, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%). Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения, амино-конец CDR1 VL, CDR2 VL, CDR3 VL, CDR1 VH, CDR2 VH и/или CDR3 VH, описанных в настоящей заявке может быть укорочен на одну, две, три, четыре, пять или более аминокислот по сравнению с одним или более из CDR-участков, описанных в настоящей заявке, при условии что иммуноспецифичное связывание с антигеном (антигенами) сохраняется (например, по существу сохраняется, например, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, карбокси-конец CDR1 VL, CDR2 VL, CDR3 VL, CDR1 VH, CDR2 VH, и/или CDR3 VH, описанный в настоящей заявке, может быть укорочен на одну, две, три, четыре, пять или более аминокислот по сравнению с одном или более из CDR-участков, описанных в настоящей заявке, при условии что иммуноспецифичное связывание с антигеном (антигенами) сохраняется (например, по существу сохраняется, например, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%). Любой способ, известный в данной области техники, можно использовать для того, чтобы определить сохраняется ли иммуноспецифичное связывание с антигеном (антигенами), например, анализы связывания и условия, описанные в разделе «Примеры» в настоящей заявке.

[0107] Определение процентной идентичности между двумя последовательностями (например, аминокислотными последовательностями или последовательностями нуклеиновых кислот) также можно осуществлять с использованием математического алгоритма. Конкретный неограничивающий пример математического алгоритма, используемого для сравнения двух последовательностей, представляет собой алгоритм по Карлину и Альтшулю (Karlin S & Altschul SF (1990) PNAS 87: 2264-2268), модифицированный, как описано в источнике Karlin S & Altschul SF (1993) PNAS 90: 5873-5877. Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST по Altschul SF *et al.*, (1990) J Mol Biol 215: 403. Поиск нуклеотидов BLAST можно осуществлять с использованием установленных параметров для программы поиска нуклеотидов NBLAST, например, балл=100, длина слова=12, для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных молекулам нуклеиновой кислоты, описанным в настоящей заявке. Белковый поиск BLAST можно осуществлять с помощью установленных параметров для программы XBLAST, например, балл=50, длина слова=3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных молекуле белка, описанной в настоящей заявке. Для достижения выравнивания с пропусками в целях сравнения можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul SF *et al.*, (1997) Nuc Acids Res 25: 3389 3402. Альтернативно, PSI BLAST можно использовать для осуществления итерированного поиска, который выявляет отдаленные взаимоотношения между молекулами (*Id.*). При использовании программ BLAST, Gapped BLAST и PSI Blast можно использовать параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST) (см., например, базу данных Национального центра биотехнологической информации (National Center for Biotechnology Information, NCBI, всемирная сеть, ncbi.nlm.nih.gov). Другой конкретный неограничивающий пример математического алгоритма, используемого для сравнения последовательностей, представляет собой алгоритм по Майерсу и Миллеру (Myers and Miller, 1988, CABIOS 4:11 17). Такой алгоритм встроен в программу ALIGN (версия 2.0), которая является частью пакета программ для выравнивания последовательностей GCG. При использовании программы ALIGN для сравнения аминокислотных последовательностей можно использовать таблицу весов замен остатков PAM120, штраф за удлинение пропуска, составляющий 12, и штраф за пропуск, составляющий 4.

[0108] Процентную идентичность между двумя последовательностями можно определить с использованием методов, сходных с методами, описанными выше, с

разрешением или без разрешения пропусков. В расчете процентной идентичности, как правило, учитываются только точные совпадения.

[0109] Мультиспецифичное антитело можно сливать или конъюгировать (например, ковалентно или нековалентно связывать) с поддающейся выявлению меткой или веществом. Примеры поддающихся выявлению меток или веществ включают ферментативные метки, такие как, оксидаза глюкозы; радиоизотопы, такие как йод (^{125}I, ^{121}I), углерод (^{14}C), сера (^{35}S), тритий (^{3}H), индий (^{121}In) и технеций (^{99}Tc); люминесцентные метки, такие как люминол; и флуоресцентные метки, такие как флуоресцеин и родамин и биотин. Такие меченные антитела можно использовать для выявления антигенных белков.

[0110] В качестве примера, для подавления взаимодействия CD40-CD40L, которое представляет собой главный путь аутоиммунного заболевания или реакции отторжения трансплантата, было разработано моноклональное антитело, направленное на CD40 или CD40L, но дальнейшая его разработка была остановлена из-за возникновения побочного эффекта, такого как тромбоэмболия, вызванная Fc-участком антитела IgG1. Для устранения или снижения побочных эффектов было разработано рекомбинантное антитело (scFv антитела hu5c8)$_2$-SL335 (называемое APB-A1), полученное путем объединения Fab с scFv антитела против CD40L. SL335 представляет собой антиген-связывающий фрагмент (Fab), который обладает повышенной долгосрочной стабильностью *in vivo* в результате специфичного связывания с человеческим сывороточным альбумином. См. патент США №. 9 879 077, полностью включенный в настоящую заявку посредством ссылки.

[0111] Чтобы определить связывающую способность APB-A1 и его активность в подавлении тромбоэмболии, проводили оценку его связывающей способности и супрессорной активности на клетках. Аффинность связывания APB-A1 с HSA и rhCD40L идентифицировали с помощью бислойной интерферометрии, и результат показал, что наблюдалась тенденция к снижению констант диссоциации (KD) APB-A1 в отношении HSA и rhCD40L по сравнению с каждой контрольной группой. При оценке супрессорной активности на клетках при добавлении HSA не наблюдали значимого отличия в супрессорной активности IgG1 hu5c8, тогда как уровень супрессирующей связывание активности APB-A1 в отношении rhCD40L и клеток D1.1 был повышен примерно в 1,6 раз и 3 раза соответственно. Эти данные предполагают, что изменение размера, вызванное связыванием SL335 и HSA, приводит к уровню активности, сходному с уровнем группы положительного контроля. Другими словами,

супрессорная активность повышалась в присутствии HSA даже при более низкой аффинности, чем у IgG1 hu5c8.

[0112] Для того чтобы исследовать, устраняется ли побочный эффект, представляющий собой тромбоэмболию, в результате удаления Fc-участка IgG1, измеряли и анализировали скорость агрегации тромбоцитов и уровень секреции серотонина при введении APB-A1. Несмотря на то, что агрегация тромбоцитов не наблюдалась при добавлении иммунного комплекса (immune complex, IC), образованного APB-A1 и rhCD40L, даже при высокой концентрации, составляющей 400 нг/мл, реакция агрегации, которую идентифицировали по светопроводимости и скорости агрегации тромбоцитов, в ответ на IC IgG1 hu5c8 и rhCD40L инициировалась при относительно низкой концентрации, составляющей 60 нг/мл. При анализе уровня высвобождения серотонина в плотных агрегатах тромбоцитов было показано, что уровень высвобождения серотонина в ответ на IC APB-A1 был статистически значимо ниже по сравнению с IC IgG1 hu5c8. Этот результат предполагает, что антитело против CD40L согласно настоящему изобретению может эффективно устранять связанное с тромбоэмболией расстройство даже *in vivo*.

[0113] Для оценки времени полужизни APB-A1 проводили фармакокинетический анализ. APB-A1 вводили двум исследуемым группам макаков-крабоедов в дозе для каждого животного 5 мг/кг (группа 1) или 20 мг/кг (группа 2) путем однократной внутривенной инъекции. В результате, исходя из предположения, что у животных 2 групп наблюдалась одинаковая скорость почечного клиренса, было идентифицировано, что время полужизни *in vivo* в группе 2 составляло 9,59 ± 0,79 суток, что в 1,38 раза превышало время полужизни для группы 1, то есть, 6,94 ± 4,6 суток.

[0114] В другом примере для оценки иммунного ответа на антитело IgG против TT, вызванного при инъекции столбнячного анатоксина (TT), проводили фармакодинамический анализ. В качестве исследуемых животных использовали макаков-крабоедов, APB-A1 вводили двум исследуемым группам макаков-крабоедов в дозе 5 мг/кг (группа 1) или 20 мг/кг (группа 2) посредством одной внутривенной инъекции. В результате при внутривенном введении APB-A1 в высокой концентрации (20 мг/кг) супрессорная активность в отношении иммунного ответа, опосредованного антителами IgG, была намного выше, чем при введении DXT в качестве группы положительного контроля, и эта супрессорная активность поддерживалась до 30-40 дней. Кроме того, взаимодействие CD40-CD40L также контролируется B-клетками памяти, и значительную супрессорную эффективность APB-A1 идентифицировали на 27 день

после бустерного введения ТТ (на 20 день). Таким образом, было подтверждено, что APB-A1 согласно настоящему изобретению приводило к значительному улучшению связанного с тромбоэмболией расстройства по сравнению с IgG1 hu5c8.

[0115] Согласно другим вариантам реализации изобретения, новые биспецифичные антитела, называемые APB-B1a и APB-B1b соответственно, были получены путем связывания одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv) против CD154 (лиганд CD40; CD40L) (V_H-[пептидный линкер]-V_L) и вариабельного фрагмента (Fv) или стабилизированного дисульфидными связями Fv (dsFv) против фактора некроза опухоли-альфа (анти-TNF-α). В эксперименте с использованием биослойной интерферометрии (БСИ) было подтверждено, что APB-B1 обладает способностью одновременно связываться с тремя мишенями, то есть рекомбинантным человеческим белком CD40L, рекомбинантным человеческим белком TNF-α и человеческим сывороточным альбумином (HSA), с уровнем антиген-связывающей аффинности, сходным с IgG против CD40L или исходным антителом Fab' против TNF-α.

[0116] Согласно другим связанным вариантам реализации настоящего изобретения, температура плавления (Tm), измеренная в условиях свободного от вспомогательных веществ буфера, составляла 62°C, независимо от присутствия или отсутствия межцепочечной дисульфидной связи в Fv против TNF-α, что подтверждает то, что межцепочечная дисульфидная связь не вносит вклад в структурную стабильность.

[0117] Согласно другим связанным вариантам реализации изобретения, клеточный анализ *in vitro* показал, что способность APB-B1 ингибировать CD40L была сходной с исходным антителом IgG против CD40L1, и способность ингибировать TNF-α была слабо снижена по сравнению с исходным антителом Fab' против TNF-α. Тем не менее, APB-B1 продемонстрировало ингибирующую активность в отношении обоих из CD40L и TNF-α и более высокую ингибирующую активность по сравнению с каждым из исходных антител, IgG против CD40L1 и Fab' против TNF-α.

Получение антитела

[0118] Мультиспецифичные антитела, описанные в настоящей заявке, могут быть получены с помощью любого метода синтеза антител, известного в данной области техники, например, с помощью химического синтеза или с помощью методов рекомбинантной экспрессии. В способах, описанных в настоящей заявке, если иное не указано, используются стандартные методы в области молекулярной биологии, микробиологии, генетического анализа, рекомбинантной ДНК, органической химии,

биохимии, ПЦР, синтеза и модификации олигонуклеотидов, гибридизации нуклеиновых кислот и связанных областях в пределах уровня знаний специалиста в данной области техники. Указанные методы описаны, например, в ссылках, цитированных в настоящей заявке, и полностью разъясняются в литературе. См., например, Maniatis T *et al.*, (1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J *et al.*, (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, второе издание, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J *et al.*, (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel FM *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987 и ежегодные обновления); Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (1987 и ежегодные обновления) Gait (ред.) (1984) Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; Eckstein (ред.) (1991) Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, IRL Press; Birren B *et al.*, (ред.) (1999) Genome Analysis: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

[0119] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, мультиспецифичное антитело, описанное в настоящей заявке, представляет собой антитело (например, рекомбинантное антитело), полученное, экспрессированное, созданное или выделенные с помощью любого способа, включающего создание, например, посредством синтеза, генной инженерии последовательностей ДНК. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, такое антитело содержит последовательности (например, последовательности ДНК или аминокислотные последовательности), которые не существуют в природе в пределах зародышевого репертуара антител животного или млекопитающего (например, человека) *in vivo*.

[0120] Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения, предложен способ создания мультиспецифичного антитела, описанного в настоящей заявке, включающий культивирование клетки или клетки-хозяина, описанной в настоящей заявке. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения, предложен способ создания мультиспецифичного антитела, включающий экспрессию (например, рекомбинантную экспрессию) антитела с использованием клетки или клетки-хозяина, описанной в настоящей заявке (например, клетки или клетки-хозяина, содержащей полинуклеотиды, кодирующие антитело, описанное в настоящей заявке). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, клетка представляет собой выделенную клетку. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, в клетку были введены экзогенные полинуклеотиды. Согласно некоторым вариантам реализации

настоящего изобретения, способ также включает этап очистки антитела, полученного из клетки или клетки-хозяина.

[0121] Методы получения поликлональных антител известны в данной области техники (см., например, Главу 11 в источнике Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 5-е издание, Ausubel FM *et al.*, ред., John Wiley and Sons, Нью-Йорк).

[0122] Мультиспецифичные антитела могут быть получены с использованием широкого разнообразия методов, известных в данной области техники, включая применение гибридомы, рекомбинантных методов и технологий фагового дисплея или их комбинации. Например, моноклональные антитела могут быть получены с использованием гибридомных методов, включая методы, известные в данной области техники и изложенные, например, в следующих источниках: Harlow E & Lane D, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2-е издание, 1988); Hammerling GJ *et al.*, Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563 681 (Elsevier, Нью-Йорк, 1981). Термин «моноклональное антитело» при использовании в настоящей заявке не ограничивается антителами, полученными с помощью гибридомной технологии. Например, моноклональные антитела могут быть получены рекомбинантным путем из клеток-хозяев, экзогенно экспрессирующих антитело, описанное в настоящей заявке.

[0123] «Моноклональное антитело» при использовании в настоящей заявке представляет собой антитело, продуцированное одной клеткой (например, гибридомой или клеткой-хозяином, продуцирующей рекомбинантное антитело), где указанное антитело иммуноспецифично связывается с антигеном (например, человеческим сывороточным альбумином) по результатам определения, например, с помощью ИФА или другого анализа связывания антигена или конкурентного связывания, известного в данной области техники или описанного в Примерах, предложенных в настоящей заявке. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, моноклональное антитело может представлять собой гибридное антитело или гуманизированное антитело. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, моноклональное антитело представляет собой моновалентное антитело или поливалентное (например, бивалентное) антитело. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, моноклональное антитело может представлять собой Fab-фрагмент или $F(ab')_2$-фрагмент. Моноклональные антитела, описанные в настоящей заявке, могут, например, быть созданы с помощью гибридомного метода, как описано в источнике Kohler G & Milstein C (1975) Nature 256: 495, или могут, например,

быть выделены из фаговых библиотек с использованием методов, описанных в настоящей заявке, например. Другие способы получения клональных клеточных линий и моноклональных антител, экспрессированных таким образом, хорошо известны в данной области техники (см., например, Главу 11 в источнике: Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 5-е издание, Ausubel FM *et al.*, выше).

[0124] Способы получения и скрининга специфичных антител с использованием гибридомной технологии являются стандартными и хорошо известны в данной области техники. Например, в соответствии с гибридомным методом мышь или другое подходящее животное-хозяин, такое как овца, коза, кролик, крыса, хомяк или макак, иммунизируют для стимуляции лимфоцитов, продуцирующих или способных продуцировать антитела, которые специфично связываются с антигеном (например, человеческим сывороточным альбумином), используемым для иммунизации. Альтернативно, лимфоциты можно иммунизировать *in vitro*. Лимфоциты затем сливают с клетками миеломы с использованием подходящих агентов для слияния, таких как полиэтиленгликоль, для образования гибридомной клетки (Goding JW (ред.), Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)). Кроме того, можно использовать метод RIMMS (метод повторной иммунизации в нескольких участках) для иммунизации животного (Kilpatrick KE *et al.*, (1997) Hybridoma 16:381-9, полностью включенный посредством ссылки).

[0125] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, мышей (или других животных, таких как крысы, обезьяны, ослы, свиньи, овцы, хомяк или собаки) можно иммунизировать антигеном (например, человеческим сывороточным альбумином) и сразу после выявления иммунного ответа, например, выявления в мышиной сыворотке антител, специфичных в отношении указанного антигена, извлекать мышиную селезенку и выделять спленоциты. Спленоциты затем сливают с помощью хорошо известных методов с любыми подходящими клетками миеломы, например, клетками из клеточной линии SP20, доступной из Американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection, ATCC®, Манассас, Вирджиния) для образования гибридом. Гибридомы выбирают и клонируют путем лимитирующего разведения. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, собирают лимфатические узлы иммунизированных мышей и их клетки сливают с клетками миеломы NS0.

[0126] Гибридомные клетки, полученные таким образом, высевают и растят в подходящей культуральной среде, которая может содержать одно или более веществ,

подавляющих рост или выживаемость исходных не слитых клеток миеломы. Например, если у исходных клеток миеломы отсутствует фермент гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансфераза (HGPRT, или HPRT), культуральная среда для гибридом, как правило, включают гипоксантин, аминоптерин и тимидин (среда HAT), где указанные вещества предотвращают рост клеток с недостаточностью HGPRT.

[0127] Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, используют клетки миеломы, которые эффективно сливаются, поддерживают стабильную продукцию антитела на высоком уровне в выбранных клетках, продуцирующих указанное антитело, и являются чувствительными к среде, такой как среда HAT. Среди указанных клеточных линий миелом есть мышиные линии миеломы, такие как клеточная линия NS0, или линии, происходящие из мышиных опухолей MOPC-21 и MPC-11, доступные из Центра распределения клеток Института Солка (Salk Institute Cell Distribution Center, Сан Диего, Калифорния, США), и клетки SP-2 или X63-Ag8,653, доступные из Американской коллекции типовых культур, Роквилл, Мэриленд, США. Для клеточных линий миеломы человека и гетеромиелом мыши-человека также была описана продукция человеческих моноклональных антител (Kozbor D (1984) J Immunol 133: 3001-5; Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

[0128] Культуральную среду, в которой растут гибридомные клетки, анализировали для оценки продукции моноклональных антител, направленных против антигена. Специфичность связывания моноклональных антител, продуцированных гибридомными клетками, определяли с помощью способов, известных в данной области техники, например, иммунопреципитации, или с помощью анализа связывания *in vitro*, такого как радиоиммуноанализ (РИА) или иммуноферментный анализ (ИФА).

[0129] После идентификации гибридомных клеток, которые продуцируют антитела, обладающие желаемой специфичностью, аффинностью и/или активностью, клоны можно субклонировать с помощью метода предельного разведения и растить с помощью стандартных методов (Goding JW (ред.), Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, выше). Подходящие культуральные среды для этой цели включают, например, среды D-MEM или RPMI 1640. Кроме того, гибридомные клетки можно растить *in vivo* в виде асцитных опухолей у животных.

[0130] Моноклональные антитела, секретированные субклонами, подходящим образом отделяют от культуральной среды, асцитной жидкости или сыворотки с помощью стандартных процедур очистки иммуноглобулинов, таких как, например, хроматография

на сорбенте белок А:сефароза, хроматография на гидроксиапатите, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография.

[0131] Антитела, описанные в настоящей заявке, можно создавать с помощью любого метода, известного специалистам в данной области техники. Например, фрагменты Fab и $F(ab')_2$, описанные в настоящей заявке, могут быть получены путем протеолитического расщепления молекул иммуноглобулинов с использованием ферментов, таких как папаин (для получения Fab-фрагментов) или пепсин (для получения $F(ab')_2$-фрагментов). Fab-фрагмент соответствует одному из двух идентичных фрагментов тетрамерной молекулы антитела и содержит полноразмерную легкую цепь, спаренную с VH- и CH1-доменами тяжелой цепи. $F(ab')_2$-фрагмент содержит два антиген-связывающих фрагмента тетрамерной молекулы антитела, связанных с помощью дисульфидных связей в шарнирном участке.

[0132] Кроме того, антитела, описанные в настоящей заявке, также можно создавать с использованием различных методов фагового дисплея, известных в данной области техники. В методах фагового дисплея белки экспонируются на поверхности фаговых частиц, которые содержат кодирующие их полинуклеотидные последовательности. В частности, последовательности ДНК, кодирующие VH- и VL-домены, амплифицируют из библиотек кДНК животных (например, библиотек человеческой или мышиной кДНК из поврежденных тканей). Осуществляют рекомбинацию ДНК, кодирующей VH- и VL-домены, вместе с линкером scFv с помощью ПЦР и клонируют в фагмидный вектор. Вектор вводят в *E. coli* с помощью электропорации и указанную *E. coli* инфицируют хелперным фагом. Фаг, используемый в указанных способах, как правило, представляет собой нитевидный фаг, включая fd и M13, и VH- и VL-домены, как правило, сливают рекомбинантным путем либо с геном фага III, либо с геном фага VIII. Фаг, экспрессирующий антитело, которое связывается с конкретным антигеном, может быть выбран или идентифицирован с помощью антигена, например, с использованием меченного антигена или антигена, присоединенного или захваченного на твердой поверхности или грануле. Примеры методов фагового дисплея, которые можно использовать для создания антител, описанных в настоящей заявке, включают методы, описанные в следующих источниках: Brinkman U *et al.,* (1995) J Immunol Methods 182: 41-50; Ames RS *et al.,* (1995) J Immunol Methods 184: 177-186; Kettleborough CA *et al.,* (1994) Eur J Immunol 24: 952-958; Persic L *et al.,* (1997) Gene 187: 9-18; Burton DR & Barbas CF (1994) Advan Immunol 57: 191-280; PCT/GB91/001134; международные публикации WO90/02809, WO91/10737, WO92/01047, WO92/18619, WO93/11236,

WO95/15982, WO95/20401 и WO97/13844; и патенты США № 5 698 426, 5 223 409, 5 403 484, 5 580 717, 5 427 908, 5 750 753, 5 821 047, 5 571 698, 5 427 908, 5 516 637, 5 780 225, 5 658 727, 5 733 743 и 5 969 108.

[0133] Как описано в приведенных выше ссылках, после фаговой селекции кодирующие антитело участки можно выделять из фага и применять для создания антител, включая человеческие антитела, и экспрессировать в любом желаемом хозяине, включая клетки млекопитающих, клетки насекомых, клетки растений, дрожжи и бактерии, например, как описано ниже. Технологии рекомбинантной продукции антител, таких как Fab-, Fab'- и $F(ab')_2$-фрагменты, также можно использовать с помощью методов, известных в данной области техники, таких как методы, описанные в международной публикации WO92/22324; источниках Mullinax RL *et al.*, (1992) BioTechniques 12(6): 864-9; Sawai H *et al.*, (1995) Am J Reprod Immunol 34: 26-34; и Better M *et al.*, (1988) Science 240: 1041-1043.

[0134] Согласно некоторым аспектам, для создания антител можно использовать ПЦР-праймеры, содержащие нуклеотидные последовательности VH или VL, сайт рестрикции и фланкирующую последовательность для защиты указанного сайта рестрикции, для амплификации последовательностей VH или VL с матрицы, например, scFv-клонов. С использованием методов клонирования, известных специалистам в данной области техники, можно клонировать амплифицированные с помощью ПЦР VH-домены в векторы, экспрессирующие константный участок VH, и амплифицированные с помощью ПЦР VL-домены можно клонировать в векторы, экспрессирующие константный участок VL, например, константные участки каппа- или лямбда-цепи человеческого иммуноглобулина. VH- и VL-домены также можно клонировать в один вектор, экспрессирующий необходимые константные участки. Векторы конверсии тяжелой цепи и векторы конверсии легкой цепи затем котрансфицируют в клеточные линии для создания стабильных или временных клеточных линий, которые экспрессируют антитела, например, IgG, с использованием методов, известных специалистам в данной области техники.

[0135] Гибридное антитело представляет собой молекулу, в которой различные части антитела происходят из различных молекул иммуноглобулинов. Например, гибридное антитело может содержать вариабельный участок мышиного или крысиного моноклонального антитела, слитый с константным участком человеческого антитела. Способы получения гибридных антител известны в данной области техники. См., например, Morrison SL (1985) Science 229: 1202-7; Oi VT & Morrison SL (1986)

BioTechniques 4: 214-221; Gillies SD *et al.,* (1989) J Immunol Methods 125: 191-202; и патенты США № 5 807 715, 4 816 567, 4 816 397 и 6 331 415.

[0136] Гуманизированное антитело способно связываться с заранее определенным антигеном, который содержит каркасный участок, имеющий по существу аминокислотную последовательность человеческого иммуноглобулина, и CDR, имеющий по существу аминокислотную последовательность нечеловеческого иммуноглобулина (например, мышиного иммуноглобулина). Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, гуманизированное антитело также содержит по меньшей мере часть константного участка иммуноглобулина (Fc), как правило, часть константного участка человеческого иммуноглобулина. Антитело также может содержать участок CH1, шарнирную область, участки CH2, CH3 и CH4 тяжелой цепи. Гуманизированное антитело может быть выбрано из любого класса иммуноглобулинов, включая IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и любого изотипа, включая IgG_1, IgG_2, IgG_3 и IgG_4. Гуманизированные антитела могут быть получены с использованием различных методов, известных в данной области техники, включая, но не ограничиваясь указанными, прививку CDR (европейский патент EP 239400; международная заявка WO91/09967 и патенты США № 5 225 539, 5 530 101 и 5 585 089), венирование или изменение поверхности антитела (европейские патенты EP 592106 и EP 519596; Padlan EA (1991) Mol Immunol 28(4/5): 489-498; Studnicka GM *et al.,* (1994) Prot Engineering 7(6): 805-814; и Roguska MA *et al.,* (1994) PNAS 91: 969-973), метод перестановки цепей (патент США № 5 565 332) и методы, описанные, например, в патентах США № 6 407 213, 5 766 886, международной заявке WO93/17105; Tan P *et al.,* (2002) J Immunol 169: 1119-25; Caldas C *et al.,* (2000) Protein Eng. 13(5): 353-60; Morea V *et al.,* (2000) Methods 20(3): 267-79; Baca M *et al.,* (1997) J Biol Chem 272(16): 10678-84; Roguska MA *et al.,* (1996) Protein Eng 9(10): 895 904; Couto JR *et al.,* (1995) Cancer Res. 55 (23 Supp): 5973s-5977s; Couto JR *et al.,* (1995) Cancer Res 55(8): 1717-22; Sandhu JS (1994) Gene 150(2): 409-10, и Pedersen JT *et al.,* (1994) J Mol Biol 235(3): 959-73. См. также патент США 2005/0042664 A1 (24 февраля 2005 г.), который полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки.

[0137] Однодоменные антитела, например, антитела без легких цепей, могут быть получены с помощью методов, хорошо известных в данной области техники. См. Riechmann L & Muyldermans S (1999) J Immunol 231: 25-38; Nuttall SD *et al.,* (2000) Curr Pharm Biotechnol 1(3): 253-263; Muyldermans S, (2001) J Biotechnol 74(4): 277-302; патент

США № 6 005 079; и международные публикации WO94/04678, WO94/25591 и WO01/44301.

[0138] Кроме того, антитела, которые иммуноспецифично связываются с антигеном, могут, в свою очередь, применяться для создания антиидиотипических антител, которые «имитируют» антиген, с использованием методов, хорошо известных специалисту в данной области техники. (См., например, Greenspan NS & Bona CA (1989) FASEB J 7(5): 437-444; и Nissinoff A (1991) J Immunol 147(8): 2429-2438).

[0139] Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, мультиспецифичное антитело, описанное в настоящей заявке, которое связывается с тем же эпитопом интересующего антигена (например, человеческим сывороточным альбумином), что и антитело, описанное в настоящей заявке, представляет собой человеческое антитело. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, антитело, описанное в настоящей заявке, которое конкурентно блокирует (например, дозозависимым образом) связывание любого из антител, описанных в настоящей заявке, с сывороточным альбумином (например, человеческим сывороточным альбумином), представляет собой человеческое антитело. Человеческие антитела могут быть получены с использованием метода, известного в данной области техники. Например, можно использовать трансгенных мышей, которые неспособны экспрессировать функциональные эндогенные иммуноглобулины, но способны экспрессировать гены человеческого иммуноглобулина. В частности, комплексы генов тяжелой и легкой цепи человеческого иммуноглобулина можно вводить рандомно или путем гомологичной рекомбинации в мышиные эмбриональные стволовые клетки. Альтернативно, вариабельный участок, константный участок и участок разнообразия человеческого иммуноглобулина можно вводить в мышиные эмбриональные стволовые клетки помимо генов тяжелой и легкой цепи человеческого иммуноглобулина. Гены тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина мыши могут утрачивать функциональность отдельно или одновременно с введением локусов человеческого иммуноглобулина путем гомологичной рекомбинации. В частности, гомозиготная делеция J_H-участка предотвращает эндогенную продукцию антитела. Модифицированные эмбриональные стволовые клетки размножают и осуществляют микроинъекцию в бластоцисты для получения гибридных мышей. Гибридных мышей затем скрещивают для получения гомозиготного потомства, которое экспрессирует человеческие антитела. Трансгенных мышей иммунизируют обычным образом выбранным антигеном, например, полноразмерным или частью антигена. Моноклональные антитела, направленные

против антигена, могут быть получены из иммунизированных трансгенных мышей с помощью стандартной гибридомной технологии. Трансгены человеческого иммуноглобулина, содержащиеся в трансгенных мышах, подвергаются перегруппировке во время дифференцировки В-клеток и затем подвергаются переключению классов и соматической мутации. Таким образом, с использованием такого метода, возможно получить терапевтически применимые антитела IgG, IgA, IgM и IgE. Обзор данной технологии для получения человеческих антител см. в источнике Lonberg N & Huszar D (1995) Int Rev Immunol 13:65-93. Подробное обсуждение данной технологии для получения человеческих антител и человеческих моноклональных антител и протоколов для получения таких антител, см., например, в международных публикациях WO98/24893, WO96/34096 и WO96/33735 и патентах США № 5 413 923, 5 625 126, 5 633 425, 5 569 825, 5 661 016, 5 545 806, 5 814 318 и 5 939 598. Примеры мышей, способных продуцировать человеческие антитела, включают Xenomouse™ (Abgenix, Inc.; патенты США № 6 075 181 и 6 150 184), HuAb-Mouse™ (Mederex, Inc./Gen Pharm; патенты США № 5 545 806 и 5 569 825), Trans Chromo Mouse™ (Kirin) и KM Mouse™ (Medarex/Kirin).

[0140] Человеческие антитела, которые специфично связываются с антигеном, могут быть получены с помощью различных методов, известных в данной области техники, включая методы фагового дисплея, описанные выше, с использованием библиотек антител, полученных из человеческих последовательностей иммуноглобулина. См. также патенты США № 4 444 887, 4 716 111 и 5 885 793 и международные публикации WO98/46645, WO98/50433, WO98/24893, WO98/16654, WO96/34096, WO96/33735 и WO91/10741.

[0141] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, человеческие антитела могут быть получены с использованием гибридом мышь-человек. Например, лимфоциты периферической крови человека, трансформированные вирусом Эпштейна-Барра (ВЭБ), можно сливать с клетками миеломы мыши для получения гибридом мышь-человек, секретирующих человеческие моноклональные антитела, и указанные гибридомы мышь-человек можно подвергать скринингу для определения гибридом, секретирующих человеческие моноклональные антитела, которые иммуноспецифично связываются с антигеном-мишенью. Такие способы известны и описаны в данной области техники, см., например, Shinmoto H *et al.,* (2004) Cytotechnology 46: 19-23; Naganawa Y *et al.,* (2005) Human Antibodies 14: 27-31.

Полинуклеотиды, векторы и клетки

[0142] Согласно конкретным аспектам настоящего изобретения, предложены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, описанное в настоящей заявке, или его фрагмент (например, вариабельный участок легкой цепи и/или вариабельный участок тяжелой цепи), который иммуноспецифично связывается с антигеном, и векторы, например, векторы, содержащие такие полинуклеотиды для рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах (например, *E. coli* и клетках млекопитающих). Согласно настоящему изобретению, предложены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие любые из антител, предложенных в настоящей заявке, в также векторы, содержащие такие полинуклеотидные последовательности, например, векторы экспрессии, для их эффективной экспрессии в клетках-хозяевах, например, клетках млекопитающих.

[0143] При использовании в настоящей заявке «выделенный» полинуклеотид или молекула нуклеиновой кислоты представляет собой полинуклеотид или молекулу нуклеиновой кислоты, отделенную от других молекул нуклеиновой кислоты, которые присутствуют в естественном источнике указанной молекулы нуклеиновой кислоты (например, в теле мыши или человека). Более того, «выделенная» молекула нуклеиновой кислоты, такая как молекула кДНК, может по существу не содержать другой клеточный материал или культуральную среду при получении с помощью рекомбинантных методов или по существу не содержать химических предшественников или других химических веществ при химическом синтезе. Например, фраза «по существу свободный от» включает препараты полинуклеотида или молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие менее чем примерно 15%, 10%, 5%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% (в частности, менее чем примерно 10%) другого материала, например, клеточного материала, культуральной среды, других молекул нуклеиновой кислоты, химических предшественников и/или других химических веществ. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, молекула (молекулы) нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело, описанное в настоящей заявке, является выделенной или очищенной.

[0144] Согласно конкретным аспектам настоящего изобретения, предложены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие антитела, которые иммуноспецифично связываются с антигенным полипептидом (например, человеческим сывороточным альбумином) и содержат аминокислотную последовательность, как описано в настоящей заявке, а также антитела, которые конкурируют с такими антителами за связывание с антигенным полипептидом

(например, дозозависимым образом) или которые связываются с тем же эпитопом, что и указанные антитела.

[0145] Согласно конкретным аспектам настоящего изобретения, предложены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь или тяжелую цепь антитела, описанного в настоящей заявке. Полинуклеотиды могут содержать нуклеотидные последовательности, кодирующие легкую цепь, содержащую FR-участки и CDR-участки VL антител, описанных в настоящей заявке. Полинуклеотиды могут содержать нуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелую цепь, содержащую FR-участки и CDR-участки VH антител, описанных в настоящей заявке.

[0146] Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, предложены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую мультиспецифичное антитело, содержащее Fab, содержащий три CDR-участка VL-цепи, например, содержащие CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL антитела против человеческого сывороточного альбумина, описанного в настоящей заявке, и три CDR-участка VH-цепи, например, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH антитела против человеческого сывороточного альбумина, описанного в настоящей заявке.

[0147] Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, предложены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую мультиспецифичное антитело или его фрагмент, содержащий VL-домен.

[0148] Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, полинуклеотид, описанный в настоящей заявке, содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую мультиспецифичное антитело, предложенное в настоящей заявке, содержащее вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, описанную в настоящей заявке (например, SEQ ID NO:46), где указанное антитело иммуноспецифично связывается с сывороточным альбумином (например, человеческим сывороточным альбумином).

[0149] Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, полинуклеотид, описанный в настоящей заявке, содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, предложенное в настоящей заявке, содержащее вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, описанную в настоящей заявке (например, SEQ ID NO:45), где

указанное антитело иммуноспецифично связывается с сывороточным альбумином (например, человеческим сывороточным альбумином).

[0150] Согласно конкретным аспектам настоящего изобретения, предложен полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, содержащее легкую цепь и тяжелую цепь, например, отдельно легкую цепь и тяжелую цепь. В отношении легкой цепи, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, полинуклеотид, предложенный в настоящей заявке, содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую каппа-цепь. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения, полинуклеотид, предложенный в настоящей заявке, содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую лямбда-цепь. Согласно другим вариантам реализации изобретения, полинуклеотид, предложенный в настоящей заявке, содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, описанное в настоящей заявке, содержащее легкую каппа-цепь или легкую лямбда-цепь человеческого иммуноглобулина. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, полинуклеотид, предложенный в настоящей заявке, содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, которое иммуноспецифично связывается с сывороточным альбумином (например, человеческим сывороточным альбумином), где указанное антитело содержит легкую цепь и где аминокислотная последовательность VL-домена может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:46, и где константный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность константного участка легкой каппа-цепи человеческого иммуноглобулина. Например, последовательности человеческого константного участка могут представлять собой последовательности, описанные в патенте США № 5693 780.

[0151] Также, согласно настоящему изобретению, предложены полинуклеотиды, кодирующие мультиспецифичное антитело или его фрагмент, который является оптимизированным, например, путем оптимизации кодона/РНК, замещения на гетерологичные сигнальные последовательности и устранения элементов нестабильности мРНК. Способы создания оптимизированных нуклеиновых кислот, кодирующих мультиспецифичное антитело или его фрагмент (например, легкую цепь, тяжелую цепь, VH-домен или VL-домен) для рекомбинантной экспрессии путем введения изменений кодона и/или устранения ингибиторных участков в иРНК можно осуществлять путем адаптации способов оптимизации, описанных, например, в патентах США № 5 965 726; 6 174 666; 6 291 664; 6 414 132 и 6 794 498 соответственно.

Например, можно осуществлять мутирование потенциальных сайтов сплайсинга и элементов нестабильности (например, A/T или A/U-богатые элементы) в пределах РНК без изменения аминокислот, закодированных последовательностями нуклеиновых кислот, для повышения стабильности РНК для рекомбинантной экспрессии. При изменениях пользуются вырожденностью генетического кода, например, с использованием альтернативного кодона для идентичной аминокислоты. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, может быть желательным изменять один или более кодонов для кодирования консервативной мутации, например, сходной аминокислоты с химической структурой и свойствами и/или функцией, сходной с исходной аминокислотой.

[0152] Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, оптимизированная полинуклеотдная последовательность, кодирующая мультиспецифичное антитело, описанное в настоящей заявке, или его фрагмент (например, VL-домен или VH-домен) может гибридизоваться с антисмысловым (например, комплементарным) полинуклеотидом неоптимизированной полинуклеотидной последовательности, кодирующей мультиспецифичное антитело, описанное в настоящей заявке, или его фрагмент (например, VL-домен или VH-домен). Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, оптимизированная нуклеотидная последовательность, кодирующая мультиспецифичное антитело, описанное в настоящей заявке, или его фрагмент, гибридизуется в условиях высокой жесткости с антисмысловым полинуклеотидом неоптимизированной полинуклеотидной последовательности, кодирующей мультиспецифичное антитело, описанное в настоящей заявке, или его фрагмент. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, оптимизированная нуклеотидная последовательность, кодирующая мультиспецифичное антитело, описанное в настоящей заявке, или его фрагмент, гибридизуется в условиях гибридизации высокой, средней или пониженной жесткости с антисмысловым полинуклеотидом неоптимизированной нуклеотидной последовательности, кодирующей мультиспецифичное антитело, описанное в настоящей заявке, или его фрагмент. Для получения информации по условиям гибридизации см., например, патент США 2005/0048549 (например, параграфы 72-73), который включен в настоящую заявку посредством ссылки.

[0153] Получать полинуклеотиды и определять нуклеотидную последовательность указанных полинуклеотидов можно с помощью любого метода, известного в данной области техники. Нуклеотидные последовательности, кодирующие антитела, описанные

в настоящей заявке, и модифицированные версии указанных антител, можно определять с использованием методов, хорошо известных в данной области техники, то есть нуклеотидные кодоны, которые, как известно, кодируют конкретные аминокислоты, собирают таким образом, чтобы создать нуклеиновую кислоту, которая кодирует антитело. Такой полинуклеотид, кодирующий антитело, может быть собран из синтезированных химическим путем олигонуклеотидов (например, как описано в источнике Kutmeier G *et al.,* (1994), BioTechniques 17: 242-246), что, вкратце, включает синтез перекрывающихся олигонуклеотидов, содержащих части последовательности, кодирующей антитело, выравнивание и лигирование указанных олигонуклеотидов и затем амплификации лигированных олигонуклеотидов с помощью ПЦР.

[0154] Альтернативно, полинуклеотид, кодирующий антитело или его фрагмент, описанный в настоящей заявке, может быть создан из нуклеиновой кислоты из подходящего источника (например, гибридомы) с использованием методов, хорошо известных в данной области техники (например, ПЦР и других методов молекулярного клонирования). Например, амплификацию с помощью ПЦР с использованием синтетических праймеров, гибридизуемых с 3'- и 5'-концами известных последовательностей, можно проводить с использованием геномной ДНК, полученной из гибридомных клеток, продуцирующих интересующее антитело. Такие способы амплификации с помощью ПЦР можно использовать для получения нуклеиновых кислот, содержащих последовательность, кодирующую легкую цепь и/или тяжелую цепь антитела. Такие способы амплификации с помощью ПЦР можно использовать для получения нуклеиновых кислот, содержащих последовательность, кодирующую вариабельный участок легкой цепи и/или вариабельный участок тяжелой цепи антитела. Амплифицированные нуклеиновые кислоты можно клонировать в векторы для экспрессии в клетках-хозяевах и для дополнительного клонирования, например, для создания гибридных и гуманизированных антител.

[0155] Если клон, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую конкретное антитело или его фрагмент, не доступен, но последовательность молекулы антитела или его фрагмента известна, нуклеиновую кислоту, кодирующую иммуноглобулин или фрагмент, можно синтезировать химическим путем или получать из подходящего источника (например, кДНК-библиотеки антител или созданной на ее основе кДНК-библиотеки, или нуклеиновой кислоты, такой как поли A+ РНК, выделенной из любой ткани или клеток, экспрессирующих антитело, таких как выбранные гибридомные клетки, экспрессирующие антитело, описанное в настоящей заявке) посредством

амплификации с помощью ПЦР с использованием синтетических праймеров, гибридизуемых с 3'- и 5'-концами последовательности, или путем клонирования с использованием олигонуклеотидного зонда, специфичного для последовательности конкретного гена, для идентификации, например, клона кДНК из библиотеки кДНК, кодирующей антитело. Амплифицированные нуклеиновые кислоты, созданные с помощью ПЦР, затем можно клонировать в реплицируемые клонирующие векторы клонирования с использованием методов, хорошо известных в данной области техники.

[0156] ДНК, кодирующую мультиспецифичные антитела, описанные в настоящей заявке, можно с легкостью выделять и секвенировать с использованием стандартных процедур (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны связываться специфично с генами, кодирующими тяжелую и легкую цепи мультиспецифичных антител). Гибридомные клетки могут служить в качестве источника такой ДНК. Сразу после выделения ДНК можно помещать в векторы экспрессии, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, клетки обезьян COS, клетки яичника китайского хомячка (CHO) (например, клетки CHO из системы CHO GS System™ (Lonza)) или клетки миеломы, которые в других случаях не продуцируют белок иммуноглобулин, для обеспечения синтеза мультиспецифичных антител в рекомбинантных клетках-хозяевах.

[0157] Для создания антител можно использовать праймеры для ПЦР, содержащие нуклеотидные последовательности VH или VL, сайт рестрикции и фланкирующую последовательность для защиты сайта рестрикции, для амплификации последовательностей VH или VL в клонах scFv. С использованием методов клонирования, известных специалистам в данной области техники, амплифицированные с помощью ПЦР VH-домены можно клонировать в векторы, экспрессирующие константный участок тяжелой цепи, например, константный участок человеческого иммуноглобулина гамма 4, и амплифицированные с помощью ПЦР VL-домены можно клонировать в векторы, экспрессирующие константный участок легкой цепи, например, константный участок легкой каппа- или лямбда-цепи иммуноглобулина человека. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, векторы для экспрессии VH или VL-доменов содержат промотор EF-1α, сигнал секреции, сайт клонирования для вариабельного домена, константных доменов и селекционный маркер, такой как неомицин. VH и VL-домены также можно клонировать в один вектор, экспрессирующий необходимые константные участки. Векторы конверсии тяжелой цепи и векторы конверсии легкой цепи затем котрансфицируют в клеточные линии для

создания стабильных или временных клеточных линий, которые экспрессируют полноразмерные антитела, например, IgG, с использованием методов, известных специалистам в данной области техники.

[0158] ДНК также можно модифицировать, например, путем замещения кодирующей последовательности на константные домены тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина человека вместо мышиных последовательностей или путем ковалентного присоединения к кодирующей иммуноглобулин последовательности всей или части последовательности, кодирующей полипептид, не представляющий собой иммуноглобулин.

[0159] Также предложены полинуклеотиды, которые гибридизуются в условиях высокой, средней и пониженной жесткости гибридизации с полинуклеотидами, которые кодируют антитело, описанное в настоящей заявке. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, полинуклеотиды, описанные в настоящей заявке, гибридизуются в условиях высокой, средней или пониженной жесткости гибридизации с полинуклеотидами, кодирующими VH-домен и/или VL-домен, предложенными в настоящей заявке.

[0160] Условия гибридизации были описаны в данной области техники и известны специалисту в данной области техники. Например, гибридизация в жестких условиях может включать гибридизацию со связанной с фильтром ДНК в 6-кратном растворе хлорид натрия/цитрат натрия (SSC) при температуре примерно 45°C с последующей одной или более промывками в растворе 0,2xSSC/0,1% ДСН при температуре примерно 50-65°C; гибридизация в высоко жестких условиях может включать гибридизацию со связанной с фильтром нуклеиновой кислотой в растворе 6xSSC при температуре примерно 45°C с последующей одной или более промывками в растворе 0,1xSSC/0,2% ДСН при температуре примерно 68°C. Гибридизация при других условиях жесткости известна специалистам в данной области техники и описана, см., например, Ausubel FM *et al.*, ред., (1989) Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc., John Wiley & Sons, Inc., Нью-Йорк, стр. 6.3.1-6.3.6 и 2.10.3.

[0161] Дополнительно, согласно настоящему изобретению, описаны векторы экспрессии, содержащие:

(a) промотор,

(b) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антиген-связывающий фрагмент (Fab), который связывается с сывороточным альбумином, и

(c) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую биоактивный эффекторный фрагмент и линкер,

где указанный промотор, первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая молекул нуклеиновой кислоты функционально связаны. Вторая молекула нуклеиновой кислоты может кодировать 2, 3, 4, 5, 6 или более биоактивных эффекторных фрагментов и линкеров.

[0162] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую Fab, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий

(a) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SYGIS (SEQ ID NO:61),

CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность WINTYSGGTKYAQKFQG (SEQ ID NO:62), и

CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность LGHCQRGICSDALDT (SEQ ID NO:63);

(b) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SYGIS (SEQ ID NO:61),

CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RINTYNGNTGYAQRLQG (SEQ ID NO:64), и

CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность LGHCQRGICSDALDT (SEQ ID NO:63);

(c) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность NYGIH (SEQ ID NO:65),

CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO:66), и

CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность DVHYYGSGSYYNAFDI (SEQ ID NO:67);

(d) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SYAMS (SEQ ID NO:68),

CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность VISHDGGFQYYADSVKG (SEQ ID NO:69), и

CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AGWLRQYGMDV (SEQ ID NO:70);

(e) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AYWIA (SEQ ID NO:71),

CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность MIWPPDADARYSPSFQG (SEQ ID NO:72), и

CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность LYSGSYSP (SEQ ID NO:73); или

(f) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AYSMN (SEQ ID NO:74),

CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SISSSGRYIHYADSVKG (SEQ ID NO:75), и

CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность ETVMAGKALDY (SEQ ID NO:76).

[0163] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую Fab, содержащий вариабельный домен легкой цепи, содержащий

(g) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSISRYLN (SEQ ID NO:77),

CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASRLES (SEQ ID NO:78), и

CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQSDSVPVT (SEQ ID NO:79);

(h) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSISSYLN (SEQ ID NO:80),

CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AASSLQS (SEQ ID NO:81), и

CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQSYSTPPYT (SEQ ID NO:82);

(i) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSIFNYVA (SEQ ID NO:83),

CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность DASNRAT (SEQ ID NO:84), и

CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQRSKWPPTWT (SEQ ID NO:85);

(j) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASETVSSRQLA (SEQ ID NO:86),

CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASSRAT (SEQ ID NO:87), и

CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQYGSSPRT (SEQ ID NO:88);

(k) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSVSSSSLA (SEQ ID NO:89),

CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASSRAT (SEQ ID NO:87), и

CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QKYSSYPLT (SEQ ID NO:90); или

(l) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSVGSNLA (SEQ ID NO:91),

CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASTGAT (SEQ ID NO:92), и

CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQYYSFLAKT (SEQ ID NO:93).

[0164] Например, первая молекула нуклеиновой кислоты может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую Fab, содержащий: вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий (a), выше, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий (g), выше; вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий (b), выше, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий (h), выше; вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий (c), выше, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий (i), выше; вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий (d), выше, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий (j), выше; вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий (e), выше, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий (k), выше; вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий (f), выше, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий (l), выше; или любую комбинацию вариабельного домена

тяжелой цепи, выше, и вариабельного домена легкой цепи, выше. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую Fab (SL335), содержащий

определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AYSMN (SEQ ID NO:74), CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SISSSGRYIHYADSVKG (SEQ ID NO:75), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность ETVMAGKALDY (SEQ ID NO:76), и

определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSVGSNLA (SEQ ID NO:91), CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASTGAT (SEQ ID NO:92), и CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQYYSFLAKT (SEQ ID NO:93).

[0165] Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения, первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую Fab, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности SEQ ID NO:94, 95, 96, 97, 98 или 99.

[0166] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую Fab, содержащий вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности SEQ ID NO:100, 101, 102, 103, 104 или 105.

[0167] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую Fab, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80%, по

меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности SEQ ID NO:94, 95, 96, 97, 98 или 99 и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности SEQ ID NO:100, 101, 102, 103, 104 или 105 соответственно.

[0168] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую Fab (SL335), содержащий домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45 (домен V_H-C_{H1}) и домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:46 (домен V_L-C_L).

[0169] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, биоактивные эффекторные фрагменты представляют собой Fv против TNF-α, dsFv против TNF-α, Fv против IL-23, dsFv против IL-23, Fv против IFNAR1 и/или dsFv против IFNAR1. Например, вторая молекула нуклеиновой кислоты может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% одной или более из последовательностей SEQ ID NO: 49-60. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, вторая молекула нуклеиновой кислоты может содержать нуклеотидную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% одной или более из последовательностей SEQ ID NO:6-15, 39 и 40.

[0170] Согласно конкретным аспектам настоящего изобретения, предложены клетки (например, клетки-хозяева), экспрессирующие (например, рекомбинантно) мультиспецифичные антитела, описанные в настоящей заявке, которые специфично связываются с сывороточным альбумином (например, человеческим сывороточный альбумин) и связанные полинуклеотиды и векторы экспрессии. Согласно настоящему

изобретению, предложены векторы (например, векторы экспрессии), содержащие полинуклеотиды, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие мультиспецифичные антитела или фрагмент, для рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах, таких как клетки млекопитающих. Также, согласно настоящему изобретению, предложены клетки-хозяева, содержащие такие векторы для рекомбинантной экспрессии мультиспецифичных антител, описанных в настоящей заявке (например, человеческого или гуманизированного антитела). Также, согласно настоящему изобретению, предложены способы получения антитела, описанного в настоящей заявке, включающие экспрессию такого антитела в клетке-хозяине.

[0171] Рекомбинантная экспрессия специфично связывающегося антитела или его фрагмента, описанного в настоящей заявке (например, тяжелой или легкой цепи антитела, описанного в настоящей заявке), включает конструирование вектора экспрессии, содержащего полинуклеотид, который кодирует антитело или фрагмент. Как только получен полинуклеотид, кодирующий антитело или его фрагмент (например, вариабельные домены тяжелой или легкой цепи), описанный в настоящей заявке, можно получать вектор для продукции молекулы антитела с помощью технологии рекомбинантной ДНК с использованием методов, хорошо известных в данной области техники. Таким образом, способы получения белка с помощью экспрессии полинуклеотида, содержащего нуклеотидные последовательности, кодирующие антитело или фрагмент антитела (например, легкую цепь или тяжелую цепь), описаны в настоящей заявке. Способы, которые хорошо известны специалисту в данной области техники, можно использовать для конструирования векторов экспрессии, содержащих антитело или фрагмент антитела (например, легкую цепь или тяжелую цепь), кодирующих последовательности и подходящие сигналы контроля транскрипции и трансляции. Указанные способы включат, например, *in vitro* методы рекомбинантной ДНК, синтетические методы и генетическую рекомбинацию *in vivo*. Также предложены реплицируемые векторы, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу антитела, описанного в настоящей заявке, тяжелую или легкую цепь антитела, вариабельный домен тяжелой или легкой цепи антитела или его фрагмент или CDR тяжелой или легкой цепи, функционально связанный с промотором. Такие векторы могут, например, содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую константный участок молекулы антитела (см., например, международные публикации WO86/05807 и WO89/01036 и патент США №. 5,122,464), и вариабельные домены

антитела можно клонировать в такой вектор для экспрессии полноразмерной тяжелой цепи, полноразмерной легкой цепи или полноразмерных тяжелой и легкой цепи.

[0172] Вектор экспрессии можно переносить в клетку (например, клетку-хозяин) с помощью стандартных методов и полученные в результате клетки затем можно культивировать с помощью стандартных методов с получением антитела, описанного в настоящей заявке.

[0173] Различные системы экспрессии хозяин-вектор можно применять для экспрессии описанных молекул антител. Такие системы экспрессии в клетке-хозяине представляют собой носители, с помощью которых интересующие кодирующие последовательности могут быть получены и затем очищены, а также клетки, которые могут при трансформации или трансфекции подходящим нуклеотидом, кодирующим последовательности, экспрессировать молекулу антитела, описанного в настоящей заявке, *in situ*. Они включают, но не ограничиваются указанными, микроорганизмы, такие как бактерии (например, *E. coli* и *B. subtilis*), трансформированные векторами экспрессии на основе рекомбинантной ДНК бактериофага, плазмидной ДНК или космидной ДНК, содержащей кодирующие антитело последовательности; дрожжи (например, *Saccharomyces Pichia*), трансформированные рекомбинантными векторами для экспрессии в дрожжах, содержащими кодирующие антитело последовательности; системы на основе клеток насекомых, инфицированных рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, бакуловирусом), содержащими кодирующие антитело последовательности; системы на основе растительных клеток (например, зеленых водорослей, такие как *Chlamydomonas reinhardtii*), инфицированных рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, вирусом мозаики цветной капусты, CaMV; вирусом табачной мозаики, TMV) или трансформированные рекомбинантными плазмидными векторами экспрессии (например, плазмидой Ti), содержащими кодирующие антитело последовательности; или системы на основе клеток млекопитающих (например, клеток COS (например, COS1 или COS), CHO, BHK, MDCK, HEK 293, NS0, PER.C6, VERO, CRL7O3O, HsS78Bst, HeLa и NIH 3T3, HEK-293T, HepG2, SP210, R1,1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20 и BMT10), содержащие конструкции рекомбинантной экспрессии, содержащие промоторы, происходящие из генома клеток млекопитающего (например, промотор металлотионеина) или из вирусов млекопитающих (например, позднего промотора аденовируса; промотора вируса коровьей оспы 7.5K). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, клетки для экспрессии антител, описанных в настоящей заявке (например,

антитела, содержащего CDR-участки любого из антител pab1949 или pab2044) представляют собой клетки CHO, например, клетки CHO из CHO GS System™ (Lonza). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, клетки для экспрессии антител, описанных в настоящей заявке, представляют собой клетки человека, например, человеческие клеточные линии. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, вектор для экспрессии в клетках млекопитающих представляет собой pOptiVEC™ или pcDNA3.3. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, бактериальные клетки, такие как *Escherichia coli*, или эукариотические клетки (например, клетки млекопитающих), применяются для экспрессии молекулы рекомбинантного антитела, особенно для экспрессии полноразмерной молекулы рекомбинантного антитела. Например, клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомячка (CHO), вместе с вектором, таким как главный промежуточный промоторный элемент раннего гена цитомегаловируса человека, представляют собой эффективную систему экспрессии антител (Foecking MK & Hofstetter H (1986) Gene 45: 101-105; и Cockett MI *et al.*, (1990) Biotechnology 8: 662-667). Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, антитела, описанные в настоящей заявке, продуцируются клетками CHO или NS0. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, экспрессия нуклеотидных последовательностей, кодирующих антитела, описанные в настоящей заявке, регулируется с помощью конститутивного промотора, индуцибельного промотора или тканеспецифичного промотора.

[0174] В бактериальных системах ряд векторов экспрессии можно предпочтительно выбирать в зависимости от применения, для которого предназначена молекула антитела, которую экспрессируют. Например, когда необходимо продуцировать большое количество такого антитела, для создания фармацевтических композиций молекулы антитела могут быть желательными векторы, которые направлены на экспрессию на высоком уровне продуктов, представляющих собой белки слияния, которые могут быть легко очищены. Такие векторы включают, но не ограничиваются указанными, вектор экспрессии в *E. coli* pUR278 (Ruether U & Mueller-Hill B (1983) EMBO J 2: 1791-1794), в котором кодирующая антитело последовательность может быть отдельно лигирована в вектор в рамке считывания с кодирующим lac Z участком таким образом, чтобы продуцировался белок слияния; векторы pIN векторы (Inouye S & Inouye M (1985) Nuc Acids Res 13: 3101-3109; Van Heeke G & Schuster SM (1989) J Biol Chem 24: 5503-5509); и т.д. Например, векторы pGEX также можно применять для экспрессии чужеродных

полипептидов в виде белков слияния с глутатион-5-трансферазой (GST). В целом, такие белки слияния растворимы и могут легко быть очищены из лизированных клеток путем адсорбции и связывания с матриксными гранулами на основе глутатионагарозы с последующей элюированием в присутствии свободного глутатиона. Векторы pGEX сконструированы таким, что содержат сайты расщепления протеазами тромбином или фактором Ха таким образом, чтобы продукт клонированного гена-мишени мог быть высвобожден из фрагмента GST.

[0175] В системе на основе клеток насекомых вирус ядерного полиэдроза *Autographa californica* (AcNPV), например, можно использовать в качестве вектора для экспрессии чужеродных генов. Вирус выращивают в клетках *Spodoptera frugiperda*. Кодирующую антитело последовательность можно клонировать отдельно в не существенные участки (например, ген полиэдрина) вируса и помещать под контроль промотора AcNPV (например, промотора полиэрдина).

[0176] В клетках млекопитающих-хозяевах можно применять ряд систем экспрессии на основе вирусов. В случаях, когда в качестве вектора экспрессии используется аденовирус, интересующую кодирующую антитело последовательность можно лигировать с аденовирусным комплексом контроля транскрипции/трансляции, например, поздним промотором и трехкомпонентной лидерной последовательностью. Указанный гибридный ген можно затем встраивать в геном аденовируса с помощью *in vitro* или *in vivo* рекомбинации. Инсерция в несущественный участок вирусного генома (например, участок El или E3) будет приводить к получению рекомбинантного вируса, который жизнеспособен и может экспрессировать молекулу антитела в инфицированных хозяевах (например, см. Logan J & Shenk T (1984) PNAS 81: 3655-3659). Специфичные сигналы инициации также могут требоваться для эффективной трансляции встроенных кодирующих антитело последовательностей. Указанные сигналы включают кодон инициации ATG и прилежащие последовательности. Более того, кодон инициации должен совпадать по фазе с рамкой считывания желаемой кодирующей последовательности для обеспечения трансляции целой вставки. Указанные экзогенные сигналы контроля трансляции и кодоны инициации могут быть различной природы и являться как природными, так и синтетическими. Эффективность экспрессии можно усиливать путем включения подходящих энхансерных транскрипционных элементов, терминаторов транскрипции и т.д. (см., например, Bitter G *et al.*, (1987) Methods Enzymol 153: 516-544).

[0177] Кроме того, может быть выбран штамм клетки-хозяина, который модулирует экспрессию встроенных последовательностей или обеспечивает модификацию и процессинг генного продукта конкретным желаемым образом. Такие модификации (например, гликозилирование) и процессинг (например, расщепление) белковых продуктов, может быть важным для функции белка. Различные клетки-хозяева имеют характерные и специфичные механизмы для посттрансляционного процессинга и модификации белков и генных продуктов. Подходящие клеточные линии или системы хозяина могут быть выбраны для обеспечения правильной модификации и процессинга экспрессированного чужеродного белка. Для этого можно применять эукариотические клетки-хозяева, которые обладают клеточным аппаратом для соответствующего процессинга первичного транскрипта, гликозилирования и фосфорилирования генного продукта. Такие клетки млекопитающих-хозяева включают, но не ограничиваются указанными, клетки CHO, VERO, BHK, Hela, MDCK, HEK 293, NIH 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT2O и T47D, NS0 (мышиная клеточная линия миеломы, которая не обладает эндогенной продукцией каких-либо цепей иммуноглобулина), CRL7O3O, COS (например, COS1 или COS), PER.C6, VERO, HsS78Bst, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20, BMT10 и HsS78Bst. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, мультиспецифичные антитела, описанные в настоящей заявке (например, антитело, содержащее CDR-участки), продуцируются в клетках млекопитающих, таких как клетки CHO.

[0178] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, антитела, описанные в настоящей заявке, имеют пониженное содержание фукозы или не содержат фукозу. Такие антитела могут быть получены с использованием методов, известных специалисту в данной области техники. Например, антитела можно экспрессировать в клетках с недостаточностью или отсутствием способности к фукозилированию. В конкретном примере, клеточные линии с нокаутом обеих аллелей α1,6-фукозилтрансферазы можно использовать для продукции антител со сниженным содержанием фукозы. Система Potelligent® (Lonza) представляет собой пример такой системы, которую можно использовать для продукции антител со сниженным содержанием фукозы.

[0179] Для долгосрочной продукции с высоким выходом рекомбинантных белков можно создавать клетки со стабильной экспрессией. Например, могут быть сконструированы клеточные линии, которые стабильно экспрессируют мультиспецифичные антитела. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего

изобретения, клетка, предложенная в настоящей заявке, стабильно экспрессирует легкую цепь/вариабельный домен легкой цепи и тяжелую цепь/вариабельный домен тяжелой цепи, которые ассоциируют с образованием антитела, описанного в настоящей заявке (например, антитела, содержащего CDR-участки).

[0180] Согласно конкретным аспектам, вместо использования векторов экспрессии, которые содержат вирусные ориджины репликации, можно трансформировать клетки-хозяева ДНК, которая контролируется подходящими элементами контроля экспрессии (например, промоторными и энхансерными последовательностями, терминаторами транскрипции, сайтами полиаденилирования и т.д.), и селективным маркером. После введения чужеродной ДНК/полинуклеотида созданным клеточным конструкциям можно позволять расти в течение 1-2 дней в обогащенной среде и затем переводить их на селективную среду. Селективный маркер в рекомбинантной плазмиде обеспечивает устойчивость в ходе селекции и позволяет клеткам стабильно встраивать плазмиду в хромосомы и расти с образованием очагов, которые, в свою очередь, можно клонировать и размножать в клеточные линии. Этот способ может предпочтительно применяться для создания клеточных линий, которые экспрессируют мультиспецифичное антитело, описанное в настоящей заявке, или его фрагмент. Такие сконструированные клеточные линии могут быть, в частности, полезны для скрининга и оценки композиций, которые взаимодействуют прямо или непрямо с молекулой антитела.

[0181] Можно использовать ряд селекционных систем, включая, но не ограничиваясь указанными, гены тимидинкиназы вируса простого герпеса (Wigler M *et al.*, (1977) Cell 11(1): 223-232), гипоксантингуанифосфорибозилтрансферазы (Szybalska EH & Szybalski W (1962) PNAS 48(12): 2026-2034) и аденинфосфорибозилтрансферазы (Lowy I *et al.*, (1980) Cell 22(3): 817-823), которые можно использовать в tk-, hgprt- или aprt-клетках соответственно. Также устойчивость к антиметаболитам можно использовать как основу для селекции для следующих генов: *dhfr*, которые придает устойчивость к метотрексату (Wigler M *et al.*, (1980) PNAS 77(6): 3567-3570; O'Hare K *et al.*, (1981) PNAS 78: 1527-1531); *gpt*, который придает устойчивость к микофенольной кислоте (Mulligan RC & Berg P (1981) PNAS 78(4): 2072-2076); neo, который придает устойчивость к аминогликозиду G-418 (Wu GY & Wu CH (1991) Biotherapy 3: 87-95; Tolstoshev P (1993) Ann Rev Pharmacol Toxicol 32: 573-596; Mulligan RC (1993) Science 260: 926-932; и Morgan RA & Anderson WF (1993) Ann Rev Biochem 62: 191-217; Nabel GJ & Felgner PL (1993) Trends Biotechnol 11(5): 211-215); и *hygro*, который придает устойчивость к гигромицину (Santerre RF *et al.*, (1984) Gene 30(1-3): 147-156). Методы, общеизвестные в области

технологии рекомбинантной ДНК, могут обычным образом применяться для селекции желаемого рекомбинантного клона, и такие методы описаны, например, в источнике Ausubel FM *et al.,* (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler M, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); and in Chapters 12 and 13, Dracopoli NC *et al.,* (eds.), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colbère-Garapin F *et al.,* (1981) J Mol Biol 150: 1-14, которые полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки.

[0182] Уровень экспрессии молекулы антитела можно повышать с помощью амплификации на основе вектора (для обзора см. Bebbington CR & Hentschel CCG, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3 (Academic Press, New York, 1987)). Когда маркер в экспрессирующей антитело векторной системе поддается амплификации, повышение уровня ингибитора, присутствующего в культуре клетки-хозяина, будет повышать количество копий маркерного гена. Поскольку амплифицируемый участок связан с геном антитела, продукция антитела также будет повышаться (Crouse GF *et al.,* (1983) Mol Cell Biol 3: 257-66).

[0183] Клетки-хозяева можно котрансфицировать двумя или более векторами экспрессии, описанными в настоящей заявке, где первый вектор кодирует полипептид, происходящий из тяжелой цепи, и второй вектор кодирует полипептид, происходящий из легкой цепи. Два вектора могут содержать идентичные селектируемые маркеры, которые обеспечивают равную экспрессию полипептидов тяжелой и легкой цепи. Клетки-хозяева можно котрансфицировать различным количеством двух или более векторов экспрессии. Например, клетки-хозяева можно трансфицировать первым вектором экспрессии и вторым вектором экспрессии в любом из следующих отношений: 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:12, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45 или 1:50.

[0184] Альтернативно, можно применять один вектор, который кодирует и способен обеспечивать экспрессию обоих полипептидов тяжелой и легкой цепи. В таких случаях легкая цепь должна помещаться перед тяжелой цепью во избежание избытка токсичной свободной тяжелой цепи (Proudfoot NJ (1986) Nature 322: 562-565; и Köhler G (1980) PNAS 77: 2197-2199). Кодирующие последовательности для тяжелой и легкой цепей могут содержать кДНК или геномную ДНК. Вектор экспрессии может быть моноцистронным или мультицистронным. Мультицистронная конструкция нуклеиновой кислоты может кодировать 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более или в диапазоне

2-5, 5-10 или 10-20 генов/нуклеотидных последовательностей. Например, бицистронная конструкция нуклеиновой кислоты может содержать элементы в следующем порядке: промотор, первый ген (например, ген тяжелой цепи антитела, описанного в настоящей заявке) и второй ген (например, ген легкой цепи антитела, описанного в настоящей заявке). В таком векторе экспрессии транскрипция обоих генов может запускаться промотором, тогда как трансляция мРНК с первого гена может происходить с помощью cap-зависимого сканирующего механизма, а трансляция мРНК со второго гена может происходить с помощью cap-независимого механизма, например, с помощью IRES.

[0185] Вектор может содержать первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антиген-связывающий фрагмент (Fab), который связывается с сывороточным альбумином, и вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую биоактивный эффекторный фрагмент и линкер.

[0186] Сразу после получения с помощью рекомбинантной экспрессии молекулы антитела, описанного в настоящей заявке, указанная молекула может быть очищена с помощью любого метода, известного в данной области техники для очистки молекулы иммуноглобулина, например, с помощью хроматографии (например, ионообменной, аффинной, в частности, с помощью аффинной в отношении специфичного антигена хроматографии после очистки на белке А, и колоночной хроматографии с распределением по размеру), центрифугирования, дифференциальной растворимости или с помощью любого стандартного метода очистки белков. Кроме того, антитела, описанные в настоящей заявке, можно сливать с гетерологичными полипептидными последовательностями, которые описаны в настоящей заявке или которые, как известно из других источников в данной области техники, могут облегчать очистку.

[0187] Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, антитело, описанное в настоящей заявке, является выделенным или очищенным. В целом, выделенное антитело представляет собой антитело, которое по существу не содержит другие антитела, обладающее другими антигенными специфичностями по сравнению с выделенным антителом. Например, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, препарат антитела, описанного в настоящей заявке, по существу не содержит клеточный материал и/или химических предшественников. Фраза «по существу не содержит клеточный материал» включает препараты антитела, в которых антитело отделено от клеточных компонентов клетки, из которых оно было выделено или получено рекомбинантным путем. Таким образом, антитело, которое по существу не содержит клеточный материал, включает препараты антитела, содержащие

менее чем примерно 30%, 20%, 10%, 5%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% (по сухой массе) гетерологичного белка (также называемого в настоящей заявке «контаминирующим белком») и/или варианты антитела, например, различные формы антитела с посттрансляционными модификациями. Когда антитело или его фрагмент получают рекомбинантным путем, она также в целом по существу не содержит культуральную среду, т.е. культуральная среда составляют менее чем примерно 20%, 10%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% объема препарата белка. Когда антитело или его фрагмент получают с помощью химического синтеза, оно в целом по существу не содержит химических предшественников или других химических веществ, т.е. отделено от химических предшественников или других химических веществ, которые вовлечены в процесс синтеза белка. Соответственно, такие препараты антитела или его фрагмента содержат менее чем примерно 30%, 20%, 10% или 5% (по сухой массе) химических предшественников или соединений, отличных от интересующего антитела или фрагмента. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, антитела, описанные в настоящей заявке, являются выделенными или очищенными.

Композиции

[0188] Согласно настоящему изобретению, предложены композиции, содержащие мультиспецифичное антитело, описанное в настоящей заявке, имеющее желаемую степень чистоты, в физиологически приемлемом носителе, вспомогательном веществе или стабилизаторе (Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA). Также согласно настоящему изобретению описаны фармацевтические композиции, содержащие мультиспецифичное антитело, описанное в настоящей заявке, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозах и концентрациях.

[0189] Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может обеспечивать быстрое, длительное или отсроченное высвобождение активного ингредиента после введения субъекту и может быть приготовлена с использованием метода, хорошо известного специалисту в данной области техники. Лекарственные формы могут быть представлены в виде таблетки, драже, порошка, сахета, эликсира, суспензии, эмульсии, раствора, сиропа, аэрозоля, мягкой или твердой желатиновой капсулы, стерильного раствора для инъекций, стерильного порошка и т.д. Примеры подходящих носителей, вспомогательных веществ и разбавителей представляют собой

лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, ксилитол, эритритол, мальтитол, крахмалы, гуаровую камедь, альгинат, желатин, фосфат кальция, силикат кальция, целлюлозу, микрокристаллическую целлюлозу, поливинилпирролидон, воду, метилгидроксибензоат, пропилгидроксибензоат, тальк, стеарат магния и минеральное масло. Кроме того, лекарственные формы могут дополнительно включать наполнитель, препятствующий агглютинации агент, смазывающий агент, смачивающий агент, ароматизатор, эмульгатор, консервант и т.д.

[0190] Фармацевтические композиции, описанные в настоящей заявке, могут быть применимы для усиления, индукции или активации действия мультиспецифичных антител и лечения заболевания или состояния, такого как аутоиммунные состояния или заболевания.

[0191] Композиции для применения для *in vivo* введения могут быть стерильными, что легко осуществляется путем фильтрования, например, через мембраны для стерилизующего фильтрования.

Способы получения и применения

[0192] Согласно настоящему изобретению описаны способы лечения аутоиммунного заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта, где указанный способ включает введение субъекту мультиспецифичных антител или фармацевтических композиций, описанных в настоящей заявке, субъекту. Аутоиммунные заболевания или состояния, которые можно лечить, включают, но не ограничиваются указанными, заболевания спектра оптиконевромиелита, ревматоидный артрит, множественный склероз, синдром Шегрена, системную красную волчанку, АНЦА-ассоциированный васкулит, язвенный колит и болезнь Крона.

[0193] Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения, предложены способы модулирования одной или более иммунных функций или ответов у субъекта, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту мультиспецифичного антитела, описанного в настоящей заявке, или его композиции. Согласно настоящему изобретению, описаны способы активации, усиления или индукции одной или более иммунных функций или ответов у субъекта, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту мультиспецифичного антитела или его композиции. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, предложены способы предотвращения и/или лечения заболеваний, при которых является желательным активировать или усиливать одну или более иммунных функций или ответов, включающие введение нуждающемуся

в этом субъекту мультиспецифичного антитела, описанного в настоящей заявке, или его композиции. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, предложены способы лечения аутоиммунного заболевания или состояния, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту мультиспецифичного антитела или его композиции.

[0194] Также согласно настоящему изобретению описаны способы применения мультиспецифичных антител или композиций, описанных в настоящей заявке для лечения аутоиммунного заболевания или состояния; модулирования одной или более иммунных функций или ответов; активации, усиления или индукции одной или более иммунных функций или ответов; или предотвращения и/или лечения заболеваний, при которых является желательным активировать или усиливать одну или более иммунных функций или ответов у субъектов. Также, согласно настоящему изобретению, описаны мультиспецифичные антитела или композиции, описанные в настоящей заявке, для применения в лечении аутоиммунного заболевания или состояния; модулирования одной или более иммунных функций или ответов; активации, усиления или индукции одной или более иммунных функций или ответов; или предотвращения и/или лечения заболеваний, при которых является желаемым активировать или усиливать одну или более иммунных функций или ответов у субъектов. Также в настоящей заявке описано применение мультиспецифичных антител или композиций, описанных в настоящей заявке, для изготовления лекарственного средства для лечения аутоиммунного заболевания или состояния; модулирования одной или более иммунных функций или ответов; активации, усиления или индукции одной или более иммунных функций или ответов; или предотвращения и/или лечения заболеваний, при которых является желаемым активировать или усиливать одну или более иммунных функций или ответов, у субъектов.

[0195] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, мультиспецифичное антитело, описанное в настоящей заявке, активирует или усиливает или индуцирует одну или более иммунных функций или ответов у субъекта по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 20% или по меньшей мере на 10% или в диапазоне между 10% и 25%, 25% и 50%, 50% и 75% или

75% и 95% по отношению к иммунной функции у субъекта, которому не вводили указанное мультиспецифичное антитело, описанное в настоящей заявке, по результатам анализов, хорошо известных в данной области техники, например, ELISPOT, ИФА и анализов клеточной пролиферации.

Способы введения и дозы

[0196] Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно вводить с помощью различных способов введения, включая пероральный, чрезкожный, подкожный, внутривенный и внутримышечный пути введения.

[0197] Количество антитела или композиции, эффективное для лечения и/или предотвращения состояния, зависит от природы заболевания и может быть определено с помощью стандартных клинических методов.

[0198] Согласно настоящему изобретению, количество реально вводимого мультиспецифичного антитела определяется с учетом соответствующих различных факторов, включая заболевание, подлежащее лечению, выбранный способ введения, возраст, пол и массу тела пациента и тяжесть указанного заболевания, а также тип биоактивного полипептида, используемого в качестве активного ингредиента. Поскольку мультиспецифичное антитело согласно настоящему изобретению обладает превосходной долгосрочной стабильностью в крови, количество и частота введения препаратов пептида, содержащих белок слияния согласно настоящему изобретению, могут быть значительно снижены.

[0199] Точная доза для применения в композиции также будет зависеть от способа введения и тяжести заболевания и будет определяться в соответствии с решением практикующего врача и с учетом обстоятельств каждого субъекта. Например, эффективные дозы также могут варьировать в зависимости от способов введения, сайта-мишени, физиологического состояния пациента (включая возраст, массу тела и состояние здоровья), от того, представляет ли собой пациент человека или животное, от других вводимых медицинских препаратов или от того, является лечение профилактическим или терапевтическим. Как правило, пациент представляет собой человека, но также можно лечить не представляющих собой людей млекопитающих, включая трансгенных млекопитающих. Лечебные дозы разводят оптимальным образом для оптимизации безопасности и эффективности.

[0200] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, доза мультиспецифичного антитела, описанного в настоящей заявке, составляет от 0,1 мг/кг

до 100 мг/кг массы тела субъекта, от 0,1 мг/кг до 80 мг/кг массы тела субъекта, от 0,1 мг/кг до 60 мг/кг массы тела субъекта, от 0,1 мг/кг до 50 мг/кг массы тела субъекта, от 0,1 мг/кг до 40 мг/кг массы тела субъекта, от 0,1 мг/кг до 30 мг/кг массы тела субъекта, от 0,1 мг/кг до 20 мг/кг массы тела субъекта, от 0,1 мг/кг до 10 мг/кг массы тела субъекта, от 1 мг/кг до 100 мг/кг массы тела субъекта, от 1 мг/кг до 80 мг/кг массы тела субъекта, от 1 мг/кг до 60 мг/кг массы тела субъекта, от 1 мг/кг до 50 мг/кг массы тела субъекта, от 1 мг/кг до 40 мг/кг массы тела субъекта, от 1 мг/кг до 30 мг/кг массы тела субъекта, от 1 мг/кг до 20 мг/кг массы тела субъекта, от 1 мг/кг до 10 мг/кг массы тела субъекта, от 5 мг/кг до 100 мг/кг массы тела субъекта, от 5 мг/кг до 80 мг/кг массы тела субъекта, от 5 мг/кг до 60 мг/кг массы тела субъекта, от 5 мг/кг до 50 мг/кг массы тела субъекта, от 5 мг/кг до 40 мг/кг массы тела субъекта, от 5 мг/кг до 30 мг/кг массы тела субъекта, от 5 мг/кг до 20 мг/кг массы тела субъекта, от 5 мг/кг до 10 мг/кг массы тела субъекта или любые дозы или диапазоны доз, включенные в настоящей заявке, такие как 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг/кг массы тела субъекта.

[0201] Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, анализ *in vitro* используют для того, чтобы помочь идентифицировать оптимальные диапазоны дозы. Эффективные дозы можно экстраполировать из кривых зависимости доза-эффект, полученных с помощью тест-систем *in vitro* или на животных моделях.

[0202] В целом, человеческие антитела обладают более долгим временем полужизни в человеческом теле по сравнению с антителами от других видов в связи с иммунным ответом на чужеродные полипептиды. Таким образом, введение более низких доз и более редкое введение человеческих антител часто является возможным.

Наборы

[0203] Согласно настоящему изобретению, предложены наборы, содержащие одно или более антител, описанных в настоящей заявке, или их конъюгатов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, предложена фармацевтическая упаковка или набор, содержащий один или более контейнеров, заполненных одним или более ингредиентами фармацевтических композиций, описанных в настоящей заявке, таких как одно или более антител, предложенных в настоящей заявке. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, наборы содержат фармацевтическую композицию, описанную в настоящей заявке, и любой профилактический или терапевтический агент, такой как агенты, описанные в настоящей заявке. Необязательно с таким контейнером (контейнерами) может быть связано примечание в форме,

предписанной государственным органом, регулирующим изготовление, применение или реализацию фармацевтических препаратов или биологических продуктов, где указанное примечание отражает одобрение указанным органом изготовления, применения или реализации для введения человеку. Также согласно настоящему изобретению, предложены наборы, которые можно использовать в указанных выше способах. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, набор содержит антитело, описанное в настоящей заявке, например, очищенное антитело, в одном или более контейнеров. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, наборы, описанные в настоящей заявке, содержат по существу выделенный антиген (антигены) (например, человеческий сывороточный альбумин), который можно использовать в качестве контроля. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения, наборы, описанные в настоящей заявке, дополнительно содержат контрольное антитело, которое не реагирует с антигеном, представляющим собой сывороточный альбумин. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения, наборы, описанные в настоящей заявке, содержат один или более элементов для выявления связывания антитела с антигеном, представляющим собой сывороточный альбумин (например, антитело может быть конъюгировано с поддающимся выявлению субстратом, таким как флуоресцентное соединение, ферментативный субстрат, радиоактивное соединение или люминесцентное соединение, или же второе антитело, распознающее первое антитело, может быть конъюгированным с поддающимся выявлению субстратом). Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, набор, предложенный в настоящей заявке, может содержать полученные рекомбинантным путем или химически синтезированный антиген, представляющий собой сывороточный альбумин. Антиген, представляющий собой сывороточный альбумин, предложенный в наборе, также может быть присоединен к твердой подложке. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, способы выявления описанного выше набора включают твердую подложку, к которой присоединен антиген, представляющий собой сывороточный альбумин. Такой набор также может содержать несвязанное меченное репортером антитело против иммуноглобулина человека или антитело против иммуноглобулина мыши/крысы. Связывание антитела с антигеном, представляющим собой сывороточный альбумин, может выявляться на основе связывания указанного меченного репортером антитела.

[0204] Здесь и далее настоящее изобретение описано со ссылкой на некоторые варианты реализации и сопутствующие графические материалы. Следующие далее

варианты реализации и графические материалы предложены исключительно в качестве иллюстрации и не ограничивают настоящее изобретение, которое определяется прилагаемой формулой изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Материалы и способы

[0205] 1. Клонирование генов

[0206] 1-1. Клонирование APB-A1 (структура (scFv против CD40L)$_2$-Fab против HSA)

[0207] Клонирование генов проводили с использованием стандартного метода генной рекомбинации. scFv hu5c8 (SEQ ID NO:5) синтезировали посредством оптимизации кодонов, подходящей для клеток млекопитающего (Cosmo Genetech, Корея). Праймеры, коммерчески доступные от компании Macrogen (Сеул, Корея) использовали для клонирования и первоначальное клонирование проводили с использованием векторов pcDNA3.3 и pOptiVEC (Thermo Fisher Scientific) с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) путем связывания синтезированного scFv hu5c8 с N-концами тяжелой и легкой цепей SL335 с помощью подвижного линкера соответственно. После этого клонирование выявляли по экспрессии белка на клеточной линии ExpiCHO-S™ (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс). Затем для получения установленной клеточной линии-продуцента клеточной линии GS-null CHO K1 (Horizon Discovery, Кембридж, Великобритания) осуществляли клонирование с использованием клеток животных, экспрессирующих векторы, то есть pd2535nt (Horizon Discovery) для тяжелой цепи и pd2539 (Horizon Discovery) для легкой цепи. ПЦР осуществляли в условиях, при которых в общем 25 циклов проводили при 95°C в течение 30 секунд, при 61°C в течение 30 секунд и при 72°C в течение 1 минуты и, наконец, в течение 5 минут для удлинения с последующим понижением температуры до 4°C. В Таблице 1 показаны заданные параметры для праймеров для получения рекомбинантных векторов путем клонирования генов тяжелой цепи и легкой цепи APB-A1, встроенных в векторы pcDNA3.3 и pOptiVEC, в векторах pd2535nt и pd2539 соответственно. Кроме того, плазмидные векторы pGL3c(1b) (Satorius) использовали в качестве дополнительных векторов.

Таблица 1

	Праймер	Олигонуклеотидная последовательность
Тяжелая цепь APB-A1	SEQ ID NO:16	(прямой) 5'-gatcaactctagagccaccatggagtggtcctgggtc-3'
	SEQ ID NO:17	(обратный) 5'-aggaagacgcttttagaggcggccgctcaggaggacttgggctccaccttcttatc-3'
Легкая цепь APB-A1	SEQ ID NO:18	(прямой) 5'-gatcaactctagagccaccatggagacccacagccag-3'
	SEQ ID NO:19	(обратный) 5'-aggaagacgcttttagaggcggccgctcaggactccccccggttaaagctcttggtcac-3'

[0208] Более подробно, ПЦР осуществляли таким образом, как описано выше, и получали ПЦР-продукт тяжелой и легкой цепи APB-A1, состоящий из примерно 1,600 пар оснований (bp) в длину. Концы тяжелой цепи продукта ПЦР и вектора pd2535nt обрабатывали BbsI (Thermo Fisher Scientific); и 5'-концы легкой цепи продукта ПЦР и вектора pd2539 обрабатывали BsrGI (Thermo Fisher Scientific), 3'-концы легкой цепи продукта ПЦР и вектора pd2539 обрабатывали рестрикционным ферментом BbsI и затем обрабатывали ДНК-лигазой T4 (Takara, Япония). Затем штамм E. coli, DH5-альфа (RBC, Канада), трансформировали полученной плазмидой путем воздействия на него теплового шока и затем очищали с использованием набора Midiprep (Macherey Nagel™, Германия) в соответствии с протоколом изготовителя и элюирования с помощью воды без нуклеазной активности. Тяжелые и легкие цепи APB-A1 могли иметь аминокислотные последовательности SEQ ID NO:41 и SEQ ID NO:42 соответственно, где 104-ая аминокислота с N-конца в указанных аминокислотных последовательностях соответствовала глицину (G) или глутамину (Q).

[0209] 1-2. Клонирование APB-B1 ((scFv против CD40L)$_2$-(Fab против HSA)-(Fv против TNF-α))

[0210] (1) Синтезировали ген Fab SL335, связывающегося с человеческим сывороточным альбумином, ген scFv руплизумаба, связывающегося с CD40L, и ген биоактивного эффектора. Биоактивный эффектор может представлять собой Fv против TNF-α (цертолизумаб, содержащий последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:6 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:7) или dsFv против TNF-α (цертолизумаб,

содержащий последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:8 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:9), Fv против IL-23 (устекинумаб, содержащий последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:10 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:11) или dsFv против IL-23 (устекинумаб, содержащий последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:12 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:13) или Fv против IFNAR1 (анифролумаб, содержащий последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:14 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:15) или dsFv против IFNAR1 (анифролумаб, содержащий последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:39 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:40. В Таблицах 2, 3 и 4 представлены заданные параметры праймеров для ПЦР для получения APB-B1 (Macrogen, Корея).

Таблица 2

Конструкция	Праймер	Олигонуклеотидная последовательность
(scFv против CD40L)$_2$ +Fab против HSA +Fv против TNF-α	SEQ ID NO:20	(прямой) 5'-gatcaactctagagccaccatggagtggtcctgggt-3'
	SEQ ID NO:21	(обратный) 5'-ggaggacttgggctccaccttcttatcgac-3'
	SEQ ID NO:22	(прямой) 5'-gtcgataagaaggtggagcccaagtcctcc-3'
	SEQ ID NO:23	(обратный) 5'-atcggcggccgcgaagacgcttttagatca-3'
	SEQ ID NO:24	(прямой) 5'-gatcaactctagagccaccatggagacccacagccag-3'
	SEQ ID NO:25	(обратный) 5'-ggactccccccggttaaagctcttggtcac-3'
	SEQ ID NO:26	(прямой) 5'-gtgaccaagagctttaaccgggggggagtcc-3'
	SEQ ID NO:27	(обратный) 5'-atcggcggccgcgaagacgcttttagatca-3'
(scFv против CD40L)$_2$ +Fab против HSA	SEQ ID NO:20	(прямой) 5'-gatcaactctagagccaccatggagtggtcctgggt-3'
	SEQ ID NO:28	(обратный) 5'-tttaccgggggcctgccgaacccagttcat-3'

+dsFv против TNF-α	SEQ ID NO:29	(прямой) 5'-gccccggtaaatgtctggaatggatgggg-3'
	SEQ ID NO:30	(обратный) 5'-atcggcggccgcgaagacgcttttagatca-3'
	SEQ ID NO:24	(прямой) 5'-gatcaactctagagccaccatggagacccacagccag-3'
	SEQ ID NO:31	(обратный) 5'-ttcatgcggccgcgaagacgcttttagatcaccgcttaatctca actttttgttccacatccaaatgtcag-3'

Таблица 3

Конструкция	Праймер	Олигонуклеотид последовательность
(scFv против CD40L)$_2$ +Fab против HSA +Fv против IL-23	SEQ ID NO:20	(прямой) 5'-gatcaactctagagccaccatggagtggtcctgggt-3'
	SEQ ID NO:21	(обратный) 5'-ggaggacttgggctccaccttcttatcgac-3'
	SEQ ID NO:22	(прямой) 5'-gtcgataagaaggtggagcccaagtcctcc-3'
	SEQ ID NO:23	(обратный) 5'-atcggcggccgcgaagacgcttttagatca-3'
	SEQ ID NO:24	(прямой) 5'-gatcaactctagagccaccatggagacccacagccag-3'
	SEQ ID NO:25	(обратный) 5'-ggactccccccggttaaagctcttggtcac-3'
	SEQ ID NO:26	(прямой) 5'-gtgaccaagagctttaaccgggggggagtcc-3'
	SEQ ID NO:27	(обратный) 5'-atcggcggccgcgaagacgcttttagatca-3'
(scFv против CD40L)$_2$ +Fab против HSA	SEQ ID NO:20	(прямой) 5'-gatcaactctagagccaccatggagtggtcctgggt-3'
	SEQ ID NO:32	(обратный) 5'-ttttccgggcatctgccgtacccacccaag-3'

+dsFv против IL-23	SEQ ID NO:33	(прямой) 5'-atgcccggaaaatgtctcgattggatagggataatg-3'
	SEQ ID NO:30	(обратный) 5'-atcggcggccgcgaagacgcttttagatca-3'
	SEQ ID NO:24	(прямой) 5'-gatcaactctagagccaccatggagacccacagccag-3'
	SEQ ID NO:34	(обратный) 5'-ttcatgcggccgcgaagacgcttttagatcaccgctttatctccaatttt gttccacacccgaatgtata-3'

Таблица 4

Конструкция	Праймер	Олигонуклеотидная последовательность
(scFv против CD40L)$_2$ +Fab против HSA +Fv против IFNAR1	SEQ ID NO:20	(прямой) 5'-gatcaactctagagccaccatggagtggtcctgggt-3'
	SEQ ID NO:21	(обратный) 5'-ggaggacttgggctccaccttcttatcgac-3'
	SEQ ID NO:22	(прямой) 5'-gtcgataagaaggtggagcccaagtcctcc-3'
	SEQ ID NO:23	(обратный) 5'-atcggcggccgcgaagacgcttttagatca-3'
	SEQ ID NO:24	(прямой) 5'-gatcaactctagagccaccatggagacccacagccag-3'
	SEQ ID NO:25	(обратный) 5'-ggactccccccggttaaagctcttggtcac-3'
	SEQ ID NO:26	(прямой) 5'-gtgaccaagagctttaaccgggggggagtcc-3'
	SEQ ID NO:27	(обратный) 5'-atcggcggccgcgaagacgcttttagatca-3'
(scFv против CD40L)$_2$ +Fab против HSA	SEQ ID NO:20	(прямой) 5'-gatcaactctagagccaccatggagtggtcctgggt-3'
	SEQ ID NO:35	(обратный) 5'-ttttccgggcatctgccgtacccacccaag-3'

+ dsFv против IFNAR1	SEQ ID NO:36	(прямой) 5'-atgcccggaaaatgtctcgattggatagggataatg-3'
	SEQ ID NO:30	(обратный) 5'-atcggcggccgcgaagacgcttttagatca-3'
	SEQ ID NO:24	(прямой) 5'-gatcaactctagagccaccatggagacccacagccag-3'
	SEQ ID NO:37	(обратный) 5'-Tacatgcggccgcgaagacgcttttagatcaacgtttaatctcaagtc gagtcccacacccgaaagtaat-3'

[0211] Для амплификации соответствующих генов scFv, Fab, dsFv и Fv проводили 30 циклов ПЦР с помощью термоциклера T100™ (Bio-Rad, Геркулес, Калифорния) с использованием ДНК-полимеразы Taq (Takara, Япония), где каждый цикл осуществляли при следующих условиях: при температуре 94°C в течение 1 минуты, при 60°C в течение 1 минуты и при 72°C в течение 1 минуты. Затем для сборки соответствующих продуктов цепной реакции в структуру формата $(scFv)_2$-Fab-Fv или $(scFv)_2$-Fab-dsFv проводили сборочную ПЦР со следующими условиями циклов: при 94°C в течение 1 минуты, при 60°C в течение 1 минуты и при 72°C в течение 1 минуты и 30 секунд. Собранный продукт тяжелой цепи, полученный с помощью ПЦР, и вектор pD2535NT (Horizon Discovery, Великобритания) обрабатывали рестрикционным ферментом Bbs I (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс); собранный продукт легкой цепи и вектор pd2539 (Horizon Discovery) обрабатывали рестрикционными ферментами Bbs I и Bsr GI (New England Biolabs, Ипсвич, Массачусетс). Собранные с помощью ПЦР продукты цепной реакции, обработанные соответствующими рестрикционными ферментами, и плазмидные векторы собирали друг с другом с использованием ДНК-лигазы T4 (Takara) и собранные продукты наносили в диспергируемые компетентные клетки, обработанные $CaCl_2$, с последующим применением теплового шока для трансформации. Затем проводили скрининг трансформированных клонов с использованием культуральной среды, содержащей антибиотик канамицин.

[0212] Кроме того, для продукции рекомбинантного человеческого CD40L (rhCD40L-his), проводили анализы с помощью клонирования таким же образом, как описано выше. Использовали рекомбинантный человеческий ген CD40L (SEQ ID NO:38), синтезированный компанией Cosmo Genetech, который клонировали в вектор

pcDNA3.3™® (Thermo Fisher Scientific) с использованием рестрикционных ферментов Xba I (Takara) и Not I (Takara).

[0213] (2) Белки получали посредством временной экспрессии с использованием клеток CHO. Для продукции биспецифичного антитела на основе SAFA и образца рекомбинантного человеческого белка CD40L клетки ExpiCHO (Thermo Fisher Scientific) инкубировали в шейкере-инкубаторе при следующих условиях: температура 37°C, скорость 140 об./мин, 5% CO_2 и 80% влажности, в среде для экспрессии ExpiCHO (Thermo Fisher Scientific). Для получения клеток с временной экспрессией указанные клетки высевали в культуральный флакон на 125 мл в концентрации $6{,}0\times10^6$ клеток/мл и трансфицировали высеянные клетки плазмидными векторами pD2535NT и pD2539, содержащими 3 встроенных гена с идентифицированными последовательностями (тяжелые и легкие цепи цертолизумаба, устекинумаба и анифролумаба), и вектор pcDNA3.3-TOP® со встроенным геном рекомбинантного человеческого CD40L с использованием набора для трансфекции клеток CHO ExpiFectamine (Thermo Fisher Scientific). Клетки, которые инкубировали в шейкере-инкубаторе в течение 16 часов, обрабатывали средой ExpiCHO и энхансером с последующим инкубированием в течение 3 дней в инкубаторе при поддержании тех же условий. На 3 день инкубации клетки обрабатывали дополнительной порцией среды ExpiCHO и инкубировали в условиях 32°C, 140 об./мин, 5% CO_2 и влажности не менее 80%. На 9 день инкубации культуральную среду собирали и затем центрифугировали при 4,000 об./мин в течение 15 минут при 4°C с отделением таким образом клеток от культуральной среды. Выделенную культуральную среду фильтровали через фильтровальную бумагу с размером пор 0,2 мкм с удалением таким образом примесей.

[0214] 2. Получение клеточной линии

[0215] 2-1. Клеточная линия GS-null CHO K1 для получения APB-A1

[0216] Использовали клеточную линию CHO K1 с отсутствием синтеза глутамина (GS-null) (Horizon Discovery). Использовали среду CDfortiCHO (Thermo Fisher Scientific) с добавлением 4 мМ L-глутамина (Gibco, Thermo Fisher Scientific) и культуральную среду инкубировали в шейкере-инкубаторе при скорости 125 об./мин в условиях 80% влажности и 5% CO_2 при температуре 37°C. Трансфекцию проводили с использованием реагента Freestyle™Max (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) в соответствии с процедурой, являющейся модификацией стандартного протокола, предложенного компанией Horizon Discovery. Трансфекцию проводили посредством котрансфекции

легких цепей и тяжелых цепей в отношении 1:1 - 1:3 (pd2539:pd2535nt) с использованием в общем 37,6 мкг плазмидных векторов. Через 2 дня трансфекции инкубированные клетки отбирали, переносили в пробирку на 50 мл с коническим дном (Nunc, Денмарк) для центрифугирования и затем растворяли в культуральной среде CDfortiCHO, не содержащей L-глутамин, с последующим определением концентрации и жизнеспособности клеток с использованием автоматического счетчика клеток COUNTESS II (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Добавляли 50 мкМ метионинсульоксимина (MSX) (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури) и проводили частичную селекцию. После этого еще через 2 дня к клеткам добавляли пуромицин в концентрации 10 мкг/мл (Gibco) с добавлением MSX с последующим инкубированием в течение 48 часов. Клетки после инкубирования разводили в культуральной среде, не содержащей L-глутамин, с достижением концентрации преципитированных клеток $0,5\times10^6$ клеток/мл и затем добавляли MSX вместе с пуромицином для общей селекции. Затем концентрацию клеток поддерживали таком образом, чтобы она не превышала $2,0\times10^6$ клеток/мл, инкубацию осуществляли до тех пор, пока выживаемость клеток не достигала 90% или более, с получением таким образом клеточной линии.

[0217] 2-2. Клеточная линия GS-null CHO-K1 для получения APB-B1

[0218] Клетки GS-null CHO-K1 HD-BIOP3 (Horizon Discovery) в культуральной среде CD FortiCHO (Thermo Fisher Scientific) с добавлением 4 мМ L-глутамина высевали в концентрации $3,0\times10^5$ клеток/мл и инкубировали в шейкере-инкубаторе при условиях 37°C, 5% CO_2 и влажности не менее 80% в течение 1 дня. Для трансфекции клетки высевали в концентрации, составляющей $4,8\times10^5$ клеток/мл, дополнительно инкубировали в течение 1 дня и, наконец, готовили в концентрации, составляющей $1,0\times10^6$ клеток/мл. Плазмидные векторы (pD2535NT и pD2539), содержащие гены тяжелой и легкой цепи родственного цертолизумабу биспецифичного антитела на основе SAFA с идентифицированными последовательностями трансфицировали в высеянные клетки с использованием культуральных сред OptiPRO SFM и реагента Freestyle max (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния) и затем инкубировали в течение 2 дней в условиях 37°C, 5% CO_2 и влажности не менее 80%. Все клетки после инкубирования переносили в культуральные среду CD FortiCHO, не содержащую L-глутамин, и затем обрабатывали 50 мкм метионинсульфоксимина (MSX) (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури) и 10 мкг/мл пуромицина (Thermo Fisher Scientific) с интервалами в 2 дня с удалением таким образом клеток, не содержащих вектор. Затем имеющиеся культуральные среды удаляли посредством центрифугирования и замещали на

культуральную среду CD FortiCHO, содержащую как MSX, так и пуромицин с интервалом от 7 до 10 дней и инкубировали в течение 21 дня при поддержании количества клеток в концентрации $5,0\times10^5$ клеток/мл. Через 21 день, когда выживаемость клеток достигала 70% или более, получали культуру клеток с поддержанием количества клеток в концентрации $3,0\times10^5$ клеток/мл и, когда выживаемость клеток составляла 90% или более, начинали получение субкультур с получением стокового раствора 0 (нулевой) субкультуры и продолжали пересевать до получения 3 стокового раствора.

[0219] 3. Выделение, очистка и анализ белка

[0220] 3-1. Белок APB-A1

[0221] (1) ИФА

[0222] rhCD40L, рекомбинантный антиген hCD40L, полученный в соответствии с настоящим изобретением (AprilBio, Chuncheon, Южная Корея) наносили на 96-луночный планшет для ИФА MaxiSorp (Nunc) в концентрации, составляющей 100 нг/лунку на ночь при температуре 4°C с использованием карбонатного буфера для иммобилизации (pH 9,6). Планшет блокировали путем обработки блокирующим буфером (Starting Block™ (ФСБ) (Thermo Fisher Scientific) при комнатной температуре в течение 3 часов. После промывки промывочным буфером (фосфатно-солевой буфер + 0,1% Твин 20; 0,1% ФСБ-Т), супернатант рекомбинантного антитела, имеющего структуру (scFv против CD40L)$_2$-Fab против HSA, полученного из клеток GS-null CHOK1, называемого APB-A1, последовательно разбавляли с помощью разбавляющего буфера (0,1% ФСБ-Т + 0,3% BSA; 0,3% PBA) и позволяли реагировать при комнатной температуре в течение 1 часа. Конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP) козьи антитела против Fd иммуноглобулина человека (Southern Biotechnology, Бирмингем, Алабама) использовали в качестве вторичных антител и субстрат тетраметилбензидин (TMB) (BD science, Franklin Lakes, Нью-Джерси) использовали для люминесценции. Поглощение измеряли при 450 нм с использованием считывателя для ИФА (BMG Labtech, Германия). ФК-ИФА проводили таким образом, что антиген rhCD40L разбавляли в ФСБ (Roman Industries, Япония) в концентрации, составляющей 1 мкг/мл, и затем наносили на планшет для ИФА в объеме 100 мкл на ночь при 4°C. На следующий день блокирующий буфер (0,3% BSA в ФСБ, 300 мкл) добавляли в каждую лунку для осуществления блокирования при 25 °C в течение 3 часов и стандартные и QC-образцы переносили в каждую лунку в объеме 100 мкл и позволяли реагировать при 25°C в

течение 1,5 часов. После 3-кратной промывки промывочным буфером (300 мкл/лунка) конъюгированные с биотином козьи IgG против легкой цепи иммуноглобулина человека (адсорбированные на клетках обезьяны; Immuno-Biological Laboratories, Япония) высевали в каждую лунку в концентрации 100 мкл/лунка и позволяли реагировать при 25°C в течение 1 часа. Затем после 4-кратной промывки высокочувствительный субстрат стептавидин-HRP (Pierce, Thermo Fisher Scientific) вводили в реакцию при тех же условиях объема и времени с последующей промывкой. Затем раствор субстрата для ИФА 1-step ultra TMB (Thermo Fisher Scientific) переносили в каждую лунку в объеме 100 мкл и позволяли реагировать при комнатной температуре в течение 5 минут. Постепенно добавляли серную кислоту в концентрации 1 моль/л (Wako Pure Химический, Япония; 100 мкл на лунку) в качестве останавливающего раствора и затем перемешивали с помощью смесителя для микропланшетов при скорости 600 об./мин в течение 10 секунд и измеряли поглощение при длине волны 450 - 650 нм.

[0223] (2) Очистка белка

[0224] Клеточную линию GS-null CHO K1, экспрессирующую полученное антитело APB-A1, инкубировали в культуральной среде CDfortiCHO с использованием биореактора WAVE (GE Healthcare) в течение 11 суток. Полученный супернатант и клеточные осадки центрифугировали при 4°C при скорости 4,000 об./мин в течение 20 минут и супернатант культуры фильтровали с помощью фильтра с диаметром пор 0,2 мкм. Белок APB-A1 очищали с помощью 3-этапного процесса хроматографии. Сначала осуществляли этап аффинной хроматографии с использованием аффинной матрицы на основе смолы CaptureSelect IgG-C_{H1} (Life Technologies). После промывки матрицы 5 колоночными объемами (КО) ФСБ осуществляли связывание образца при скорости потока 20 мл/мин. Для устранения белков, отличных от белка-мишени, промывочный этап проводили с использованием 4 КО промывочного высокосолевого буфера (ФСБ, 500 мМ NaCl, pH 7,4) и 2 КО промывочного низкосолевого буфера (25 мМ фосфат натрия, pH 7,6) при скорости потока 25 мл/мин. Элюирующий буфер (20 мМ лимонная кислота, pH 3,0, 150 мМ хлорид натрия) пропускали через матрицу при скорости потока 20 мл/мин и белковый раствор, для которого наблюдались УФ-пики при 50 мЕОП или более, собирали и затем переносили в контейнер на 250 мл для хранения в холоде в течение 1 часа. Собранный белковый раствор нейтрализовали путем добавления 1 М раствора трис-HCl (pH 8,0) и примеси удаляли с использованием фильтра с размером пор 0,2 мкм с получением таким образом элюата APB-A1. Затем проводили катионообменную очистку с использованием смолы CaptoTM SP ImpRes,

уравновешенной с помощью 25 мМ раствора фосфата натрия (pH 7,6). Образец, полученный в результате элюирования в процессе аффинной хроматографии, разводили в 4 раза стерилизованной дистиллированной водой, наносили на колонку со скоростью потока, установленной на 5 мл/мин, и этапы элюирования в градиенте 30%-50%-100% проводили с использованием элюирующего буфера (25 мМ фосфат натрия, pH 7,6, 1 М хлорид натрия). Элюат с каждого этапа собирали и удаляли из него примеси с использованием фильтра с размером пор 0,2 мкм. После этого проводили анионообменную очистку с использованием анионообменной смолы 50 HQ на основе POROS. Сначала пропускали промывочный буфер (2 М хлорид натрия) при скорости потока 3 мл/мин для промывки колонки, заполненной смолой, 5 КО 20 мМ раствора фосфата натрия (pH 6,5) пропускали через колонку, заполненную смолой, для уравновешивания. Для связывания примесей со смолой образец диализовали с помощью 20 мМ буфера на основе фосфата натрия, pH 6,5, и подводили уровень pH и концентрацию соли. Образец пропускали через колонку со смолой при скорости потока, составляющей 5 мл/мин, для сбора белкового раствора с последующим удалением примесей с использованием фильтра с размером пор 0,2 мкм и полученный белок оценивали количественно и анализировали.

[0225] (3) Анализ белка - ДСН-ПААГ

[0226] Очищенный белок APB-A1 анализировали с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза. Буферные растворы для образца, используемого для анализа, представляли собой невосстанавливающий буфер для образцов на основе додецилсульфата лития (ДСЛ) (4x; Thermo Fisher Scientific) и восстанавливающий буфер для образцов (4x), приготовленный путем добавления 5% меркаптоэтанола к невосстанавливающему буферу для образцов, и соответствующие растворы буферов для образцов смешивали с образцами и помещали на водяную баню и кипятили в течение 5 минут, затем анализировали при невосстанавливающих (с кипячением) и восстанавливающих условиях. Кроме того, невосстанавливающий буфер для образцов (4x) смешивали с образцом в отношении 1:4 и проводили анализ в условиях без кипячения с пропущенным этапом термообработки. Образец белка нагружали на 4 - 15% градиентный гель (Bio-Rad, Геркулес, Калифорния) в концентрации, составляющей 1 мкг/лунка и затем проводили электрофорез при 150 В в течение 50 минут, осуществляя таким образом анализ с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза. Разделенные белки в геле после электрофореза окрашивали красящим раствором Ez-Gel (DogenBio, Южная Корея) в течение 1 часа и затем обесцвечивали с помощью воды.

[0227] (4) Анализ белка - высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

[0228] Для оценки размера и чистоты очищенного белка проводили эксклюзионную ВЭЖХ (эксклюзионную высокоэффективную жидкостную хроматографию) с использованием жидкостного хроматографа Prominence (Shimadzu, Япония) и колонки TSKgel Ultra SW Aggregate (Tosoh Bioscience, Япония). Образец разбавляли раствором, содержащим 100 мМ Na_2HPO_4, 100 мМ Na_2SO_4 и 0,05% (масса/объем) NaN_3 (pH 6,7), и 50 мкг разбавленного образца вводили с помощью автоматического дозатора образца при температуре 15°C и затем элюировали с использованием подвижной фазы (200 мМ фосфат, pH 6,7, 0,05% (масса/объем) NaN_3, скорость потока: 0,5 мл/мин). УФ-поглощение измеряли при длине волны 280 нм.

[0229] (5) Анализ белка - масс-спектрометрия

[0230] Молекулярные массы восстановленного и невосстановленного APB-A1 измеряли с использованием ЖХ-масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением (ИЭР), затем анализировали в комбинации с УВЭЖХ Dionex (Thermo Fisher Scientific) и MC/MC системой Q-TOF 5600+ (AB SCIEX, Калифорния, США). Использовали колонку BEH1 30 C4, Acquity UPLC®, с размером частиц 1,7 мкм и подвижную фазу [ацетонитрил (ACN; J.T. Baker)] пропускали через указанную колонку при скорости потока 300 мл/мин для измерения массы тяжелой (H) и легкой (L) цепи APB-A1.

[0231] (6) Анализ белка – изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ)

[0232] (4) Для оценки изоэлектрической точки очищенного белка измеряли значение pI выделенного белка с использованием геля для изоэлектрического фокусирования (pH 3 - 10). После нанесения 1 мкг, 3 мкг и 5 мкг образца на гель в плотности 1 мг/мл проводили изоэлектрическое фокусирование при 100 В в течение 1 часа, при 200 В в течение 1 часа и при 500 В в течение 2 часов и проводили окрашивание 12% трихлоруксусной кислотой (TCA) и Кумасси бриллиантовым синим (CBB) с последующим анализом с помощью программы 2D Platinum, ImageMaster™ (GE healthcare, ver 5.0).

[0233] (7) Анализ белка – анализ вариантов заряда

[0234] Для анализа вариантов заряда APB-A1 проводили ионообменную хроматографию с использованием колонки Protein-Pak Hi Res. 20 мкг белкового образца вводили с помощью автоматического дозатора образцов при 30°C и затем элюировали с использованием подвижной фазы [25 мМ 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота (MES), 500 нМ NaCl, pH 6,5] с градиентом 0 - 40% в течение 30 минут. Скорость потока составляла 0,3 мл/мин, УФ-поглощение измеряли при длине волны 280 нм.

[0235] 3-2. Белок APB-B1

[0236] (1) Выделение и очистка

[0237] Для очистки белкового образца биспецифичного антитела, присутствующего в культуральной среде клеток CHO, проводили аффинную хроматографию (AX) с использованием матрицы на основе смолы CaptureSelect IgG-C_{H1} (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния) и хроматографической системы AKTA pure 150 L (GE Healthcare, Чикаго, Иллинойс), как следует далее. Фосфатно-солевой буфер (ФСБ, pH 7,4) пропускали через заполненную смолой колонку для уравновешивания, выделяли культуральную среду, содержащую белок, экспрессированный в клетках с временной экспрессией, и затем пропускали через колонку со смолой при скорости потока 1,5 мл/мин. После этого ФСБ, pH 7,4, содержащий 500 мМ NaCl, пропускали через колонку для промывки материала, не специфично связанного со смолой. Этапы уравновешивания и промывки для каждого материала осуществляли с использованием 10 колоночных объемов (КО). Для элюирования из смолы биспецифичного антитела на основе SAFA использовали буфер, содержащий 20 мМ лимонную кислоту, pH 3,0, и 150 мМ NaCl. Элюировавший буфер обрабатывали 1 М раствором Трис-HCl (pH 8,0) для нейтрализации, чтобы обеспечить нейтральный уровень pH, и концентрацию очищенного белка измеряли с использованием спектрофотометра для микропланшетов (BMG LABTECH, Германия) при длине волны A280 нм. Для очистки белкового образца биспецифичного антитела после аффинной хроматографии проводили анионообменную хроматографию (AOX) с использованием смолы Q Sepharose HP (GE Healthcare), как следует далее. После уравновешивания через смолу Q Sepharose HP пропускали примерно 10 КО 20 мМ цитратного буфера, pH 6,0, без добавления NaCl; пропускали через смолу белок, предварительно очищенный с помощью аффинной хроматографии, и затем удаляли белок, не связавшийся со смолой. Концентрацию восстановленного белка измеряли с использованием спектрофотометра для микропланшетов при длине волны A280 нм. Для выделения белка, соответствующего размеру димера $(scFv)_2$-Fab-dsFv, то есть биспецифичного антитела на основе SAFA, содержащего дисульфидную связь, и белка, соответствующего размеру мономера (интактная форма), проводили катионообменную хроматографию (КОХ) путем заполнения колонки смолой CM Sepharose FF (GE Healthcare). До очистки проводили этап предварительной обработки посредством диализа белка, очищенного с помощью аффинной хроматографии, с использованием связывающего буфера на основе 20 мМ лимонной кислоты, pH 6,0, без

добавления NaCl. Примерно 10 КО связывающего буфера пропускали через заполненную смолой колонку при скорости потока 1,0 мл/мин для уравновешивания и предварительно обработанный белок затем обрабатывали при той же скорости потока и позволяли ему реагировать со смолой. Затем 5 КО буфера для связывания пропускали через колонку при той же скорости потока и дополнительно обрабатывали 3 КО 100 мМ буфера для связывания с добавлением NaCl, обеспечивая таким образом промывку и удаление не специфично связавшегося материала. Затем белок, представляющий собой биспецифичное антитело, присутствующее в виде мономера, элюировали из смолы путем добавления 120 мМ буфера для связывания с добавлением NaCl. Концентрацию очищенного белка измеряли при A280 нм. Для очистки белкового образца рекомбинантного человеческого CD40L использовали смолу Profinity™ IMAC (Bio-Rad), колонки Hitrap Q HP, 5 мл, (GE Healthcare) и Hitrap SP HP, 5 мл, (GE Healthcare) и хроматографическую систему AKTA pure 150 L для осуществления 3-хэтапной хроматографии. Сначала использовали буфер на основе 20 мМ фосфата натрия, pH 7,2, для уравновешивания и промывки трех вариантов смолы. Для элюирования белкового образца для аффинной хроматографии использовали буфер на основе 20 мМ фосфата натрия, pH 7,2, содержащий 500 мМ имидазола (Sigma). Образец белка очищали с помощью анионной и катионной хроматографии с использованием 15 мМ буфера на основе фосфата натрия, pH 7,4, содержащего 1 М NaCl. Концентрацию очищенного белка измеряли с использованием спектрофотометра для микропланшетов при A280 нм.

[0238] (2) Анализ с помощью ДСН-ПААГ

[0239] Сначала очищенный белковый образец биспецифичного антитела разбавляли с помощью невосстанавливающего 4x буфера для образцов, содержащего ДСН (Thermo Fisher Scientific), и восстанавливающего буфера для образцов, содержащего 2-меркаптоэтанол. В случае невосстанавливающих условий для сравнения типов и размеров белка в зависимости от термообработки готовили образец, который нагревали при 100°C в течение 5 минут, и образец, не подвергавшийся нагреву, и для сравнения размеров маркер молекулярного веса белков (SMOBio, Тайвань) и белковый образец $(scFv)_2$-Fab обрабатывали вместе. Полученные белковые образцы наносили на готовый 4-15% 15-луночный гель Miniprotein TGX (Bio-Rad) в концентрации 2 мкг/лунка и проводили электрофорез в трис-глициновом буфере для электрофореза в присутствии ДСН при 150 В в течение 1 часа. После завершения электрофореза ДСН-ПААГ окрашивали с помощью красящего раствора EZ-Gel (DogenBio, Южная Корея) в течение 1 часа и обесцвечивали в дистиллированной воде в течение одних суток.

[0240] (3) Анализ температуры плавления белка

[0241] Для оценки термостабильности белкового образца биспецифичного антитела анализировали температуру плавления белка с использованием гидрофобного красителя (5,000 x, SYPRO Orange) и циклера Light Cycler 480 II (Roche, Швейцария) в качестве прибора для ПЦР в реальном времени. Белковый образец разводили в буфере на основе фосфата натрия, pH 7,0, в концентрации 300 мкг/мл и затем помещали в планшет для ПЦР ultraAmp (Sorenson Bioscience, Солт-Лейк-Сити, Юта) в присутствии 5x реагента и красителя SYPRO Orange до достижения конечной концентрации в каждой лунке 5,4 мкг/лунка. Затем фильтр возбуждения и эмиссионный фильтр устанавливали на 465 нм и 580 нм соответственно и денатурацию белка оценивали в соответствии с повышением температуры при скорости 1°C/мин в пределах диапазона от 20°C до 85°C.

[0242] (4) Эксклюзионная высокоэффективная жидкостная хроматография (эксклюзионная ВЭЖХ)

[0243] Чистоту очищенного биспецифичного антитела анализировали с использованием колонки T Skgel UltraSW Aggregate размером 7,8 x 300 мм (Tosoh Bioscience, Япония) и системы для жидкостной хроматографии 1260 Infinity II (Agilent Technologies, Санта Клара, Калифорния) в качестве прибора для ВЭЖХ. До анализа образца колонку и систему для ВЭЖХ уравновешивали с помощью 100 мМ буфера на основе лимонной кислоты (20 мМ, pH 5,5). Образец, подлежащий анализу, разбавляли с помощью буфера на основе 20 мМ лимонной кислоты, pH 5,5, и образец наносили на колонку в количестве, составляющем до 25 мкг. Проводили анализ с помощью эксклюзионной ВЭЖХ при следующих условиях: скорость потока 0,7 мл/мин, предел максимального давления 120 бар в течение 30 минут, и поглощение измеряли при A280 нм.

[0244] (5) Иммуноферментный анализ (ИФА)

[0245] Для оценки реакций связывания образца очищенного биспецифичного антитела с человеческим сывороточным альбумином (Sigma-Aldrich), рекомбинантным белком CD40L человека и рекомбинантным белком TNF-α человека (BioLegend, Сан Диего, Калифорния), проводили ИФА. Человеческий сывороточный альбумин, белок CD40L и TNF-α разводили в буфере на основе карбоната натрия, pH 9,6, в концентрации 1 мкг/мл и каждые 100 мкл затем наносили в каждую лунку 96-луночного планшета Maxisorp (Nunc, Денмарк) с последующим инкубированием при 4°C в течение одних суток. Неадгезировавший белок и буфер полностью удаляли и затем осуществляли блокирование путем добавления в каждую лунку по 300 мкл ФСБ, pH 7,4, содержащего

3% бычьего сывороточного альбумина (BSA, Sigma-Aldrich) и 0,1% твин-20. После блокирования в течение 2 часов осуществляли промывку путем повторения в целом 3 раза процесса полного удаления добавленного буфера, добавления по 300 мкл буфера, содержащего 0,1% твин 20 в ФСБ (ФСБ-Т, pH 7,4) и затем удаления указанного буфера. После удаления воды, оставшейся после промывки, осуществляли 10-кратные серийные разведения соответствующих антител в концентрации, снижающейся от 100 нМ до 1,0 $\times 10^{-4}$ нМ в ФСБ-буфере, pH 7,4 (0,3% PBA), содержащем 0,3% бычий сывороточный альбумин и 0,1% твин 20, и каждый 100 мкл образцов разведенного антитела добавляли в каждую лунку и позволяли реагировать при комнатной температуре в течение 2 часов. После промывки таким же образом, как описано выше, HRP-конъюгированные козьи антитела против Fd иммуноглобулина человека (Southern Biotechnology, Бирмингем, Алабама) разбавляли с помощью 0,3% буфера PBA в отношении 1:4,000 и по 100 мкл образцов разбавленного антитела добавляли в каждую лунку и затем позволяли реагировать при комнатной температуре в течение 1 часа. Для оценки антиген-специфичного связывания антител, реагирующих после промывки, добавляли TMB-субстрат (BD Bioscience, Франклин-Лейкс, Нью-Джерси), позволяли реагировать и измеряли поглощение с использованием спектрофотометра для микропланшетов при A450 нм.

[0246] (6) Анализ с помощью биослойной интерферометрии (БСИ)

[0247] Антигенную аффинность биспецифичного антитела и рассматриваемого моноспецифичного антитела в отношении человеческого сывороточного альбумина, CD40L и TNF-α оценивали с помощью биослойной интерферометрии (БСИ) с использованием системы Octet Red (Forte Bio, Фримонт, Калифорния). Сначала белок TNF-α (30 мкг/мл), белок CD40L (10 мкг/мл) и человеческий сывороточный альбумин (20 мкг/мл) иммобилизировали на амин-реактивном биосенсоре второго поколения (AR2G) (Forte Bio) с использованием натрий-ацетатного буфера, pH 5,0. Не иммобилизированные материалы удаляли с помощью 1 М этаноламина (pH 8,5) и биспецифичному антителу позволяли реагировать в концентрациях, соответствующих серийным разведениям, с последующим измерением констант связывания и диссоциации для соответствующих антигенов. Кроме того, для оценки способностей одновременного связывания биспецифичного антитела с тремя антигенами белок CD40L (10 мкг/мл) иммобилизировали на биосенсоре AR2G с использованием натрий-ацетатного буфера, pH 5,0, и способность связывания измеряли в следующем порядке: биспецифичное антитело (3,2 мкг/мл), человеческий сывороточный альбумин (13,2

мкг/мл), человеческий сывороточный альбумин (13,2 мкг/мл) и TNF-α (2 мкг/мл). Результаты оценки анализировали с использованием программы DataAnalysis8.

[0248] (7) Анализ с помощью проточной цитометрии

[0249] Чтобы идентифицировать связывание биспецифичного антитела с CD40L клеточной мембраны проводили анализ с помощью проточной цитометрии с использованием инструмента FACSVerse (BD Biosciences, Франклин-Лейкс, Нью-Джерси). Клетки D1.1 (CRL-10915, ATCC, Манассас, Вирджиния), экспрессирующие мембранный CD40L на клеточных поверхностях инкубировали в среде RPMI1640 (Thermo Fisher Scientific), содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Thermo Fisher Scientific), для достижения концентрации $3,0\times10^5$ клеток/пробирка и промывали два раза буфером 0,3% PBA. Биспецифичному антителу на основе SAFA и контрольному антителу позволяли реагировать с промытыми клетками при 4°C в течение 30 минут соответственно, дважды промывали и затем добавляли к ним конъюгированные с изотиоцианатом флуоресцеина (FITC) козьи антитела против легкой каппа-цепи иммуноглобулина человека (LifeSpan BioSciences, Inc., Сиэтл, Вашингтон), разведенные в отношении 1:1,000 с последующим реагированием при 4°C в течение 30 минут. Затем этапы промывки повторяли два раза и реакцию связывания антитела с мембранным CD40L оценивали с использованием инструмента FACSVerse.

Пример 2: APB-A1

[0250] 1-1: Анализ связывания с использованием биослойной интерферометрии

[0251] Анализы связывания в реальном времени между человеческим сывороточным альбумином (HSA) (Sigma-Aldrich) и SL335 и между антигеном rhCD40L и APB-A1 проводили с использованием биослойной интерферометрии, снабженной системой Octet RED. Для оценки аффинности связывания HSA на биосенсоре AR2G (pH 5,0) иммобилизировали HSA в концентрации 20 мкг/мл и rhCD40L в концентрации 10 мкг/мл, не связавшиеся молекулы удаляли с поверхности биосенсора с использованием кинетического буфера (1 M этаноламин, pH 8,5). Чтобы идентифицировать аффинность связывания APB-A1 с HSA и rhCD40L проводили эксперименты с использованием концентраций, варьирующих от 10 нМ до 0,3125 нМ. Чтобы идентифицировать биспецифичное связывание, антиген rhCD40L иммобилизировали на биосенсоре AR2G и APB-A1 сначала подвергали реагированию при определенной концентрации, а затем проводили связывание с HSA. Кинетические параметры связывания и диссоциации получали с использованием программы Octet QK. Константы скорости связывания

рассчитывали таким образом, что наблюдаемые кривые связывания приводили к модели связывания 1:1.

[0252] 1-2: Выявление связывания и отсутствия связывания между белком APB-A1 и экспрессирующими CD40L клетками

[0253] Чтобы подтвердить, что белок APB-A1 связывается с клетками D1.1, экспрессирующими клеточный CD40L, проводили проточную цитометрию на базе Фармацевтического колледжа Кангвонского национального университета (College of Pharmacy, Kangwon National University). Клетки D1.1 центрифугировали для удаления супернатанта и затем ресуспендировали в буфере MACS (0,5% BSA, 2 мМ ЭДТА в 1 х ФСБ, фильтрованном через фильтр с размером пор 0,22 мкм) в концентрации, составляющей 1,0 $\times 10^6$ клеток/мл. После посева клеток в концентрации по 100 мкл ($1{,}0 \times 10^5$ клеток на исследование) в пробирку на 1,5 мл проводили центрифугирование в течение 5 минут при условиях 4°C и 500xg с удалением таким образом супернатанта. Проводили последовательные десятикратные разведения (1/10) APB-A1, IgG1 hu5c8 и SL335 в 5 временных точек, где каждое разведение начиналось с концентрации 1 мкг/мл, и каждые 100 мкл антител после первого разведения добавляли к клеточным остаткам в пробирке на 1,5 мл с использованием дозатора с последующим инкубированием при 4°C в течение 30 минут. В соответствующие пробирки добавляли по 500 мкл буфера MACS и затем промывали посредством центрифугирования в условиях 4°C, 500x g в течение 5 минут. После удаления супернатанта клеточные осадки растворяли путем добавления по 50 мкл образцов FITC-конъюгированных козьих антител против каппа-цепи человеческого иммуноглобулина, разведенных в отношении 1:1000 в буфере MACS (Lifespan Biosciences, Вашингтон, Сиэтл), с последующим инкубированием при 4°C в течение 30 минут и снова повторяли этап промывки. После удаления супернатанта, клеточные осадки растворяли путем добавления 200 мкл 0,4% параформальдегида (ПФА в буфере ФСБ) с последующим хранением при 4°C для иммобилизации и клетки анализировали с помощью прибора BD FACSverse.

[0254] 1-3: Анализ ингибирования взаимодействия CD40-CD40L *in vitro*

[0255] Для анализа ингибирующей активности APB-A1 в отношении взаимодействия CD40-CD40L использовали репортерные клетки HEKBlue™ CD40L (InvivoGen, Сан-Диего, Калифорния) и клетки D1.1, экспрессирующие mCD40L и rhCD40L, использовали в качестве доноров CD40L. Использовали буферы, содержащие или не содержащие 20 M HSA, добавленные в ФСБ Дульбекко (Corning), содержащий 0,2% бычий сывороточный альбумин, и осуществляли трехкратные разведения (1/3) APB-A1,

IgG1 hu5c8 и SL335, начиная с концентрации 200 нМ. После нанесения разведенных образцов по 20 мкл на 96-луночный планшет для клеточных культур (Corning) добавляли клетки D1.1 в одинаковых объемах по 1×10^4 клеток на лунку и инкубировали в инкубаторе при условиях 37°C и 5% CO_2 в течение 3 часов. Затем добавляли клетки HEKBlue™CD40L в плотности 5×10^4 клеток на лунку и затем инкубировали в инкубаторе при таких же условиях в течение 21 часа. Через 24 часа по 40 мкл супернатанта переносили из планшета на другие 96-луночный планшеты для ИФА/РИА (Corning) с использованием многоканальной пипетки. По 160 мкл раствора QUANTI-Blue™ (InvivoGen) добавляли в каждую лунку планшета, который оборачивали фольгой для защиты от света и хранили в CO_2-инкубаторе при 37°C в течение 1 часа с последующим измерением поглощения при 655 нМ с использованием спектрофотометра. По 70 мкл из 300 нг/мл антигена rhCD40L добавляли в пробирку, содержащую 70 мкл разбавленного образца, полученного путем трехкратных разведений (1/3) трех образов в одинаковой концентрации, начиная с 200 нМ, и затем позволяли реагировать при 37°C в CO_2-инкубаторе в течение 30 минут. Затем после разведения клеток HEKBlue™CD40L до конечной концентрации $3,125\times10^5$ клеток/мл 560 мкл разведенных клеток добавляли в пробирку, содержащую образец, смешанный с антигеном rhCD40L, пробирку переворачивали и клетки затем помещали в 96-луночный планшет для клеточных культур в концентрации, составляющей 200 мкл на лунку. Инкубирование осуществляли таким же образом, как в случае клеток D1.1, в течение 21 часа и полученным клеткам позволяли реагировать с субстратом с оценкой таким образом поглощения.

[0256] 1-4: Анализ агрегации тромбоцитов

[0257] Богатая тромбоцитами плазма крови человека (БоТП) была получена от нормального здорового добровольца после предварительного согласия и поставлялась из Центров крови корейского Красного Креста (KRBC) (Республика Корея). БоТП, антикоагулированную в кислом цитратном растворе на основе декстрозы (0,8% лимонная кислота, 2,2% цитрат натрия, 2,45% глюкоза), центрифугировали при 120xg в течение 10 минут для устранения красных клеток крови и затем центрифугировали при 360xg в течение 15 минут для получения осадков тромбоцитов. Тромбоциты растворяли в обедненной тромбоцитами плазме (ОбТП) в конечной концентрации $5,0\times10^8$/мл и все процедуры проводили при комнатной температуре (23 ± 2°C). Для оценки агрегации тромбоцитов проводили световую трансмиссионную агрегометрию с использованием агрегометра Chrono-log (CHRONO-LOG®, Хавертаун, Пенсильвания). БоТП

стимулировали в условиях постоянного перемешивания при субоптимальной концентрации АДФ (CHRONO-LOG®) в течение 5 минут после добавления иммунного комплекса (IC), то есть rhCD40L + IgG1 hu5c8 (30 мкг/мл + 60 нг/мл), rhCD40L + APB-A1 (30 мкг/мл + 40 нг/мл) или каждого из RhCD40L, IgG1 hu5c8 и APB-A1 в 5 - 10 мМ растворе $CaCl_2$ при 37°C в течение 2 минут. После завершения реакции агрегирования смесь тромбоцитов центрифугировали, измеряли высвобождение серотонина из супернатанта с использованием набора для выявления серотонина EIA (Labor DiagnostikaNord, Германия) в соответствии с инструкциями производителя.

[0258] 1-5: Фармакокинетический (ФК) анализ и фармакодинамический (ФД) анализ

[0259] (1) ФК анализ

[0260] Для оценки времени полужизни APB-A1 в сыворотке крови проводили фармакокинетический анализ на моделях макаков-крабоедов [Shin Nippon Biomedical Laboratories (SNBL, Япония)]. Белки APB-A1 вводили каждой из трех 3 групп макаков-крабоедов (самцов) в дозе, составляющей 5 мг/кг (группа 1) или 20 мг/кг (группа 2), с помощью однократной внутривенной инъекции. После введения собирали образцы крови в общем от 17 временных точек: 1 точка – до введения; 16 точек – через 0,25, 1, 2, 6 и 24 часа и 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 34 и 40 дней после введения. Концентрацию APB-A1, присутствующего в тромбоцитах каждого макака-крабоеда, измеряли с помощью ИФА.

[0261] (2) ФД Анализ

[0262] Анализировали эффективность APB-A1 в подавлении ответа антител против столбнячного анатоксина (TT) (Southern Research, Бирмингем, Алабама). В общем 4 группы образцов вводили внутривенно макакам-крабоедам (самкам; n=3/группа): носитель (группа отрицательного контроля: 20 ммоль/л фосфат натрия, pH 6,5), дексаметазон (DXT) (группа положительного контроля) и APB-A1 (5 мг/кг и 20 мг/кг). Сначала для индукции ответов антител против TT вводили внутримышечно первую дозу TT (5 Lf) на 1 день и вторую дозу вводили внутримышечно на 20 день для бустер-иммунизации. DXT инъецировали в общем 4 раза в дозе по 1 мг/кг, то есть за 2 дня до первой инъекции TT и на 1, 5 и 8 день после первой инъекции TT, и APB-A1 инъецировали один раз во время первой инъекции TT (на 1 день). Образцы крови, подлежащие анализу, собирали до инъекции на 10, 12, 14, 16, 20, 27, 30 и 40 день и измеряли значения антител IgG против TT с помощью ИФА. Для анализа ответов антител на второе введение проводили оценку различных иммунофенотипов B-клеток с помощью иммунофенотипирования. Собирали образцы крови в общем 5 раз примерно

через 2 часа после инъекции TT и на 20, 27, 30 и 40 день после инъекции TT и собранные образцы крови хранили в пробирках, содержащих K2-ЭДТА, для предотвращения свертываемости крови в необработанной фракции. Иммунофенотипирование осуществляли с использованием панелей антител против маркеров, таких как CD45, CD20, CD27, Ki67 и IgD, и заранее определенные фракции из четырех групп клеток, включая CD45+/20+, CD45+/20+/Ki67+, CD45+/20-/27hi/IgD- и CD45+20+/27+/IgD-/Ki67+, использовали для иммунофенотипирования.

Пример 3: APB-B1

[0263] 1-1: Исследование эффекта ингибирования опосредованной TNF-α цитотоксичности с использованием мышиных клеток L929

[0264] Для сравнения способности биспецифичного антитела и исходного антитела (Fab' цертолизумаба) ингибировать растворимый белок TNF-α, применяли мышиные клетки L929, экспрессирующие рецептор TNF на клеточной поверхности, и рекомбинантный растворимый белок TNF-α. Клетки L929 (Корейский банк клеточных линий) инкубировали в культуральной среде RPMI1640, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки, в инкубаторе при условиях 37°C, 5% CO_2 и не менее 80% влажности. Клетки L929 помещали в 96-луночный планшет для клеточных культур (Corning Inc., Нью-Йорк, штат Нью-Йорк) в концентрации, составляющей 5,0 $\times 10^4$ клеток/лунку, и затем инкубировали в инкубаторе при таких же условиях в течение 24 часов. Через 24 часа инкубирования имеющуюся культуральную среду удаляли, каждую лунку обрабатывали актиномицином D (Sigma-Aldrich), разведенным культуральной средой RPMI1640, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки, до концентрации 1 мкг/мл, и затем подвергали реагированию в течение 30 минут в инкубаторе при условиях 37°C, 5% CO_2 и не менее чем 80% влажности. Затем антитела в серийных разведениях в соответствии с варьирующими концентрациями наносили на каждую лунку и затем лунки обрабатывали рекомбинантными растворимыми белками TNF-α в концентрации 10 нг/мл и затем позволяли реагировать в течение 24 часов в инкубаторе при условиях 37°C, 5% CO_2 и влажности не менее 80%. Через 24 часа реагирования лунки обрабатывали 10 мкл CCK-8 (Dojindo, Япония) путем его нанесения с использованием многоканальной пипетки в лунки, содержащие соответствующие реагенты. Через 2 часа реакции супернатант переносили в другой планшет с использованием пипетки и поглощение измеряли при длине волны A450 нм.

[0265] 1-2: Ингибирование CD40L и TNF-α с использованием репортерных клеток HEK-blue ™ CD40L

[0266] Анализировали способность биспецифичного антитела и исходных антител (IgG1 руплизумаб и Fab' цертолизумаба) одновременно ингибировать любой или оба из клеточного мембранного CD40L и растворимого белка TNF-α. Для этого проводили анализ с использованием репортерных клеток CD40L HEK-Blue™ (InvivoGen, Сан Диего, Калифорния), экспрессирующих секретированную эмбриональную щелочную фосфатазу (SEAP) при реагировании с CD40L и TNF-α, клеток D1.1, экспрессирующих клеточный мембранный CD40L на поверхности, и рекомбинантных растворимых белков TNF-α. Клетки CD40L HEK-Blue™ инкубировали в культуральной среде DMEM (Thermo Fisher Scientific), содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки и антибиотик (норомицин, бластицидин и зеоцин) в инкубаторе при условиях 37°C, 5% CO_2 и влажности не менее 80%. Клетки D1.1 инкубировали в инкубаторе при тех же условиях с использованием культуральной среды RPMI1640, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки. Затем клетки D1.1 помещали в 96-луночный планшет для клеточных культур в концентрации $5{,}0\times10^4$ клеток на лунку или на 96-луночный планшет для клеточных культур наносили рекомбинантные белки растворимого TNF-α в концентрации 10 нг/мл. Для оценки реакций одновременного связывания с двумя видами образцов клетки D1.1 и рекомбинантные белки растворимого TNF-α помещали вместе в 96-луночный планшет для клеточных культур. Образцы в серийных разведениях (предварительно обработанные человеческим сывороточным альбумином) наносили на 96-луночный планшет для клеточных культур, в который помещали клетки и/или рекомбинантные белки и затем позволяли реагировать в течение 3 часов в инкубаторе при условиях 37°C, 5% CO_2 и влажности не менее 80%. Через 3 час реагирования клетки CD40L HEK-Blue™ наносили на все лунки планшета в концентрации 5×10^4 клеток на лунку и затем подвергали реагированию в инкубаторе при поддержании тех же условий в течение 21 часов. Затем наносили по 160 мкл реагента QUANTI-Blue (реагенты для выявления SEAP, InvivoGen), который подвергался реакции в воде при температуре 37°C в течение 30 минут, на все лунки нового 96-луночного планшета для клеточных культур и 40 мкл реакционного раствора, который подвергали реагированию в инкубаторе в течение 21 часа, помещали в каждую лунку, содержащую реагент Quanti-Blue, для последующего реагирования. После реагирования в инкубаторе при 37°C в течение 1 часа измеряли абсорбцию при длине волны 655 нм.

Пример 4. Результаты

[0267] 1. Результаты эксперимента для APB-A1

[0268] (1) Экспрессия и продукция APB-A1

[0269] Для получения антитела APB-A1 ген scFv hu5c8 (V_L + V_H)-подвижный линкер (SEQ ID NO:3 - GGGGSGGGGSGGGGS; линкер 1)-SL335 Fd (V_H + C_{H1}) (называемый тяжелой цепью APB-A1) и ген scFv hu5c8 (V_L + V_H)-подвижный линкер (SEQ ID NO:4 - GSTSGSGKPGSGEGSTKG; линкер 2)-SL335 каппа (V_L + CL) (называемый легкой цепью APB-A1) соединяли с помощью лигирующей ПЦР. После клонирования в вектор pcDNA3.3 и pOptiVEC соответственно гены трансфицировали в клеточную линию ExpiCHO-S™ для временной экспрессии и с помощью Вестерн-блоттинга определяли, нормально ли экспрессируется белок APBA1 массой 101,7 кДа (H-цепь APB-A1: 50,7 кДа, 483 аминокислоты, и L-цепь APB-A1: 50,9 кДа, 478 аминокислот). Затем для стабильной экспрессии в клетках CHO гены H-цепи APB-A1 и L-цепи APB-A1 клонировали в вектор pd2535nt и pd2539 соответственно для получения рекомбинантных векторов (Фигура 1A) и с помощью секвенирования аминокислот подтверждали отсутствие аномальности (Фигура 1B). На Фигуре 1A представлены тяжелая и легкая цепь APB-A1, встроенные в векторы pd2535nt и pd2539. На Фигуре 1B представлены аминокислотные последовательности H-цепи APB-A1 (в целом 483 аминокислот) и L-цепи APB-A1 (в целом 478 аминокислот), которые представляют собой H-цепь SL335 и L-цепь SL335, содержащие scFv hu5c8, связанные с помощью линкера 1 и линкера 2. Рекомбинантные векторы трансфицировали в клетки GS-null CHO K1 до их применения и указанные клетки подвергали скринингу с использованием MSX и пуромицина для получения таким образом стабильной клеточной линии CHO. Для продукции белка APB-A1 для его применения для оценки эффектов *in vitro* и *in vivo* стабильную клеточную линию CHO культивировали в биореакторе, получали супернатант и осуществляли очистку в целом с помощью трех этапов, включая аффинную хроматографию, катионообменную хроматографию и анионообменную хроматографию. Белок APB-A1 получали с выходом более 95% с помощью аффинной хроматографии в качестве первого этапа и образец APB-A1 получали с выходом 82% с помощью второго и третьего этапов катионо- и анионообменной хроматографии для удаления примесей и эндотоксина. Затем для оценки чистоты белка проводили эксклюзионную ВЭЖХ при нативном состоянии, результаты экспериментов, которые повторяли в целом три раза, подтвердили, что окончательный образец APB-A1 имел

чистоту 95% или более; на Фигуре 2А представлен один из повторов экспериментов. Чтобы определить степень чистоты и молекулярные массы образца, полученного посредством процесса очистки, указанный полученный образец анализировали с помощью ДСН-ПААГ при восстанавливающих, невосстанавливающих условиях с кипячением и невосстанавливающих условиях без кипячения (Фигура 2В). Соответственно, на Фигуре 2А представлен результат анализа характеристик APB-A1, идентифицированных с помощью ВЭЖХ, а на Фигуре 2В представлен результат анализа характеристик APB-A1, идентифицированных с помощью ДСН-ПААГ. Характеристики APB-A1, очищенного из супернатанта очищенной культуральной среды клеток GS-null CHO K1, определяли на градиентном 4 - 15% геле при восстанавливающих (R), невосстанавливающих (с кипячением) (NR (B)) и невосстанавливающих (без кипячения) (NR (NB)) условиях с помощью (A) ВЭЖХ и (B) ДСН-ПААГ. В анализе с помощью ВЭЖХ на Фигуре 2А образец белка анализировали с помощью эксклюзионной ВЭЖХ при отрицательных условиях (без ДТТ). Чистота составляла 95% или более. В геле ДСН-ПААГ-электрофореза, представленном на Фигуре 2В, белковые банды визуализировали с помощью окрашивающего раствора Ez-gel. Как описано выше, теоретические молекулярные массы полипептида H-цепи APB-A1 (50,7 кДа) и L-цепи APB-A1 (50,9 кДа) составляли 50,7 кДа и 50,9 кДа соответственно. При восстанавливающих (R) условиях были идентифицированы два белковых банда с молекулярными массами в области 50 кДа, однако было довольно сложно точно отличить два банда друг от друга, потому что молекулярные массы полипептидов H- и L-цепи APB-A1 очень сходны друг с другом (дорожка R на Фигуре 2В). При невосстанавливающих (с кипячением) условиях два банда идентифицировали в положениях, соответствующих немного меньшему размеру [дорожка NR(B) на Фигуре 2В], чем при восстанавливающих условиях, и результаты Вестерн-блоттинга подтвердили, что из двух бандов банд H-цепи APB-A1 был расположен немного выше банда L-цепи APB-A1 (данные не показаны). При невосстанавливающих условиях (без кипячения) было подтверждено, что молекулярная масса идентифицированного APB-A1 была меньше, чем его теоретическая молекулярная масса (101,6 кДа) [дорожка NR(NB) на Фигуре 2В].

[0270] (2) Молекулярные характеристики APB-A1

[0271] Для точного измерения массы белка APB-A1 проводили анализ с помощью Q-TOF при восстанавливающих и невосстанавливающих условиях. Измеренные значения массы тяжелой (H) и легкой (L) цепи APB-A1 составили 50,77 кДа и 50,98 кДа (Фигура 3). Фигура 3: были определены характеристики очищенного белка APB-A1 с

использованием прибора для масс-спектрометрии (ProteomeTech, Южная Корея). С помощью масс-спектрометрии образец белка анализировали при восстанавливающих и невосстанавливающих условиях. Теоретические молекулярные массы тяжелой и легкой цепи APB-A1 составили 50,777 Да и 50,994 Да, что по существу идентично значениям, измеренным с помощью масс-спектрометрического анализа в данной примере. Учитывая что APB-A1 не имеет сайта N-связанного гликозилирования, как было подтверждено с помощью программы предсказания гликозилирования, и что в действительности не наблюдалось каких-либо пиков, отличных от пиков H- и L-цепи APB-A1, при анализе с помощью Q-TOF, было предсказано, что у APB-A1 не будет наблюдаться N-связанного гликозилирования. Как подтверждено по результатам анализа, полученным с использованием программы для анализа pI, теоретическое значение pI для APB-A1 составляло 8,65, а действительные значения, измеренные с помощью изоэлектрического фокусирования (ИЭФ) при pH 3-10 и капиллярного изоэлектрического фокусирования (cIEF), составляли 9,16 и 9,2 соответственно (Фигуры 4A и 4B). Анализ pI для очищенного белка APB-A1 (Фигуры 4A и 4B) проводили с помощью реагентов ProteomeTech. Значения pI, идентифицированные с помощью геля для изоэлектрического фокусирования (ИЭФ) при pH 3-10, показанного на Фигуре 4A, и капиллярного изоэлектрического фокусирования (кИЭФ), показанного на Фигуре 4B, составляли 9,16 и 9,2 соответственно. Для точного анализа вариантов заряда APB-A1 проводили повторяющиеся эксперименты по вариантам заряда с использованием ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии (УВЭЖХ), и с помощью УВЭЖХ-анализа был получен профиль пиков, показывающий, что для 76,3% образцов наблюдались главные пики с константными зарядами, у 4,6% образцов наблюдались кислотные пики и у 19,1% образцов наблюдались основные пики (Фигура 5).

[0272] (3) Функциональные характеристики APB-A1 *in vitro*

[0273] Для оценки аффинности связывания APB-A1 с антигенами HSA и rhCD40L проводили биослойную интерферометрию с использованием инструмента Octet Red. Результат оценки подтвердил, что константы диссоциации KD APB-A1 для антигенов HSA и rhCD40L составляли 748 пкМ и 127 пкМ соответственно. Таким образом, было подтверждено, что равновесная константа диссоциации (K_D) APB-A1-HSA была примерно в 2,6 раз выше, чем K_D для SL335-HSA (748 пкМ по сравнению с 286 пкМ соответственно), и константа диссоциации APB-A1-rhCD40L была примерно в 2,6 раза выше, чем K_D для IgG1 hu5c8-rhCD40L (127 пкМ по сравнению с 49,6 пкМ соответственно).

[0274] Для подтверждения аффинности связывания APB-A1 с HSA и антигенами rhCD40L снова проводили биослойную интерферометрию с использованием инструмента Octet Red. Результат оценки подтвердил, что равновесная константа диссоциации (K_D) APB-A1 для антигенов HSA и rhCD40L составляла 628 пкМ и 186 пкМ соответственно. Среднее от двух результатов представлено в Таблице 5.

Таблица 5

Партнер связывания	Лиганд	KD(M)	Kon(1/Ms)	Kdis(1/s)
HSA	APB-A1	6.88E-10	8.04E+05	5.60E-04
hCD40L		1.57E-10	7.44E+05	1.15E-04

[0275] Кроме того, для идентификации того, что APB-A1 одновременно связывается с антигенами HSA и rhCD40L, проводили биослойную интерферометрию таким образом, что антиген rhCD40L иммобилизировали на биосенсоре AR2G и позволяли APB-A1 и HSA последовательно с ним реагировать. В результате было подтверждено, что APB-A1 способен одновременно связываться с антигенами HSA и rhCD40L (Фигура 6). Для оценки на клетках *in vitro* использовали клетки D1.1, экспрессирующие mCD40L, и в качестве предварительного эксперимента с использованием анализа с помощью проточной цитометрии определяли, связываются ли APBA1 и IgG1 hu5c8 (используемый в качестве контрольной группы) с mCD40L, экспрессированным клеткой D1.1. В соответствии с результатами анализа было подтверждено, что SL335 (используемый в качестве группы отрицательного контроля) не связывался с mCD40L клеток D1.1, тогда как APB-A1 и IgG1 hu5c8 связывались (Фигура 7). Фигура 7: APB-A1 (a) и IgG1 hu5c8 (b) позволяли связываться с клетками D1.1, экспрессирующими mCD40L, и SL335 (c), который не связывается с клетками D1.1, использовали в качестве группы отрицательного контроля. Затем для определения активности APB-A1, подавляющей взаимодействие CD40-CD40L, репортерные клетки HEKBlue™ CD40L объединяли с клетками D1.1 или антигеном rhCD40L в присутствии или в отсутствие HSA и затем подвергали реагированию путем добавления к ним APB-A1, IgG1 hu5c8 и SL335 (в концентрации, варьирующей от 0,01 до 22,2 нМ) с последующим измерением активности щелочной фосфатазы (AP) репортерных клеток (Фигуры 8A - 8D). На Фигурах 8A - 8D, способность APB-A1 и IgG1 hu5c8 ингибировать взаимодействие CD40L-CD40 в отсутствие HSA составляла 0,9907 нМ и 0,289 нМ (Фигура 8B) и в

присутствии HSA – 1,031 нМ и 0,4729 нМ (Фигура 8A). Значения IC_{50} для способности APB-A1 и IgG1 hu5c8 подавлять взаимодействие между растворимый CD40L и CD40 в отсутствие HSA составляли 1,031 нМ и 0,4729 нМ (Фигура 8D) и в присутствии HSA указанные значения составили 0,6371 нМ и 0,501 нМ (Фигура 8C). В эксперименте с использованием комбинации репортерных клеток и клеток D1.1 для APB-A1 была показана низкая супрессорную активность, которая была примерно в 3 раза ниже активности IgG1 hu5c8 в отсутствие HSA, тогда как в присутствии HSA для APB-A1 и IgG1 hu5c8 была показана по существу одинаковая супрессорная эффективность (Фигуры 8A и 8B). Подобным образом, в эксперименте с использованием комбинации репортерных клеток и антигена rhCD40L супрессорная активность APB-A1 была примерно в 2,1 раза ниже, чем активность IgG1 hu5c8 в отсутствие HSA, тогда как в присутствии HSA для APB-A1 и IgG1 hu5c8 была показана по существу одинаковая супрессорная эффективность (Фигуры 8C и 8D). Между тем SL335, используемый в качестве отрицательного контроля, не показал супрессорной эффективности при каких-либо условиях (Фигуры 8A-8D). В случае использования клеток D1.1 значения IC_{50}, отражающие способность ингибировать взаимодействие CD40L-CD40, которые были выведены из результатов, показанных на Фигурах 8A и 8B, составляли 0,9907 нМ в отсутствие HSA и 0,2988 нМ в присутствии HSA соответственно. Идентифицированное значение IC_{50} для IgG1 hu5c8, используемого в качестве положительного контроля, составляло примерно от 0,2 до 0,3 нМ, что указывает на то, что присутствие или отсутствие HSA не влияло на значение IC_{50} для IgG1 hu5c8 (Фигуры 8A и 8B). При использовании антигена rhCD40L значения IC_{50} составляли 1,031 нМ в отсутствие HSA и 0,6371 нМ в присутствии HSA, и идентифицированное значение IC_{50} для IgG1 hu5c8 составляло примерно от 0,47 до 0,5 нМ, что по существу совпадало с результатом эксперимента, указанного выше (Фигуры 8C и 8D).

[0276] (4) Анализ эффекта APB-A1 на агрегацию тромбоцитов

[0277] Определяли, будет ли APB-A1 вызывать агрегацию тромбоцитов, которая, как известно, является типичным побочным эффектом обычного антитела IgG против CD40L. Для этого получали иммунный комплекс (immune complex, IC) rhCD40L + IgG1 hu5c8 и IC rhCD40L + APB-A1 и затем позволяли реагировать с тромбоцитами, стимулированными АДФ, определяя таким образом агрегацию тромбоцитов путем измерения светопроницаемости. Результат показал, что только IC rhCD40L + IgG1hu5c8 приводил к интенсивной стимуляции агрегации тромбоцитов (Фигуры 9A - 9D). Фигуры 9A - 9D: БоТП предварительно культивировали в присутствии hCD40L (30 мкг/мл) и

IgG1 hu5c8 в различных концентрациях (6 нг/мл, 60 нг/мл и 600 нг/мл) или APB-A1 в различных концентрациях (4 нг/мл, 40 нг/мл и 400 нг/мл) в присутствии 5 - 10 мМ $CaCl_2$ при 37°C в течение 2 минут. Затем тромбоциты дополнительно стимулировали АДФ в концентрации ниже оптимальной концентрации при непрерывном перемешивании. В случае образца IC IgG1 hu5c8 + rhCD40L происходила агрегация тромбоцитов (Фигуры 9A и 9B), однако скорость агрегации тромбоцитов была низкой в случае образца rhCD40L + APB-A1 (Фигуры 9C и 9D). Данные представляют собой стандартное отклонение (SD) для экспериментов, включающих по меньшей мере 6 различных доноров. Для количественного анализа результатов, представленных на Фигурах 9A - 9D, рассчитывали % агрегацию тромбоцитов, и результат расчета показал, что для образца IC rhCD40L + IgG1 hu5c8 в концентрации 60 нг/мл и 600 нг/мл наблюдался ответ, составляющий примерно 80% или более, тогда как для образца rhCD40L + APB-A1 в концентрации 400 нг/мл наблюдалось менее чем примерно 10% от агрегации тромбоцитов (Фигура 9D). Кроме того, измеряли концентрацию высвобожденного серотонина при активации тромбоцитов, и оценка результатов показала, что уровень высвобождения серотонина не повышался при активации с помощью rhCD40L + APB-A1 и других групп образцов, тогда как уровень высвобождения серотонина был повышен до примерно 300 пкг/мл при активации с помощью IC rhCD40L + IgG1 hu5c8 (Фигура 10). Фигура 10: количество высвобожденного серотонина повышалось в случае комплекса рекомбинантный rhCD40L + IgG1 hu5c8, но в других группах не наблюдалось значимых отличий. Данные представляют собой среднее значение±стандартное отклонение (SD) для четырех или более независимых экспериментов (***$p<0,001$ по сравнению с контрольным IC (рекомбинантный hCD40L + IgG1 hu5c8)).

[0278] (5) Исследование фармакокинетических свойств APB-A1

[0279] Для оценки времени полужизни APB-A1 *in vivo* проводили фармакокинетический анализ с использованием моделей макаков-крабоедов (n=3/группа). APB-A1 вводили в двух дозах, составляющих 5 мг/кг и 20 мг/кг, с помощью однократной внутривенной инъекции. После сбора образцов крови в те же временные точки, которые использовали в разделе «Материалы и способы», измеряли концентрации APB-A1 в плазме крови с использованием ФК-ИФА (Фигура 11). На Фигуре 11 очищенные антитела APB-A1 инъецировали самцам макаков-крабоедов (n=3) в различных концентрациях (5 мг/кг и 20 мг/кг). Эксперименты проводили с помощью SNBL. Концентрации образцов APB-A1 в соответствующих точках измеряли с помощью ИФА, данные представляют собой среднее для проведенных экспериментов.

Время полужизни рассчитывали с использованием данных на основе результатов ИФА с помощью программы Phoenix WinNonlin (версия 6,4; Certara LP, Принстон, Нью-Джерси, США), и выявленное время полужизни для APB-A1 в концентрации 5 мг/кг и 20 мг/кг составляло примерно 7 и 9,6 дней соответственно. Таким образом, было понято, что время полужизни APB-A1 при дозе, составляющей 20 мг/кг, было повышено примерно в 1,4 раза по сравнению с дозой, составляющей 5 мг/кг. Значения Cmax составляли 143 мкг/мл и 509 мкг/мл при дозах 5 мг/кг и 20 мг/кг соответственно, и скорости почечного клиренса (CL) составляли 4,44 мл/день/кг и 4,72 мл/день/кг, что отражало сходный уровень, независимо от дозы (Таблица 6).

Таблица 6

Вид	Группа	Уровень однократной дозы (мг/кг)	$T_{1/2}$	C_{max}	AUC_{inf}	CL	V_{dss}
			(день)	(мкг/мл)	(мкг·день/мл)	(мл/день/кг)	(мл/кг)
Макак-крабоед	1	5	6.94 ± 4.6	143 ± 18	1130 ± 80	4.44 ± 0.32	54.1 ± 9.7
	2	20	9.59 ± 0.79	509 ± 23	4290 ± 580	4.72 ± 0.6	64.1 ± 6.0

[0280] (6) Фармакодинамический анализ APB-A1

[0281] Для оценки активности APB-A1 *in vivo* проводили фармакодинамическое исследование на макаках-крабоедах (n=3/группа). Сначала животным дважды инъецировали TT внутримышечно для индукции иммунного ответа, опосредованного первичными антителами, и иммунного ответа, опосредованного антителами памяти против TT, и вводили внутривенно наполнитель (отрицательный контроль, однократная инъекция), положительный контроль (DXT; 1 мг/кг, 4-кратная инъекция) и APBA1 (5 мг/кг или 20 мг/кг, однократная инъекция) каждому животному и измеряли концентрации антител IgG против TT, продуцированных в сыворотке, с помощью ИФА. В результате, несмотря на то что первичный иммунный ответ IgG против TT, индуцированный однократной инъекцией TT, не был статистически значимым, контроль, представляющий собой наполнитель, индуцировал нормальный первичный иммунный ответ IgG против TT, тогда как первичный иммунный ответ IgG против TT не наблюдали группах, которым инъецировали DXT и APB-A1 (Фигура 12A). Как показано на Фигурах 12A и 12B, для анализа ингибирования ответов, опосредованных антителами памяти, самкам макаков-крабоедов (n=3) инъецировали столбнячный

анатоксин (TT) с наполнителем, DXT и APB-A1 (5 мг/кг и 20 мг/кг). Эксперименты проводили с помощью SNBL. (A) Уровень антител против TT измеряли с помощью ИФА. (B) Процент B-клеток памяти значительно снижался в обеих группах, получавших 5 мг/кг APB-A1 и 20 мг/кг APB-A1 (* $p<0,03$ по сравнению с контролем, представляющим собой наполнитель, по t-критерию). Через 20 дней после первичной инъекции TT для индукции иммунного ответа, опосредованного IgG памяти против TT, вводили вторую инъекцию TT и затем измеряли концентрации антител IgG против TT, продуцированных в сыворотке. В результате нормальные иммунные ответы IgG против TT наблюдались в контрольной группе, получавшей наполнитель, и группе, получавшей DXT, после второй инъекции TT; в группах, которым вводили APB-A1, на 27 день наблюдались статистически значимые дозозависимые эффекты ингибирования иммунного ответа IgG против TT после второго введения. Было подтверждено с помощью первичных ответов CD40-CD40L, что APB-A1 обладал супрессорной активностью, и процент популяции соответствующих групп сравнивали с помощью иммунофенотипирования. Результаты оценки популяции B-клеток памяти (CD45+20+/27+IgD-/Ki67+) и делящихся B-клеток (CD45+/20+/Ki67+) показали статистически значимую супрессорную активность APB-A1 вплоть до 27 дня после второй инъекции TT (Фигура 12B). В анализах на плазматических клетках (CD45+20-/27hi/IgD-) и общей популяции B-клеток (CD45+/20+) было подтверждено отсутствие различий между группами, и общие ингибирующие эффекты носителя, используемого в качестве контроля, постепенно снижались на 30 и 40 день (данные не показаны).

[0282] 2. Результаты экспериментов для APB-B1

[0283] (1) Получение биспецифичного антитела на основе SAFA

[0284] Для получения биспецифичных антител на основе SAFA цистеин, образующий межцепочечную дисульфидную связь между C_{H1} (шарнирный участок, EPKSC-) тяжелой цепи и CL (NRGEC-) легкой цепи замещали на серин (Ser) и использовали полученные мутантные формы Fab SL335, EPKSS- и NRGES-, с удаленными их них двумя межцепочечными дисульфидными связями. Фрагмент антитела scFv [с последовательностями гена V_H и V_L, происходящими из руплизумаба (или hu5c8)], связывающийся в человеческим CD40L, сливали с N-концами тяжелой и легкой цепи Fab SL335 с помощью пептидного линкера (GGGGS)3 или GSTSGSGKPGSGEGSTKG и фрагмент антитела Fv (с последовательностями генов V_H и V_L, происходящими из цертолизумаба пегола), связывающийся с TNF-α, фрагмент антитела Fv (с последовательностями генов V_H и V_L, происходящими из устекинумаба),

связывающийся с IL-23, и фрагмент антитела (с последовательностями генов V_H и V_L, происходящими из анифролумаба), связывающийся с INFAR1, сливали с С-концом Fab SL335 с помощью пептидных линкеров соответственно. В случае слияния Fv сливали С-конец V_H-фрагмента тяжелой цепи и С-конец V_L-фрагмента легкой цепи. Для сравнения функций антитела в зависимости от присутствия или отсутствия искусственной межцепочечной дисульфидной связи, образованной между фрагментами V_H и V_L Fv, в антитело формата $(scFv)_2$-Fab-Fv без дисульфидной связи были введены замены G44C в V_H (G542C, Фигура 14) и Q100C в V_L (Q593C, Фигура 13A), проводящие таким образом к получению форматов $(scFv)_2$-Fab-dsFv с дисульфидной связью соответственно. Как показано на Фигурах 13A и 13B, APB-B1a, конструкция $(scFv)_2$-Fab-Fv (a), и APB-B1b, конструкция $(scFv)_2$-Fab-dsFv (b), содержат scFv против CD40L, Fab против HSA и Fv против TNF-α (с наличием или отсутствием дисульфидной связи), связанные с помощью пептидных линкеров (GGGGS)3 (SEQ ID NO:3) и GSTSGSGKPGSGEGSTKG. $(scFv)_2$-Fab-dsFv содержит межцепочечную дисульфидную связь (ss) между вариабельным участком легкой цепи (V_L) и вариабельным участком тяжелой цепи (V_H) фрагмента dsFv против TNF-α, тогда как $(scFv)_2$-Fab-Fv не содержит межцепочечную дисульфидную связь. На Фигуре 13C представлена схема, иллюстрирующая рекомбинантный pD2539 и рекомбинантный pD2535NT после клонирования ДНК. На указанных Фигурах биспецифичные антитела, слитые с Fv и dsFv, происходящим из цертолизумаба, называются APB-B1a и APB-B1b соответственно (Фигуры 13A и 13B).

[0285] На Фигуре 14 остаток G542C тяжелой цепи и остаток Q593C легкой цепи выделены жирным шрифтом для обозначения межцепочечной дисульфидной связи между тяжелой и легкой цепями APB-B1b. Остатки пептидных линкеров [(GGGGS)3 и GSTSGSGKPGSGEGSTKG] подчеркнуты. Полученный таким образом белок, представляющий собой биспецифичное антитело на основе SAFA, имеет теоретический размер, составляющий до 128 кДа. Для использования системы экспрессии на основе клеток CHO два гена, кодирующих полипептиды, составляющие APB-B1a или APB-B1b (N'-scFv против CD40L-H-цепь SL335- V_H против TNF-α-C' и N'-scFv против CD40L-L-цепь SL335-V_L противTNF-α-C'), клонировали в векторы pD2535NT и pD2539, представляющие собой векторы для экспрессии в клетках млекопитающих соответственно, с получением таким образом рекомбинантного вектора pD2535NT и рекомбинантного вектора pD2539 (Фигура 13C). Биспецифичные антитела на основе SAFA, происходящие из генов устекинумаба и анифролумаба, клонировали таким же

образом, как описано выше, с получением таким образом рекомбинантного вектора pD2535NT и рекомбинантного вектора pD2539 (данные не показаны).

[0286] Для получения белков, представляющих собой биспецифичное антитело на основе SAFA, полученный рекомбинантный вектор pD2535NT и рекомбинантный вектор pD2539, клетки ExpiCHO и клетки GS-null CHO-K1 HD-BIOP3 использовали для временной экспрессии и продукции стабильного пула. Рекомбинантные клетки CHO культивировали во флаконе в течение от 7 до 9 дней и затем центрифугировали с получением таким образом культуральных сред с 90% выживаемостью клеток. С точки зрения количественной оценки экспрессии при временной экспрессии, количественная экспрессия конструкций $(scFv)_2$-Fab-Fv без дисульфидной связи была в 1,5 - 3 раза выше по сравнению с конструкцией $(scFv)_2$-Fab-dsFv с дисульфидной связью во всех трех биспецифичных антителах на основе SAFA, происходящих из генов цертолизумаба, устекинумаба и анифролумаба. Фрагменты APB-B1a, продуцированные в стабильном пуле, культивировали во флаконе в течение 7 дней с достижением концентрации примерно 150 мг/л.

[0287] (2) Продукция биспецифичного антитела на основе SAFA

[0288] Для сравнения размеров и паттернов биспецифичных антител на основе SAFA, очищенных с помощью аффинной хроматографии, проводили анализ с помощью ДСН-ПААГ при восстанавливающих и невосстанавливающих условиях, как показано на Фигуре 15. При восстанавливающих условиях белковые банды наблюдали в положениях от 60 до 75 кДа, что совпадает с теоретическим размером каждой из тяжелой и легкой цепей scFv-H-цепь Fab-V_H Fv и scFv-L-цепь Fab-V_L Fv фрагментов $(scFv)_2$-Fab-Fv и $(scFv)_2$-Fab-dsFv, то есть 64 кДа (Фигура 15A), и банды для тяжелой и легкой цепи $(scFv)_2$-Fab выявлялись в положениях 45 - 60 кДа (Фигура 15A). Между тем, при невосстанавливающих условиях (с кипячением) два белковых банда, соответствующих тяжелой и легкой цепи $(scFv)_2$-Fab-Fv без межцепочечной дисульфидной связи, сформированной между тяжелой и легкой цепями, наблюдали в положениях 60 - 75 кДа, как и в случае восстанавливающих условий; а в случае $(scFv)_2$-Fab-dsFv с дисульфидной связью, образованной между тяжелой и легкой цепями, один белковый банд наблюдался в положении 100 - 140 кДа, что находится в диапазоне теоретического размера, составляющего 128 кДа (Фигура 15B). При невосстанавливающих условиях (без кипячения) в случае $(scFv)_2$-Fab-Fv банд наблюдался в положении, примерно соответствующем размеру 130 кДа, что соответствует суммарному размеру тяжелой и легкой цепи, и два белковых банда для отдельно расположенных тяжелой и легкой цепей

также неожиданно были обнаружены в положениях в диапазоне 60 - 75 кДа, как и в случае невосстанавливающих условий (с кипячением) (Фигура 15C). Фигуры 15A, 15B и 15C представляют собой результаты анализа с помощью ДСН-ПААГ, проведенного при восстанавливающих, невосстанавливающих и невосстанавливающих (без кипячения) условиях соответственно. Четыре образца на основе SAFA, включая (1) $(scFv)_2$-Fab, (2) родственное цертолизумабу BsAb (APB-B1), (3) родственное устекинумабу BsAb, (4) родственное анифролумабу BsAb наносили в каждую лунку в варьирующем количестве, составляющем до 2 мкг. На Фигуре 15D представлены результаты анализа с помощью эксклюзионной ВЭЖХ для очищенных конструкций $(scFv)_2$-Fab-Fv (до 25 мкг). Димер $(scFv)_2$-Fab-dsFv указан с помощью стрелки. В случае конструкции $(scFv)_2$-Fab-dsFv отдельно расположенные банды для тяжелой и легкой цепи не визуализировались, тогда как наблюдались два банда в положениях в диапазоне от 100 до 140 кДа, а также белковый банд был идентифицирован в положении, подобном или превышающем 245 кДа, предположительно соответствующем положению димера $(scFv)_2$-Fab-dsFv. Чтобы определить результаты ДСН-ПААГ для невосстанавливающих условий(без кипячения), белки $(scFv)_2$-Fab-Fv и $(scFv)_2$-Fab-dsFv, каждый из которых находился в нативном состоянии, анализировали с помощью эксклюзионной ВЭЖХ. Результаты анализа показали, что белок $(scFv)_2$-Fab-dsFv содержал малое количество димеров $(scFv)_2$-Fab-dsFv, как и результаты ДСН-ПААГ-электрофореза (указано с помощью стрелки). В случае $(scFv)_2$-Fab-Fv пик появлялся только в положении мономера, а пики, соответствующие тяжелой и легкой цепям, которые были идентифицированы с помощью ДСН-ПААГ как отдельно расположенные банды, не наблюдались (Фигура 15D). Таким образом, предполагается, что отдельно расположенные тяжелая и легкая цепи полипептида, как показано в эксперименте по анализу белкового образца $(scFv)_2$-Fab-Fv с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза при невосстанавливающих условиях (без кипячения), наблюдаются в виде двух бандов в связи с частичным расщеплением нековалентной связи, присутствующей между тяжелой и легкой цепями, вызванным ДСН, присутствующим в эксперименте с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза, или переносом тепла на белок во время эксперимента.

[0289] (3) Очистка белка, представляющего собой биспецифичное антитело на основе SAFA

[0290] До очистки белков APB-B1a и APB-B1b, выделенных с помощью аффинной хроматографии, образцы белков анализировали с использованием ДСН-ПААГ и

эксклюзионной ВЭЖХ (Фигуры 15A - 15D). Для удаления белков, идентифицированных в положениях димера APB-B1b (вплоть до 245 кДа) (Фигуры 15C и 15D), проводили катионообменную хроматографию с использованием смолы CM-Sepharose FF. Для белкового образца APB-B1a, идентифицированного с высокой степенью чистоты только с помощью аффинной хроматографии, проводили анионообменную хроматографию с использованием смолы Q-Sepharose HP. Соответствующие этапы очистки осуществляли с использованием системы AKTA pure 150 L и продукт конечной очистки определяли с помощью эксклюзионной ВЭЖХ. Неудаленные белки APB-B1b, соответствующие положениям димера, полученные после аффинной хроматографии, дополнительно удаляли с помощью катионообменной хроматографии (Фигура 16B), и пик был идентифицирован в точке, соответствующей времени удерживания, сходному с времени удерживания для APB-B1a (Фигура 16A). Как показано на Фигурах 16A и 16B, конструкцию на основе SAFA анализировали на колонке TSKgel UltraSW Aggregation (в буфере на основе 20 мМ лимонной кислоты, pH 5,5) в нативном состоянии при длине волны 280 нм. APB-B1a (a) очищали с помощью аффинной хроматографии на матрице CaptureSelect IgG-C_{H1} и анионообменной хроматографии на смоле Q-Sepharose HP. APB-B1b (b) очищали с помощью аффинной хроматографии на матрице CaptureSelect IgG-C_{H1} и катионообменной хроматографии на смоле CM-Sepharose FF.

[0291] (4) Сравнение стабильности белка в зависимости от присутствия дисульфидной связи и оптимального для стабильности белка pH-буфера

[0292] Для сравнения стабильностей белка $(scFv)_2$-Fab-Fv и $(scFv)_2$-Fab-dsFv в зависимости от присутствия или отсутствия межцепочечной дисульфидной связи в Fv, три вида биспецифичных антител на основе SAFA, происходящих из генов цертолизумаба, устекинумаба и анифролумаба, подвергали последовательной термообработке при температуре от 20°C до 90°C в буфере на основе фосфата натрия (pH 7,0) и температуры денатурации белка измеряли с помощью ПЦР в реальном времени с использованием красителя SYPRO Orange, который связывается с гидрофобными аминокислотами. Результат показал, что температуры денатурации белка варьировали в соответствии с Fv-клонами трех типов биспецифичных антител на основе SAFA, но было подтверждено, что $(scFv)_2$-Fab-Fv и $(scFv)_2$-Fab-dsFv денатурировали при одинаковой температуре независимо от присутствия дисульфидной связи (Таблица 7a). Для выявления оптимального буфера, который способствует стабильности при хранении белка APB-B1, измеряли температуры денатурации белка таким же образом, как описано выше, путем термообработки белка при постепенном

повышении температуры плавления, варьирующей от 20°C до 90°C, при условиях pH от 3,0 до 11,0 (Таблица 7b и Фигура 17). 1 мг/мл каждого из очищенных белков APB-B1a и APB-B1b, помещенных в различные буферы и инкубированных при 4°C в течение одного дня, отбирали и анализировали с использованием циклера Light Cycler 480 II (ПЦР в реальном времени) и красителя SYPRO Orange (Фигура 17). В результате было показано, что при различных условиях pH у белков наблюдалась равная температура денатурации, независимо от присутствия или отсутствия дисульфидной связи в Fv. Кроме того, денатурация белка начиналась при относительно низкой температуре в условиях низкого уровня pH (от 3,0 до 4,0) и высокого уровня pH (от 9,0 до 11,0). Однако при экстремально кислотных или основных условиях, таких как уровень pH 3,0 или 11,0, денатурация белка начиналась при температуре 4°C. Для образца белка APB-B1, присутствующего в виде структуры, обладающей наиболее высокой термостабильностью, уровень pH составлял от 5,0 до 7,0 и белок APB-B1 проявлял наиболее высокую термостабильность во всех из буферов на основе лимонной кислоты, гистидина и фосфата натрия при условиях pH 6,0 (Tm = 61°C) (Таблица 7b).

Таблица 7a

Буфер (pH)	Клон	Конструкции	Tm (°C)
Фосфат натрия (pH 7,0)	Цертолизумаб	$(scFv)_2$-Fab-dsFv	60,3
		$(scFv)_2$-Fab-Fv	60,5
	Устекинумаб	$(scFv)_2$-Fab-dsFv	59,9
		$(scFv)_2$-Fab-Fv	59,2
	Анифролумаб	$(scFv)_2$-Fab-dsFv	54,8
		$(scFv)_2$-Fab-Fv	54,8

Таблица 7b

		Tm (°C)	
Буфер	**pH**	**APB-B1a**	**APB-B1b**
Лимонная кислота	3,0	41,82	41,81
	4,0	51,83	51,77
	5,0	61,23	61,06
	6,0	61,54	61,36
Ацетат натрия	4,0	57,06	57,18
	5,0	61,15	61,14
Гистидин	5,0	59,69	59,71

	6,0	61,16	61,19
	7,0	60,04	60,51
Фосфат натрия	6,0	61,84	61,56
	7,0	60,42	60,20
	8,0	58,02	58,13
Карбонат натрия	9,0	51,01	51,24
	11,0	4,00	4,00

[0293] (5) Определение антигенной специфичности и аффинности биспецифичного антитела на основе SAFA

[0294] Значения аффинности связывания очищенных биспецифичных антител APB-B1a и APB-B1b, связывающихся с тремя различными антигенами, то есть HSA, CD40L и TNF-α, определяли с помощью ИФА и БСИ (Фигуры 18A - 18C и Таблица 8). Фигуры 18A - 18C: три белка-мишени, то есть человеческий сывороточный альбумин (Фигура 18A), CD40L (Фигура 18B) и TNF-α (Фигура 18C), наносили на 96-луночный планшет MaxiSorp в концентрации 1 мкг/мл. Антителам APB-B1a, APB-B1b и исходному антителу позволяли связываться с мишенями при pH 7,4. HRP-конъюгированные козьи антитела против человеческого Fd использовали в качестве вторичных антител. Данные анализировали с использованием ИФА-ридера при 450 нм. * исходные антитела: Fab против HSA (SL335), IgG против CD40L (руплизумаб), IgG против TNF-α (адалимумаб) и Fab против TNF-α (цертолизумаб). Результат ИФА показал, что сила связывания APB-B1a или APB-B1b с человеческим сывороточным альбумином была снижена примерно в 2 - 3 раза по сравнению с Fab SL335, используемым в качестве контроля (Фигура 18A), а при оценке аффинности с использованием БСИ равновесные константы диссоциации (KD) APBB1a, APB-B1b и Fab SL335 для человеческого сывороточного альбумина по результатам измерения составили 765 пкМ, 809 пкМ и 286 пкМ соответственно (Таблица 8). При оценке способности антител APB-B1a и APB-B1b связываться с CD40L для указанных двух биспецифичных антител была показана примерно в 1,5 раза сниженная способность связывания по сравнению с IgG1 против CD40L человека (руплизумабом), используемым в качестве исходного антитела (Фигура 18B). Также измеряли аффинности связывания APB-B1a, APB-B1b и исходного антитело и получили значения KD, составляющие 192 пкМ, 167 пкМ и 49 пкМ соответственно (Таблица 8). Значения аффинности APB-B1a и APB-B1b в отношении антигена TNF-α по результатам измерения с помощью ИФА были в 1,5 - 2 раза ниже по сравнению с аффинностью в

отношении антигена TNF-α исходного антитела Fab' (Фигура 18C), и на основе значений аффинности связывания APB-B1a, APB-B1b и исходного антитела по результатам измерения с помощью БСИ были получены значения KD, составляющие 164 пкМ, 446 пкМ и 157 пкМ соответственно (Таблица 8), что сходно с паттернами, полученными с помощью ИФА и БСИ, как описано выше.

[0295] Кроме того, чтобы идентифицировать способность APB-B1a одновременно связываться с тремя видами антигенов, проводили БСИ (Таблица 8). 500 нМ CD40L подвергали реагированию с биосенсором AR2G для его иммобилизации на указанном сенсоре и 25 нМ APB-B1a подвергали реагированию для связывания с иммобилизированным CD40L. Затем человеческому сывороточному альбумину позволяли реагировать с APB-1a в концентрации, превышающей до 10 раз концентрацию APB-1a, чтобы позволить насыщение сайта связывания альбумина APB-B1a, и человеческому сывороточному альбумину в идентичной концентрации позволяли реагировать с 50 нМ TNF-α. Результаты представлены на Фигуре 19. Фигура 19: рекомбинантный человеческий CD40L иммобилизировали на биосенсоре AR2G в буфере на основе ацетата натрия, 10 мкг/мл, pH 5,0. APB-B1a наносили в концентрации, составляющей 3,2 мкг/мл (этап ассоциации 1). HSA наносили в концентрации, составляющей 13,2 мкг/мл (этап ассоциации 2) и HSA и TNF-α наносили в концентрации 13,2 мкг/мл и 2 мкг/мл (этап ассоциации 3). Каждый этап ассоциации осуществляли в течение 900 секунд. Данные анализировали с использованием программы Octet DataAnalysis8.

Таблица **8**

	APB-B1a			**APB-B1b**			**Исходное антитело***		
	K_D (M)	**Kon (1/Ms)**	**Kdis (1/s)**	**K_D (M)**	**Kon (1/Ms)**	**Kdis (1/s)**	**K_D (M)**	**Kon (1/Ms)**	**Kdis (1/s)**
HSA	7,65E-10	5,49E+05	4,20E-04	8,09E-10	5,01E+05	4,05E-04	2,86E-10	1,01E+06	2,88E-04
CD40L	1,92E-10	5,90E+05	1,13E-04	1,67E-10	5,55E+05	9,27E-05	4,96E-11	3,26E+05	1,62E-05
TNF-α	1,64E-10	2,30E+05	3,82E-05	4,46E-10	2,46E+05	1,09E-04	1,57E-10	4,95E+05	7,75E-05

[0296] В таблице 8 аффинности связывания очищенного APB-B1a и APB-B1b анализировали с использованием инструмента Octet RED. Соответствующие антигены, HSA, CD40L и TNF-α, иммобилизировали на амин-реактивном биосенсоре второго поколения (AR2G) в концентрации 20 мкг/мл, 10 мкг/мл и 30 мкг/мл в буфере на основе ацетата натрия, pH 5,0. Очищенные антитела многократно обрабатывали в 1 ×

кинетическом буфере при pH 7,4 для двукратного разведения. Данные анализировали с использованием программы анализа данных Octet 8. * исходные антитела: Fab против HSA (SL335), IgG против CD40L1 (руплизумаб) и Fab против TNF-α' (цертолизумаб).

[0297] (6) Связывание биспецифичного антитела на основе SAFA с белком клеточной мембраны CD40L

[0298] С помощью FACSVerse определяли, будет ли scFv против CD40L очищенного биспецифичного антитела на основе SAFA специфично связываться с CD40L клеточной мембраны, экспрессированным на клеточной поверхности, а также с растворимым CD40L. В результате было подтверждено, что биспецифичное антитело на основе SAFA способно связываться с CD40L клеточной мембраны, подобно IgG1 против CD40L человека, используемому в качестве исходного антитела (Фигура 20). Фигура 20: клетки D1.1 получали в концентрации $3,0 \times 10^5$ клетки/реакция, FITC-конъюгированные козьи антитела против легкой каппа-цепи иммуноглобулина человека использовали в качестве вторичных антител для выявления конструкции на основе SL335, Fab SL335 (группа отрицательного контроля) и IgG против CD40L (группы положительного контроля). Сигналы связывания, на которые указывало количество клеток, измеряли с использованием проточного цитометра FASCVerse.

[0299] (7) Оценка на клетках ингибирующей способности биспецифичного антитела на основе SAFA

[0300] Чтобы определить, способны ли APB-B1a и APB-B1b ингибировать биологические функции TNF-α, оценивали ингибирующие способности *in vitro* с использованием мышиных клеток L929, экспрессирующих TNF-рецепторы клеточной мембраны и проявляющих TNF-α-зависимую клеточную цитотоксичность в присутствии актиномицина D (Фигура 21). Фигура 21: проводили 3-кратные непрерывные разведения образца TNF-α в концентрациях, снижающихся от 20 нМ до 0,24 нМ, и затем позволяли реагировать с мышиными клетками L929, экспрессирующими TNF-рецепторы и TNF-α (10 нг/мл) на клеточных мембранах в присутсвии актиномицина D. В качестве группы положительного контроля использовали Fab' против TNF-α (цертолизумаб). Выживаемость клеток измеряли с помощью набора для подсчета клеток kit-8. Ингибирующие способности оценивали путем добавления растворимого TNF-α (10 нг/мл) и серийных разведений антител, то есть Fab SL335, APB-B1a, APB-B1b и Fab'против TNFa в качестве исходного антитела. В результате в присутствии человеческого сывороточного альбумина (HSA) значение полумаксимальной ингибиторной концентрации (IC50) исходного антитела составило

0,6259 нМ, а значения IC50 APB-B1a и APB-B1b составляли 5,3 нМ и 12,7 нМ соответственно, что в 8-20 раз ниже по сравнению с исходным антителом. Однако SL335 не продемонстрировал ингибирующей способности (Фигура 21). Таким образом, было подтверждено, что APB-B1a и APB-B1b сохраняют способность ингибировать взаимодействие TNFα-TNFR. Для того чтобы определить, способны ли APB-B1a и APB-B1b одновременно связываться с CD40L клеточной мембраны, экспрессированным на клеточной поверхности, и растворимым TNF-α в присутствии человеческого сывороточного альбумина, с одновременным ингибированием таким образом путей взаимодействия CD40L-CD40 и TNF-α-TNFR, способность одновременного ингибирования оценивали с использованием репортерных клеток HEK-blue™ CD40L, которые экспрессируют как CD40 клеточной мембраны, так и TNF-рецептор клеточной мембраны. Фигуры 22A-22C: конструкции антител против CD40L или TNF-α многократно разводили в 4 раза при концентрации от 50 нМ до 0,0122 нМ. IgG против CD40L1 и против TNF-α использовали в качестве контрольных групп для соответствующих молекул-мишеней. Секретируемую эмбриональную щелочную фосфатазу (SEAP), экспрессируемую в результате реакции репортерных клеток HEK-blue™ с CD40L или TNF-α, измеряли с использованием реагента QUANTI-Blue и сигналы измеряли при длине волны A655 нм. Ингибирующие способности APB-B1a и APB-B1 идентифицировали путем измерения ответов репортерных клеток HEK-blue™ на различные взаимодействия, включая (a) взаимодействие между клетками D1.1, экспрессирующими CD40L, и клетками HEK-blue™, экспрессирующими CD40 (Фигура 22A), и (b) взаимодействие между клетками HEK-blue™, экспрессирующими рецептор TNF, и растворимым TNF-α (Фигура 22B), (c) и взаимодействие между клетками D1.1 и клетками HEK-blue™ и между клетками HEK-blue™ и растворимым TNF-α (Фигура 22C). Было идентифицировано, что значения IC50 APB-B1a и APB-B1b для CD40L клеточной мембраны составляли от 0,15 до 0,18 нМ, а значение IC50 исходного антитела (руплизумаба, IgG1) составляло 0,30 нМ (Фигура 22A), а ингибирующая способность APB-B1a и APB-B1b в отношении растворимого TNF-α (10 нг/мл) составила 3,05 нМ и 4,13 нМ, что в 6-8 раз ниже, чем у исходного антитела (цертолизумаба, Fab'), т.е. 0,56 нм, что является значением, сходным с экспериментами с использованием мышиных клеток L929 (Фигура 22B). В анализе одновременного ингибирования обоих антигенов – CD40L клеточной мембраны и растворимого антигена TNF-α – значения IC50 APB-B1a и APB-B1b составили 1,98 нМ и 3,79 нМ, что означает, что оба антигена были полностью (на 100%) заингибированы APB-B1a и APB-B1b. Однако исходное антитело Fab' против

TNF-α могло ингибировать только антиген TNF-α, что означает, что ингибирование общих ответов было достигнуто только примерно на 60%. В случае с CD40L IgG1, несмотря на то, что IgG1 против CD40L мог ингибировать CD40L, IgG против CD40L1 не мог ингибировать какие-либо из ответов в связи с крайне высокой активностью SEAP репортерных клеток в отношении неингибированного TNF-α, что сходно с результатом, наблюдаемым для Fab SL335 (отрицательный контроль). При этом при одновременной обработке двумя исходными антителами, Fab' против TNF-α и IgG против CD40L1 (комбинированная обработка), два вида мишеней полностью (на 100%) ингибировались двумя исходными антителами, как в случае биспецифичного антитела, а измеренное значение IC50 составило 0,47 нМ, что в 3-8 раз превышает соответствующее значение для APB-B1. Следовательно, несмотря на сходный уровень ингибирующей способность в отношении CD40L, предполагается, что два антитела обладали более низкой ингибирующей способностью по сравнению с комбинированным лечением в связи с различиями в ингибирующей способности в отношении TNF-α между двумя указанными антителами (Фигура 22C).

Пример 5. Дополнительные фармакокинетические и фармакодинамические анализы

[0301] (1) ФК анализ

[0302] Для оценки времени полужизни в сыворотке крови APB-A1 проводили дополнительный фармакокинетический анализ снова на моделях макаков-крабоедов (SNBL, Япония). Белки APB-A1 вводили каждому из 3 макаков-крабоедов (самцам) из каждой группы в дозе, составляющей 10 мг/кг (группа 1) или 30 мг/кг (группа 2) посредством однократной внутривенной инъекции. После введения собирали образцы крови в общем для 14 временных точек: временная точка 1 – до введения; следующие 13 временных точек – через 0,25, 1, 6, 12 и 24 часа и 4, 8, 13, 19, 26, 33, 40 и 47 дней после введения. Концентрацию APB-A1, присутствующего в сыворотке каждого макака-крабоеда, измеряли с помощью ИФА (SNBL, Япония).

[0303] (2) ФД Анализ

[0304] Оценивали образование антител против гемоцианина лимфы улитки (KLH), которое подавляется действием APB-A1 (SNBL, Япония). Макакам-крабоедам (самцам; n=5/группа) вводили внутривенно один раз в неделю (в общем 2 дозы) в общем 4 группы образцов: наполнитель (группа отрицательного контроля: L-гистидин в концентрации 20 ммоль/л, HCl, pH 5,8, 5% сахароза) и APB-A1 (3 мг/кг, 10 мг/кг и 30 мг/кг). Сначала

для индукции образования антител против KLH вводили первую подкожную инъекцию KLH (2 мг/кг) на -28 день и вторую подкожную инъекцию на 1 день (приблизительно чрез 1 час после окончания введения дозы исследуемых и контрольных изделий) для бустер-иммунизации. Инъекцию APB-A1 вводили в общем 2 раза во время второй инъекции KLH (на 1 день) и через неделю (на 8 день). Образцы крови собирали до первой инъекции KLH (на -28 день), на -21, -14, -7, 1 день (приблизительно за 30 минут до введения возы исследуемых и контрольных изделий), 4, 8 (приблизительно за 30 минут до введения дозы исследуемых и контрольных изделий), 11, 15, 22 и 29 день и титры антител IgG против KLH и IgM против KLH измеряли с помощью ИФА. Для анализа с помощью иммунофенотипирования на клетках периферической крови образцы крови собирали в общем 6 раз: до первой инъекции KLH (на -28 день) и на 1 день (приблизительно за 30 минут до введения дозы исследуемых и контрольных изделий), 4, 11, 22 и 29 день. Иммунофенотипирование осуществляли с использованием панелей антител для маркеров, таких как CD45, CD20, CD27, CD38, CD3, CD4, CD8 и Ki-67. Для ФК анализа собирали образцы крови на 1, 4, 8, 11, 15, 22 и 29 день (в общем 7 точек). Концентрацию APB-A1, присутствующего в сыворотке каждого макака-крабоеда, измеряли с помощью ИФА. Органы, подлежащие иммуногистохимическому анализу, вырезали на следующий день после вскрытия животных и обрабатывали с использованием автоматической системы заливки ткани через 2 дня после макропатологии. Три среза готовили в виде препаратов серийных срезов. Первый срез окрашивали гематоксилин-эозином (ГЭ) и второй и третий срезы использовали для иммуногистохимической (ИГХ) оценки. Для ИГХ препараты срезов окрашивали с использованием иммуноферментного метода с использованием следующих антител: мышиные антитела против CD20 (L26, Leica Biosystems, Германия) и мышиные антитела против Ki67 (MIB-1, Dako Денмарк A/S, Денмарк). Для статистического анализа данных проводили оценку однородности дисперсии с помощью критерия Бартлетта. В случае однородной дисперсии применяли критерий Даннетта для множественных сравнений между контрольной группой и каждой группой, получавшей исследуемое изделие. В случае неоднородной дисперсии по критерию Бартлетта применяли критерий по типу критерия Даннетта (критерий Миллера) для множественных сравнений между контрольной группой и каждой группой, получавшей исследуемое изделие.

[0305] (3) 2-недельное исследование токсического действия при повторном введении

[0306] Для определения потенциальной токсичности APB-A1 при лечении аутоиммунных заболеваний при ведении в виде двукратной внутривенной (медленной

болюсной) инъекции макакам-крабоедам с интервалом в 1 неделю оценивали следующие параметры и конечные точки в данном исследовании: клинические наблюдения, масса тела, клинические патологические параметры (гематологические параметры, свертываемость крови, клиническая химия и анализ мочи), результаты биоанализа и макроскопической аутопсии и масса органов.

[0307] (4) Результаты

[0308] (1) Дополнительное ФК исследование APB-A1

[0309] Для оценки времени полужизни APB-A1 *in vivo* проводили фармакокинетический анализ с использованием модели макаков-крабоедов (самцов, n=3/группа). APB-A1 вводили в двух дозах, составляющих 10 мг/кг и 30 мг/кг, посредством однократной внутривенной инъекции. После сбора образцов крови в те же временные точки, что и в разделах Материалы и способы, измеряли концентрацию APB-A1 в плазме крови с использованием ФК-ИФА (Фигура 23). Данные представляют собой среднее для проведенных экспериментов. Время полужизни рассчитывали с использованием данных на основе результата ИФА с помощью программы Phoenix WinNonlin (версия 6.4; Certara LP, Принстон, Нью-Джерси, США). Было выявлено, что время полужизни APB-A1 в дозе 10 мг/кг и APB-A1 в дозе 30 мг/кг составляло примерно 9,33 ± 1,54 и 10,1± 1,8 дня соответственно. Значения Cmax составляли примерно 347 мкг/мл и 1230 мкг/мл для дозы 10 мг/кг и 30 мг/кг соответственно, и скорость клиренса (CL) составляла 3,48 мл/день/кг и 3,44 мл/день/кг, что было сходные уровни независимо от дозы (Таблица 9).

Таблица 9. Дополнительные ФК данные на обезьянах

Виды	Группа	Уровень одной дозы (мг/кг)	$T_{1/2}$ (день)	C_{max} (мкг/мл)	AUC_{inf} (мкг·день/мл)	CL (мл/день/кг)	Vdss (мл/кг)
Макак-крабоед	1	10	9,33 ± 1,54	347 ± 24	2890 ± 240	3,48 ± 0,29	46,1 ± 4,7
	2	30	10,1 ± 1,8	1230 ± 70	8780 ± 880	3,44 ± 0,36	43,6 ± 3,5

[0310] (2) Дополнительное ФД исследование APB-A1

[0311] Ни в одной группе не наблюдалось животных, умерших или усыпленных из-за состояния агонии. Не было отмечено связанных с исследуемым изделием изменений в клинических признаках, массе тела или макропатологии в какой-либо группе. При

иммунофенотипировании клеток периферической крови было обнаружено снижение содержания делящиеся B-клеток в группах, получавших 30, 10, и/или 3 мг/кг APB-A1, по сравнению с контрольной группой (Фигуры 24A и 24B). По результатам измерения антител против KLH был отмечен сниженный титр антител IgG с 8 по 29 день в группах, получавших 10 и 30 мг/кг APB-A1, по сравнению с контрольной группой (* P<0,05, ** P<0,01: значимое отличие от контроля) (Фигура 25), тогда как не было отмечено связанных с исследуемым изделием изменений в титре антител IgM (данные не показаны). По результатам гистопатологической и иммуногистохимической оценки на 29 день наблюдалось снижение насыщенности клетками, количества CD20-положительных клеток и Ki67-положительных клеток герминативного центра подмышечных и подчелюстных лимфатических узлов в группах, получавших 10 и/или 30 мг/кг (Фигура 26 и Таблица 10). В ФК анализе значения Cmax и AUC0-t повышались практически пропорционально дозе между группами, получавшими 3 и 30 мг/кг, при первом и втором дозировании (Фигура 27 и Таблица 11).

Таблица 10. Гистопатологическая и иммуногистохимическая оценка

Гистопатологическая и иммуногистохимическая оценка (29 день)																	
Группа			**Носитель**				**APB-A1**										
Доза			**0**				**3 мг/кг**				**10 мг/кг**				**30 мг/кг**		
Животное №			**1**	**2**	**3**	**4**	**6**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**15**	**16**	**17**	**18**	**20**
Снижение, герминативный центр	Подмышечные лимфатические узлы	Насыщенность клетками	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	±	±	2+	+	2+	±
		CD20+ клетки	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	2+	±	2+	-
		Ki67+ клетки	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	±	±	2+	+	2+	±
	Паховые лимфатические узлы	Насыщенность клетками	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		CD20+ клетки	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Ki67+ клетки	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Подчелюстные лимфатические узлы	Насыщенность клетками	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		CD20+ клетки	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	±	-
		Ki67+ клетки	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	±

-: отсутствие аномальных изменений ±: очень слабые изменения + слабые изменения 2+: умеренные изменения 3+: выраженные изменения

Таблица 11. ФК результаты в ФД исследовании

Первое дозирование			
Уровень дозы (мг/кг)	3	10	30
Cmax (мкг/мл)	112 ± 14	355 ± 20	1080 ± 70
AUC0-t (мкг·день/мл)	377 ± 48	1190 ± 60	3560 ± 200

Второе дозирование			
Уровень дозы (мг/кг)	3	10	30
Cmax (мкг/мл)	141 ± 13	469 ± 55	1390 ± 200
AUC0-t (мкг·день/мл)	3990 ± 400	13700 ± 2200	40900 ± 6300

[0312] 2-недельное исследование токсического действия при повторном введении

[0313] Не было отмечено ни преждевременных смертей, ни клинических наблюдений или изменений массы тела, гематологических параметров, свертываемости крови, клинической химии или анализа мочи, ни каких-либо макроскопических изменений у самцов и самок, получавших APB-A1. Введение APB-A1 с помощью двукратной внутривенной (медленной болюсной) инъекции с интервалом в одну неделю хорошо переносилось макаками-крабоедами при уровне дозы до 100 мг/кг/доза.

[0314] Согласно настоящему изобретению, было подтверждено, что на основе существующего метода получения биспецифичных антител можно успешно получать конструкцию мультиспецифичного антитела нового формата, имеющего повышенную долгосрочную стабильность *in vivo*, которая было разработана авторами настоящего изобретения. В частности, мультиспецифичное антитело, которое способно связываться с CD40L, TNF-α или другими биоактивными эффекторами, может эффективно применяться в качестве терапевтических агентов для лечения разичных аутоиммунных заболеваний.

[0315] Приведенное выше описание конкретных вариантов реализации изобретения настолько полно отражает общий характер настоящего изобретения, что другие исследователи могут с легкостью модифицировать и/или адаптировать его для различных способов применения в пределах общей идеи настоящего изобретения с применением знаний в пределах уровня знаний в данной области техники. Таким образом, предполагается, что такие адаптации и модификации находятся в пределах значения и диапазона эквивалентов описанных вариантов реализации изобретения, на основе сведений и рекомендаций, предложенных в настоящей заявке. Следует понимать, что формулировки или термины используются в настоящей заявке в целях описания и не ограничивают настоящее изобретение, таким образом, специалист в данной области техники может интерпретировать указанные формулировки или термины, используемые в настоящей заявке, с учетом приведенных сведений и рекомендаций.

[0316] Охват и объем настоящего изобретения не ограничивается каким-либо из описанных выше примеров вариантов реализации и определяется исключительно следующей далее формулой изобретения и ее эквивалентами.

[0317] Все из различных аспектов, вариантов реализации и альтернативных вариантов, описанных в настоящей заявке, можно объединять с любыми и всеми вариантами.

[0318] Все публикации, патенты и патентные заявки, перечисленные в настоящей заявке, включены в настоящую заявку посредством ссылки в той же степени, как если бы было конкретно и отдельно указано, что каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка включена в настоящую заявку посредством ссылки.

ПРОМЫШЛЕННАЯ ПРИМЕНИМОСТЬ

[0319] Мультиспецифичное антитело согласно настоящему изобретению можно применять в разработке терапевтического агента для лечения аутоиммунного заболевания, обладающего повышенным временем удержания *in vivo* при снижении побочного эффекта, такого как тромбоэмболия.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Мультиспецифичное антитело, имеющее следующую структурную формулу:

где указанный антиген-связывающий фрагмент (Fab) представляет собой Fab антитела против сывороточного альбумина;

где R^1 и R^2 представляют собой биоактивные эффекторные фрагменты, связанные с N-концом Fab, где каждый из указанных фрагментов связан с вариабельным доменом тяжелой цепи или вариабельным доменом легкой цепи Fab;

где R^3 и R^4 представляют собой биоактивные эффекторные фрагменты, связанные с C-концом Fab, где каждый из указанных фрагментов связан с вариабельным доменом тяжелой цепи или вариабельным доменом легкой цепи Fab;

где m равен 0 или целому числу, составляющему 1 или более; и

где n равен 0 или целому числу, составляющему 1 или более.

2. Антитело по п. 1, отличающееся тем, что R^1 и R^2 представляют собой одинаковые или разные одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv).

3. Антитело по п. 1 или 2, отличающееся тем, что R^3 и R^4 представляют собой одинаковые или разные Fv-фрагменты или стабилизированные дисульфидными связями Fv (dsFv)-фрагменты.

4. Антитело по любому из пп. 1-3, отличающееся тем, что каждый из R^1, R^2, R^3 и R^4 связан с Fab с помощью одного или более линкеров.

5. Антитело по любому из пп. 1-4, отличающееся тем, что Fab содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий

(a) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SYGIS (SEQ ID NO:61),

CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность WINTYSGGTKYAQKFQG (SEQ ID NO:62), и

CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность LGHCQRGICSDALDT (SEQ ID NO:63);

(b) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SYGIS (SEQ ID NO:61),

CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RINTYNGNTGYAQRLQG (SEQ ID NO:64), и

CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность LGHCQRGICSDALDT (SEQ ID NO:63);

(c) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность NYGIH (SEQ ID NO:65),

CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO:66), и

CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность DVHYYGSGSYYNAFDI (SEQ ID NO:67);

(d) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SYAMS (SEQ ID NO:68),

CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность VISHDGGFQYYADSVKG (SEQ ID NO:69), и

CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AGWLRQYGMDV (SEQ ID NO:70);

(e) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AYWIA (SEQ ID NO:71),

CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность MIWPPDADARYSPSFQG (SEQ ID NO:72), и

CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность LYSGSYSP (SEQ ID NO:73); или

(f) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AYSMN (SEQ ID NO:74),

CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SISSSGRYIHYADSVKG (SEQ ID NO:75), и

CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность ETVMAGKALDY (SEQ ID NO:76).

6. Антитело по любому из пп. 1-5, отличающееся тем, что Fab содержит вариабельный домен легкой цепи, содержащий

(g) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSISRYLN (SEQ ID NO:77),

CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASRLES (SEQ ID NO:78), и

CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQSDSVPVT (SEQ ID NO:79);

(h) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSISSYLN (SEQ ID NO:80),

CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AASSLQS (SEQ ID NO:81), и

CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQSYSTPPYT (SEQ ID NO:82);

(i) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSIFNYVA (SEQ ID NO:83),

CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность DASNRAT (SEQ ID NO:84), и

CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQRSKWPPTWT (SEQ ID NO:85);

(j) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASETVSSRQLA (SEQ ID NO:86),

CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASSRAT (SEQ ID NO:87), и

CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQYGSSPRT (SEQ ID NO:88);

(k) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSVSSSSLA (SEQ ID NO:89),

CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASSRAT (SEQ ID NO:87), и

CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QKYSSYPLT (SEQ ID NO:90); или

(l) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSVGSNLA (SEQ ID NO:91),

CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASTGAT (SEQ ID NO:92), и

CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQYYSFLAKT (SEQ ID NO:93).

7. Антитело по любому из пп. 1-6, отличающееся тем, что Fab содержит определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AYSMN (SEQ ID NO:74), CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SISSSGRYIHYADSVKG (SEQ ID NO:75), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность ETVMAGKALDY (SEQ ID NO:76), и

определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSVGSNLA (SEQ ID NO:91), CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASTGAT (SEQ ID NO:92), и CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQYYSFLAKT (SEQ ID NO:93).

8. Антитело по любому из пп. 1-7, отличающееся тем, что Fab содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности SEQ ID NO:94, 95, 96, 97, 98 или 99.

9. Антитело по любому из пп. 1-8, отличающееся тем, что Fab содержит вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности SEQ ID NO:100, 101, 102, 103, 104 или 105.

10. Антитело по любому из пп. 1-9, отличающееся тем, что Fab содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности SEQ ID NO:94, 95, 96, 97, 98 или 99, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности SEQ ID NO:100, 101, 102, 103, 104 или 105, соответственно.

11. Антитело по любому из пп. 1-10, отличающееся тем, что Fab содержит домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45 (домен V_H-C_{H1}), и домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:46 (домен V_L-C_L).

12. Антитело по любому из пп. 1-11, отличающееся тем, что каждый линкер содержит от 1 до 20 аминокислот.

13. Антитело по любому из пп. 1-12, отличающееся тем, что каждый линкер содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:4.

14. Антитело по любому из пп. 1-13, отличающееся тем, что каждый линкер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:4.

15. Антитело по любому из пп. 1-14, отличающееся тем, что каждый из R^1 и R^2 представляет собой scFv антитела против CD40L hu5c8.

16. Антитело по любому из пп. 1-15, отличающееся тем, что каждый из R^1 и R^2 представляет собой scFv антитела против CD40L hu5c8, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности SEQ ID NO:47 или SEQ ID NO:48.

17. Антитело по любому из пп. 1-16, отличающееся тем, что каждый из R^1 и R^2 представляет собой scFv антитела против CD40L hu5c8, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:47 или SEQ ID NO:48.

18. Антитело по любому из пп. 1-17, отличающееся тем, что каждый из R^3 и R^4 представляет собой один или более биоактивных эффекторных фрагментов, выбранных из группы, состоящей из Fv против TNF-α, стабилизированного дисульфидной связью Fv (dsFv) против TNF-α, Fv против IL-23, dsFv против IL-23, антитела против IFNAR1 и dsFv против IFNAR1 .

19. Антитело по любому из пп. 1-18, отличающееся тем, что каждый из R^3 и R^4 представляет собой один или более биоактивных эффекторных фрагментов, содержащих Fv против TNF-α, содержащий аминокислотную последовательность тяжелой цепи, идентичную на 80% последовательности SEQ ID NO:49, и аминокислотную последовательность легкой цепи, идентичную на 80% последовательности SEQ ID NO:50, стабилизированный дисульфидной связью Fv (dsFv) против TNF-α, содержащий аминокислотную последовательность тяжелой цепи, идентичную на 80% последовательности SEQ ID NO:51, и аминокислотную последовательность легкой цепи, идентичную на 80% последовательности SEQ ID NO:52, Fv против IL-23, содержащий аминокислотную последовательность тяжелой цепи, идентичную на 80% последовательности SEQ ID NO:53, и аминокислотную последовательность легкой цепи, идентичную на 80% последовательности SEQ ID NO:54, dsFv против IL-23, содержащий аминокислотную последовательность тяжелой цепи, идентичную на 80% последовательности SEQ ID NO:55, и аминокислотную последовательность легкой цепи, идентичную на 80% последовательности SEQ ID NO:56, антитело против IFNAR1, содержащее аминокислотную последовательность тяжелой цепи, идентичную на 80% последовательности SEQ ID NO:57, и аминокислотную последовательность легкой цепи, идентичную на 80% последовательности SEQ ID NO:58, и/или dsFv против IFNAR1, содержащий аминокислотную последовательность тяжелой цепи, идентичную на 80% последовательности SEQ ID NO:59, и аминокислотную последовательность легкой цепи, идентичную на 80% последовательности SEQ ID NO:60.

20. Антитело по любому из пп. 1-19, отличающееся тем, что каждый из R^3 и R^4 представляет собой один или более биоактивных эффекторных фрагментов, содержащих Fv против TNF-α, содержащий последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:49 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:50, стабилизированный дисульфидной связью Fv (dsFv) против TNF-α, содержащий последовательность

тяжелой цепи SEQ ID NO:51 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:52, Fv против IL-23, содержащий последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:53 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:54, dsFv против IL-23, содержащий последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:55 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:56, антитело против IFNAR1, содержащее последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:57 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:58, и/или dsFv против IFNAR1, содержащий последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:59 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:60.

21. Композиция, содержащая мультиспецифичное антитело по любому из пп. 1-20 и вспомогательное вещество.

22. Фармацевтическая композиция, содержащая мультиспецифичное антитело по любому из пп. 1-20 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

23. Способ лечения аутоиммунного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, где указанный способ включает введение указанному субъекту фармацевтической композиции по п. 22.

24. Вектор экспрессии, содержащий:

(a) промотор,

(b) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антиген-связывающий фрагмент (Fab), который связывается с сывороточным альбумином, и

(c) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую биоактивный эффекторный фрагмент и линкер,

где указанный промотор, первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая молекула нуклеиновой кислоты функционально связаны.

25. Вектор по п. 24, характеризующийся тем, что вторая молекула нуклеиновой кислоты кодирует 2 или более биоактивных эффекторных фрагментов и линкеров.

26. Вектор по п. 24 или 25, характеризующийся тем, что первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую Fab, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий

(a) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SYGIS (SEQ ID NO:61),

CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность WINTYSGGTKYAQKFQG (SEQ ID NO:62), и

CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность LGHCQRGICSDALDT (SEQ ID NO:63);

(b) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SYGIS (SEQ ID NO:61),

CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RINTYNGNTGYAQRLQG (SEQ ID NO:64), и

CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность LGHCQRGICSDALDT (SEQ ID NO:63);

(c) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность NYGIH (SEQ ID NO:65),

CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO:66), и

CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность DVHYYGSGSYYNAFDI (SEQ ID NO:67);

(d) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SYAMS (SEQ ID NO:68),

CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность VISHDGGFQYYADSVKG (SEQ ID NO:69), и

CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AGWLRQYGMDV (SEQ ID NO:70);

(e) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AYWIA (SEQ ID NO:71),

CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность MIWPPDADARYSPSFQG (SEQ ID NO:72), и

CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность LYSGSYSP (SEQ ID NO:73); или

(f) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AYSMN (SEQ ID NO:74),

CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SISSSGRYIHYADSVKG (SEQ ID NO:75), и

CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность ETVMAGKALDY (SEQ ID NO:76).

27. Вектор по любому из пп. 24-26, характеризующийся тем, что первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую Fab, содержащий вариабельный домен легкой цепи, содержащий

(g) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSISRYLN (SEQ ID NO:77),

CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASRLES (SEQ ID NO:78), и

CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQSDSVPVT (SEQ ID NO:79);

(h) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSISSYLN (SEQ ID NO:80),

CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AASSLQS (SEQ ID NO:81), и

CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQSYSTPPYT (SEQ ID NO:82);

(i) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSIFNYVA (SEQ ID NO:83),

CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность DASNRAT (SEQ ID NO:84), и

CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQRSKWPPTWT (SEQ ID NO:85);

(j) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASETVSSRQLA (SEQ ID NO:86),

CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASSRAT (SEQ ID NO:87), и

CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQYGSSPRT (SEQ ID NO:88);

(k) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSVSSSSLA (SEQ ID NO:89),

CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASSRAT (SEQ ID NO:87), и

CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QKYSSYPLT (SEQ ID NO:90); или

(l) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSVGSNLA (SEQ ID NO:91),

CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASTGAT (SEQ ID NO:92), и

CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQYYSFLAKT (SEQ ID NO:93).

28. Вектор по любому из пп. 24-27, характеризующийся тем, что первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую Fab, содержащий

определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AYSMN (SEQ ID NO:74), CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SISSSGRYIHYADSVKG (SEQ ID NO:75), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность ETVMAGKALDY (SEQ ID NO:76), и

определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSVGSNLA (SEQ ID NO:91), CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASTGAT (SEQ ID NO:92), и CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQYYSFLAKT (SEQ ID NO:93).

29. Вектор по любому из пп. 24-28, характеризующийся тем, что первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую Fab, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности SEQ ID NO:94, 95, 96, 97, 98 или 99.

30. Вектор по любому из пп. 24-29, характеризующийся тем, что первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую Fab, содержащий вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности SEQ ID NO:100, 101, 102, 103, 104 или 105.

31. Вектор по любому из пп. 24-30, характеризующийся тем, что первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую Fab, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности SEQ ID NO:94, 95, 96, 97, 98 или 99, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% последовательности SEQ ID NO:100, 101, 102, 103, 104 или 105, соответственно.

32. Вектор по любому из пп. 24-31, характеризующийся тем, что первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую Fab, содержащий домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:45 (домен V_H-C_{H1}), и домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:46 (домен V_L-C_L).

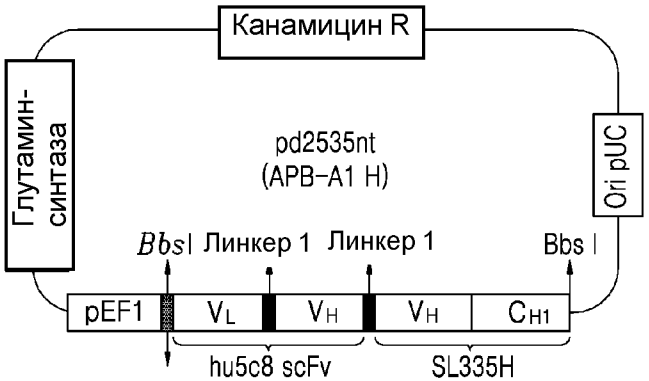
33. Вектор по любому из пп. 24-32, характеризующийся тем, что биоактивные эффекторные фрагменты представляют собой Fv против TNF-α, dsFv против TNF-α, Fv против IL-23, dsFv против IL-23, Fv против IFNAR1 и/или dsFv против IFNAR1 .

34. Вектор по любому из пп. 24-33, характеризующийся тем, что вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность,

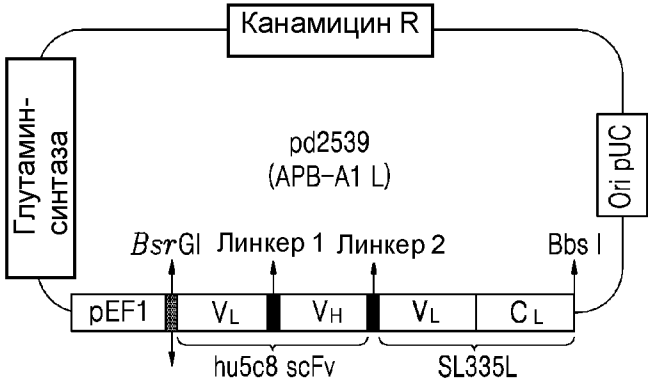
кодирующую аминокислотную последовательность одной или более из SEQ ID NO: 49-60.

5

ФИГ. 1A



Лидерная последовательность тяжелой цепи



Лидерная последовательность легкой цепи

ФИГ. 1B

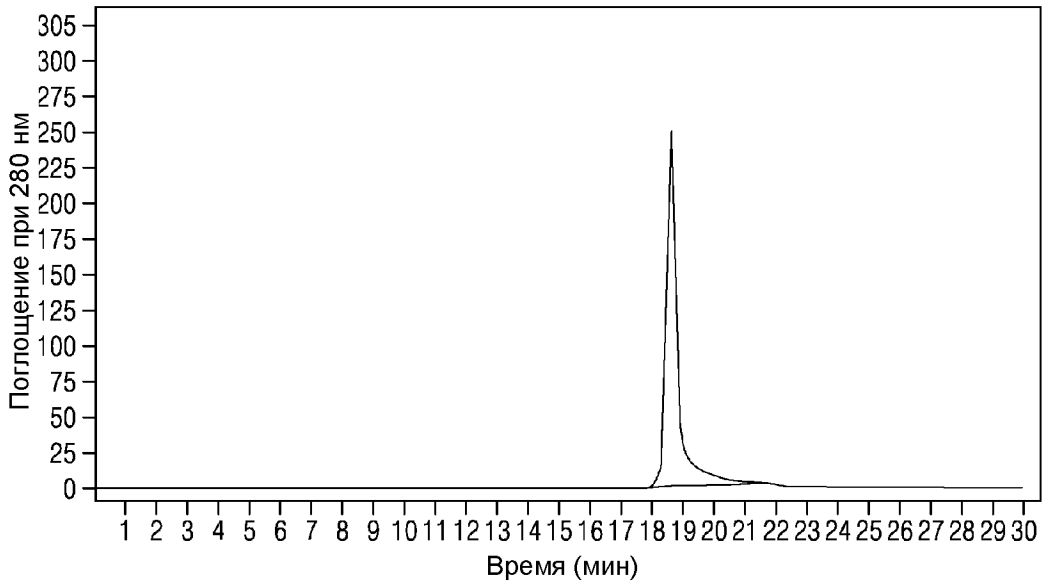
Аминокислотная последовательность H-цепи APB-A1

```
        10         20         30         40         50         60         70         80
DIVLTQSPAT LSVSPGERAT ISCRASQRVS SSTYSYMHWY QQKPGQPPKL LIKYASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS
        90        100        110        120        130        140        150        160
SVEPEDFATY YCQHSWEIPP TFGGGTKLEI KRGGGGSGGG GSGGGGSQVQ LVQSGAEVVK PGASVKLSCK ASGYIFTSYY
       170        180        190        200        210        220        230        240
MYWVKQAPGQ GLEWIGEINP SNGDTNFNEK FKSKATLTVD KSASTAYMEL SSLRSEDTAV YYCTRSDGRN DMDSWGQGTL
       250        260        270        280        290        300        310        320
VTVSSGGGGS GGGGSGGGGS QVQLVQSGGG PVKPGGSLRL SCAASGFMFR AYSMNWVRQA PGKGLEWVSS ISSSGRYIHY
       330        340        350        360        370        380        390        400
ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARET VMAGKALDYW GQGTLVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSE
       410        420        430        440        450        460        470        480
GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP

KSS
```

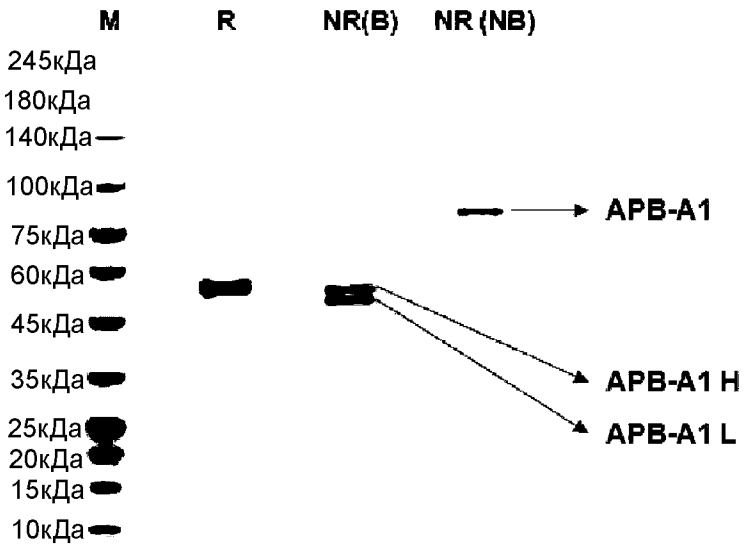
Аминокислотная последовательность L-цепи APB-A1

```
        10         20         30         40         50         60         70         80
DIVLTQSPAT LSVSPGERAT ISCRASQRVS SSTYSYMHWY QQKPGQPPKL LIKYASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS
        90        100        110        120        130        140        150        160
SVEPEDFATY YCQHSWEIPP TFGGGTKLEI KRGGGGSGGG GSGGGGSQVQ LVQSGAEVVK PGASVKLSCK ASGYIFTSYY
       170        180        190        200        210        220        230        240
MYWVKQAPGQ GLEWIGEINP SNGDTNFNEK FKSKATLTVD KSASTAYMEL SSLRSEDTAV YYCTRSDGRN DMDSWGQGTL
       250        260        270        280        290        300        310        320
VTVSSGSTSG SGKPGSGEGS TKGDIVLTQS PGTLSLSPGE TATLSCRASQ SVGSNLAWYQ QKPGQAPRLL IYGASTGATG
       330        340        350        360        370        380        390        400
VPARFSGSRS GTDFTLTITS LQPEDFATYY CQQYYSFLAK TFGQGTQLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL
       410        420        430        440        450        460        470
NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS NTLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGES
```

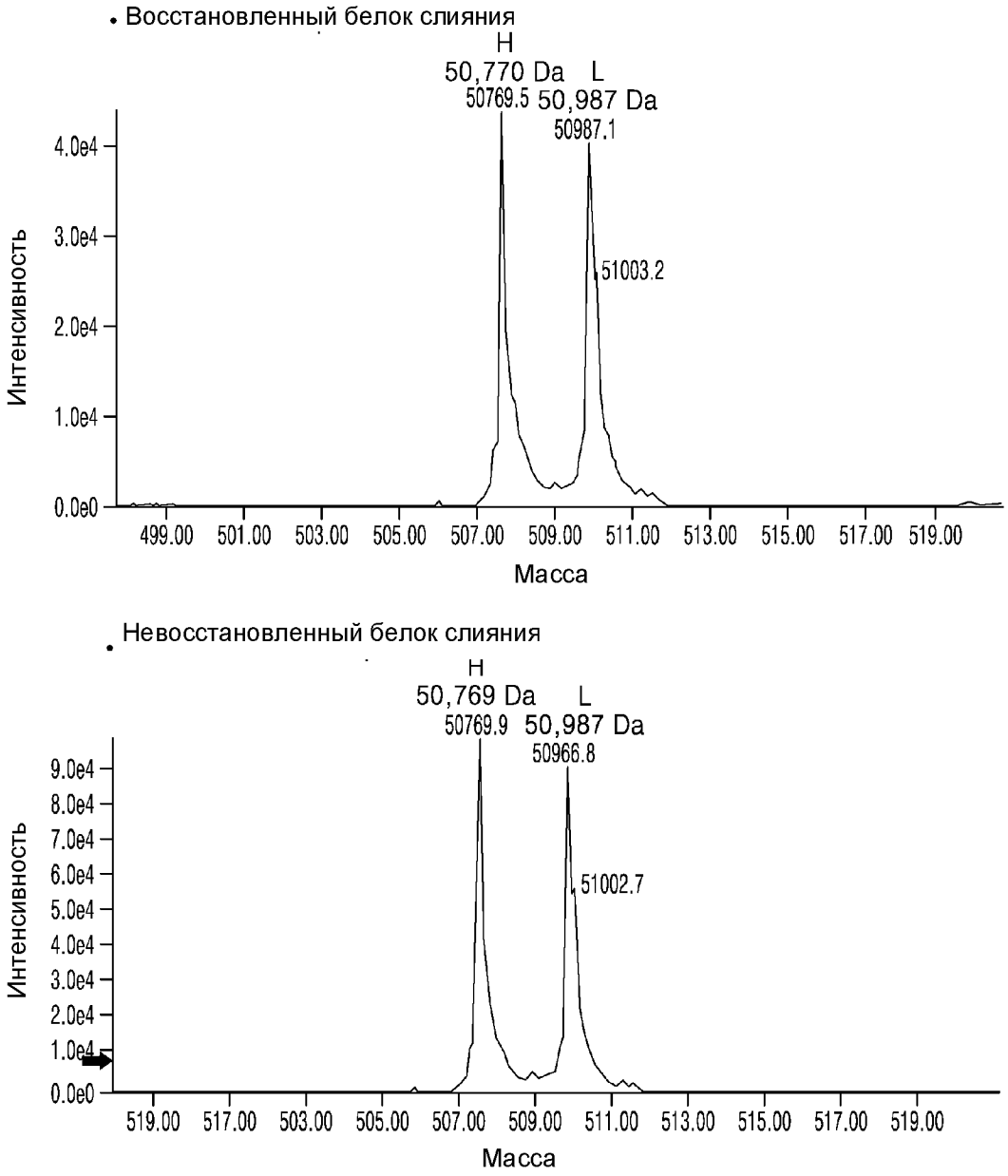
ФИГ. 2А


Поглощение при 280 нм
305
300
275
250
225
200
175
150
125
100
75
50
25
0
1 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 30
Время (мин)

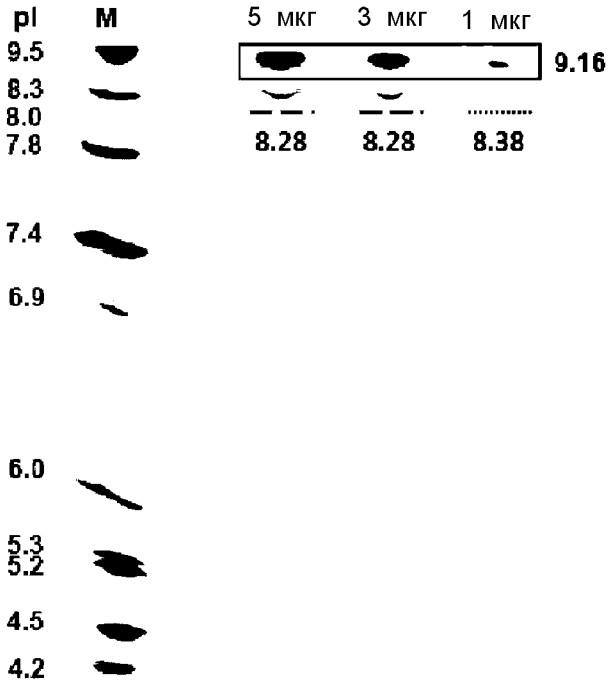
ФИГ. 2B


M
R
NR(B)
NR (NB)
245кДа
180кДа
140кДа
100кДа
75кДа
60кДа
45кДа
35кДа
25кДа
20кДа
15кДа
10кДа
APB-A1
APB-A1 H
APB-A1 L

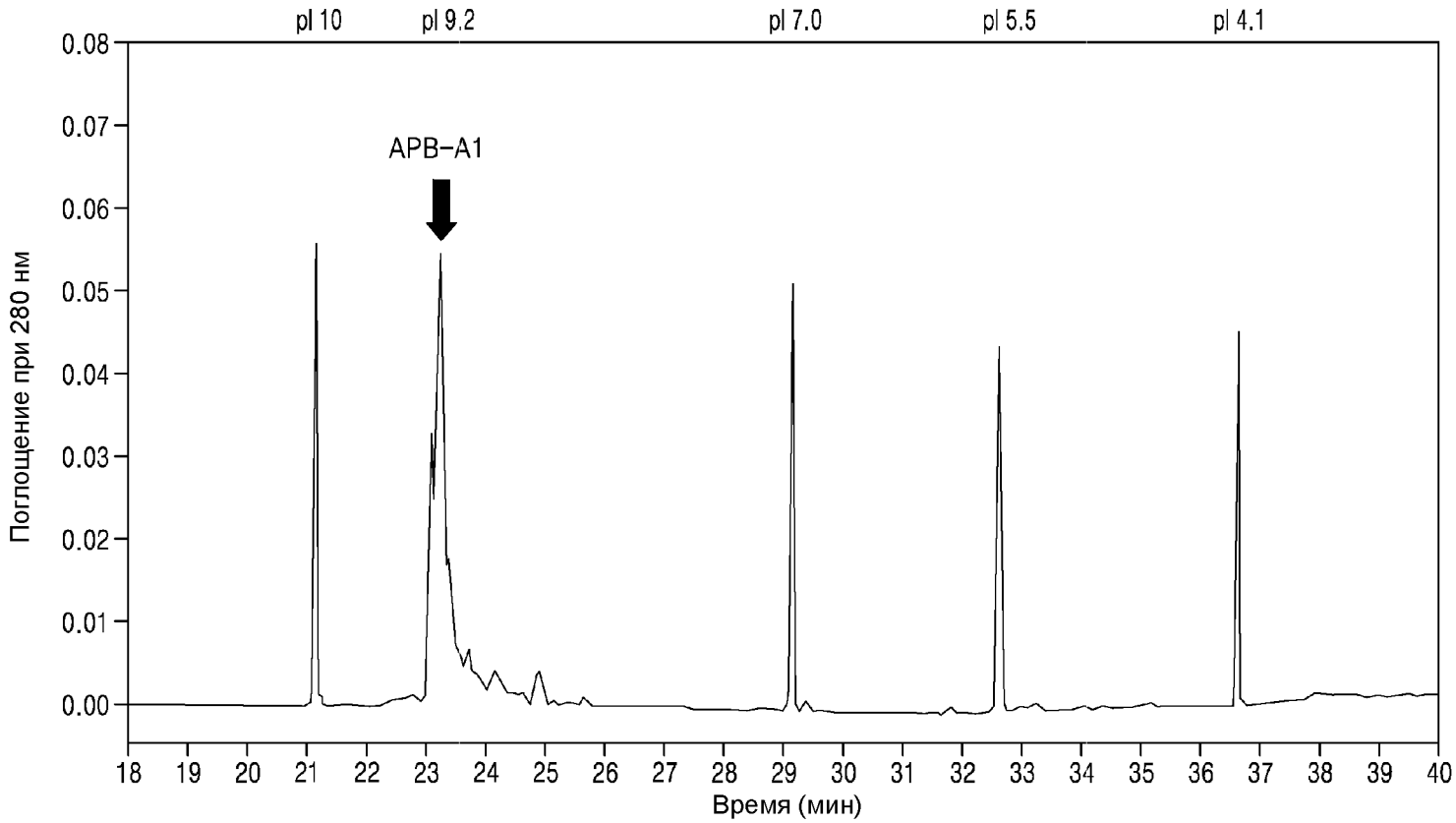
ФИГ. 3


• Восстановленный белок слияния
H
50,770 Da
L
50769.5
50,987 Da
50987.1
51003.2
Интенсивность
4.0e4
3.0e4
2.0e4
1.0e4
0.0e0
499.00 501.00 503.00 505.00 507.00 509.00 511.00 513.00 515.00 517.00 519.00
Масса
• Невосстановленный белок слияния
H
50,769 Da
L
50769.9
50,987 Da
50966.8
51002.7
Интенсивность
9.0e4
8.0e4
7.0e4
6.0e4
5.0e4
4.0e4
3.0e4
2.0e4
1.0e4
0.0e0
519.00 517.00 503.00 505.00 507.00 509.00 511.00 513.00 515.00 517.00 519.00
Масса

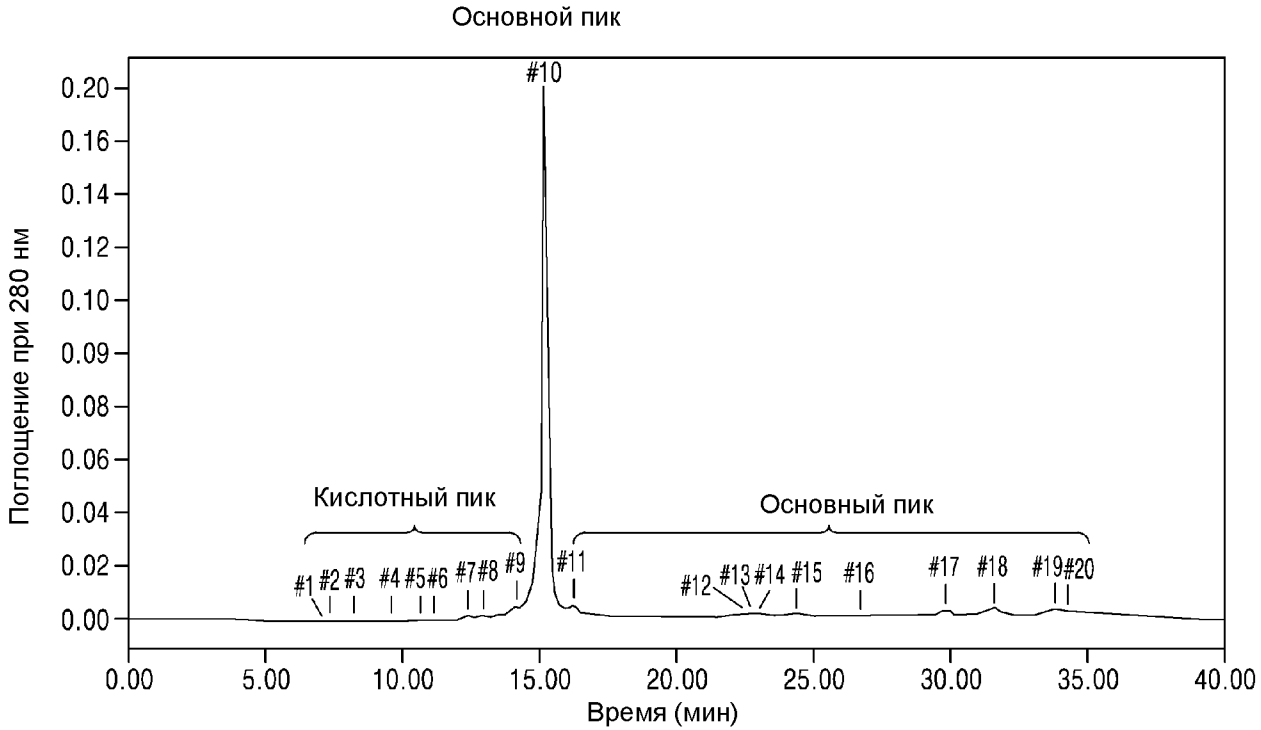
ФИГ. 4А



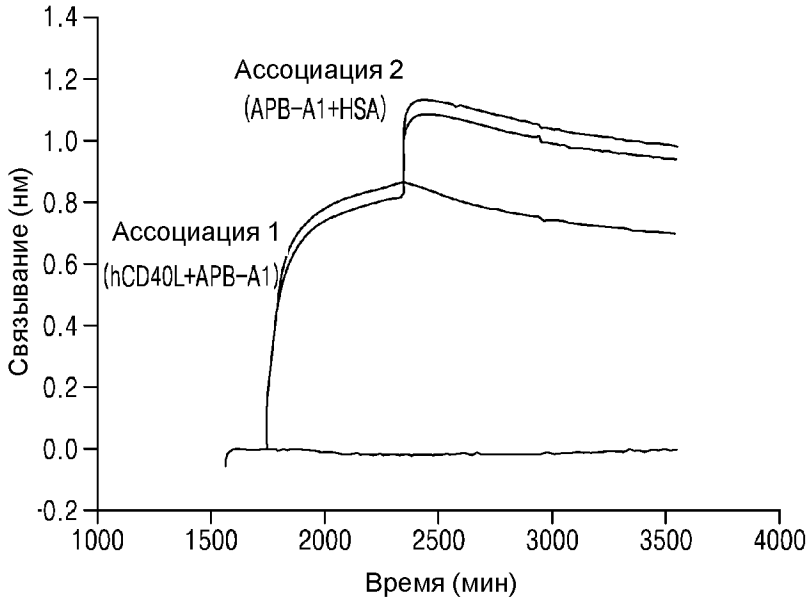
ФИГ. 4B


pI 10
pI 9.2
pI 7.0
pI 5.5
pI 4.1
APB-A1
Поглощение при 280 нм
0.08
0.07
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40
Время (мин)

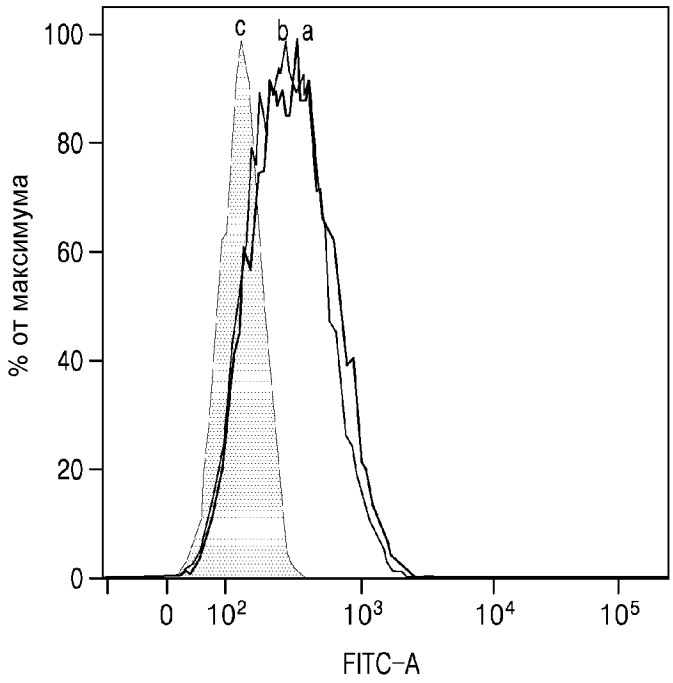
ФИГ. 5


Основной пик
#10
0.20
0.16
0.14
0.12
0.10
0.09
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
Поглощение при 280 нм
Кислотный пик
Основный пик
#1 #2 #3 #4 #5 #6 #7 #8 #9
#11
#12 #13 #14 #15 #16 #17 #18 #19 #20
0.00 5.00 10.00 15.00 20.00 25.00 30.00 35.00 40.00
Время (мин)

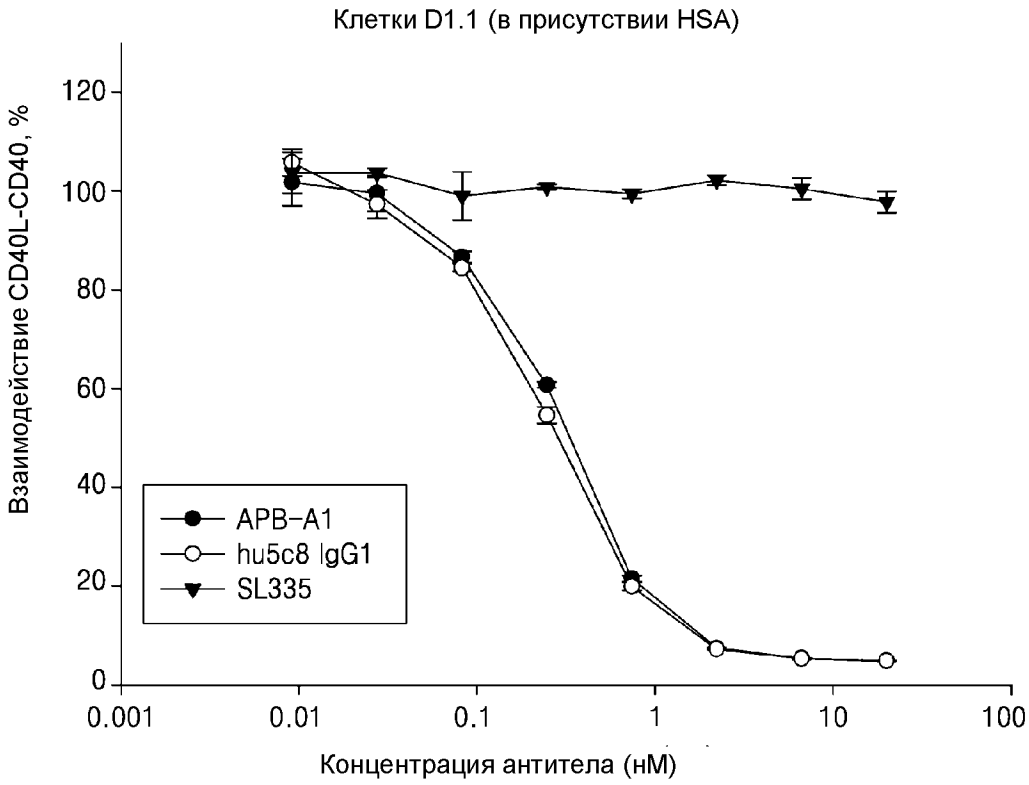
ФИГ. 6


1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
Связывание (нм)
Ассоциация 2
(APB-A1+HSA)
Ассоциация 1
(hCD40L+APB-A1)
1000
1500
2000
2500
3000
3500
4000
Время (мин)

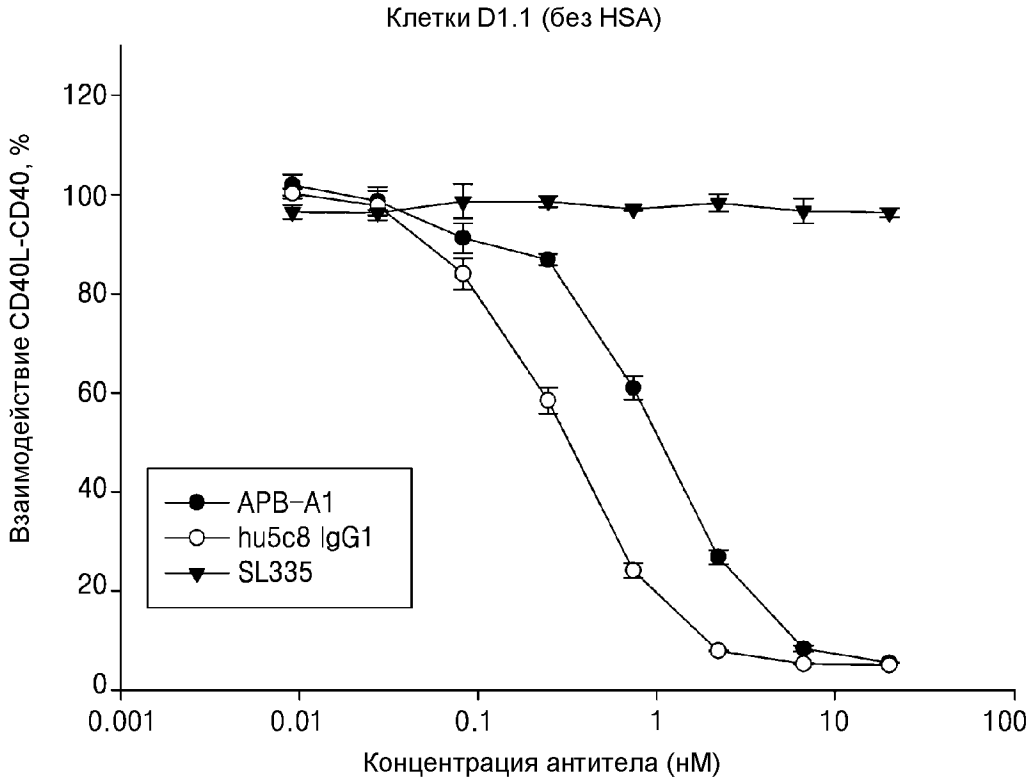
ФИГ. 7



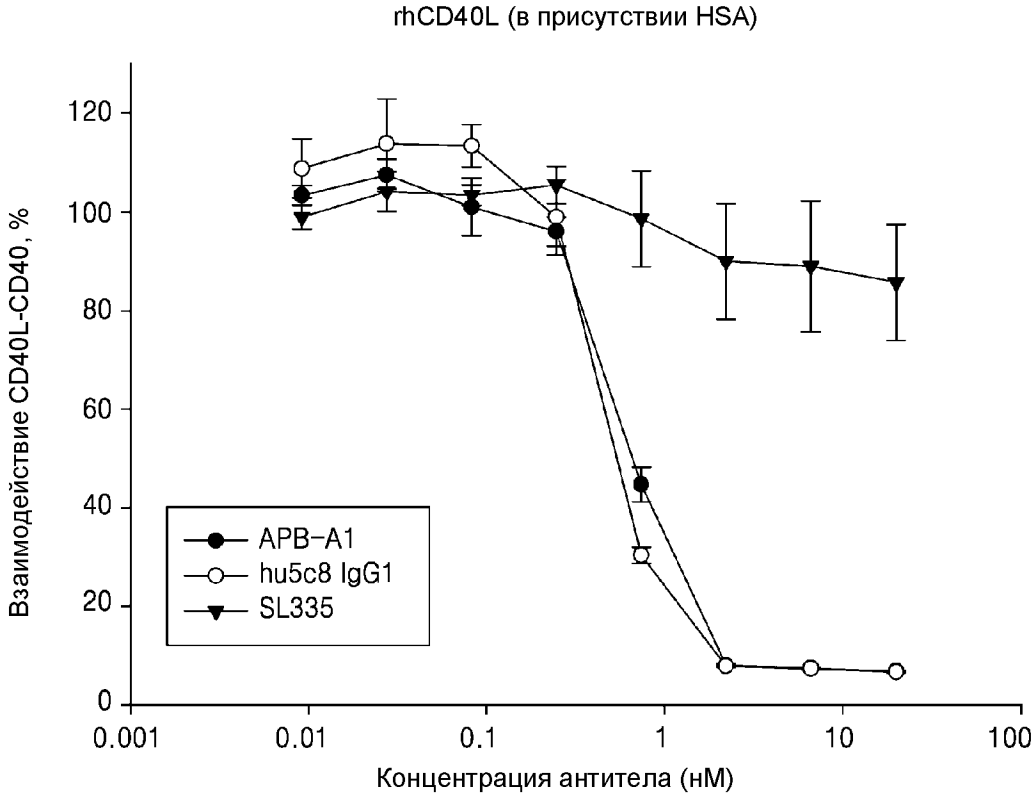
ФИГ. 8A


Клетки D1.1 (в присутствии HSA)
Взаимодействие CD40L-CD40, %
120
100
80
60
40
20
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Концентрация антитела (нМ)
APB-A1
hu5c8 IgG1
SL335

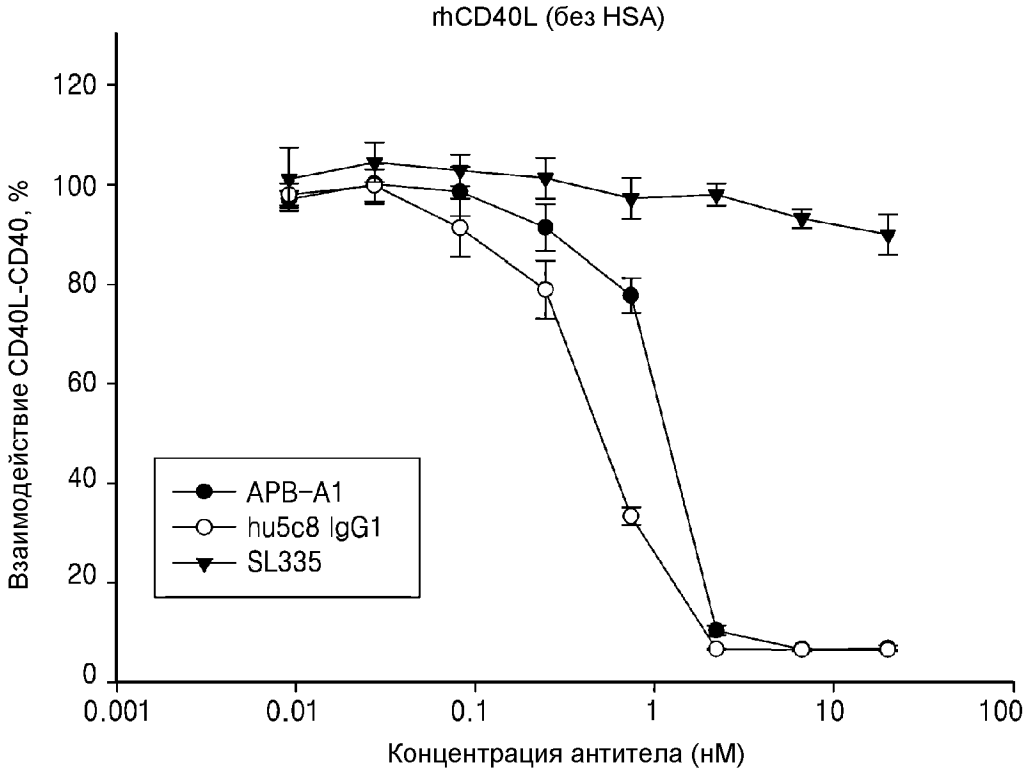
ФИГ. 8B


Клетки D1.1 (без HSA)
Взаимодействие CD40L-CD40, %
120
100
80
60
40
20
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Концентрация антитела (нМ)
APB-A1
hu5c8 IgG1
SL335

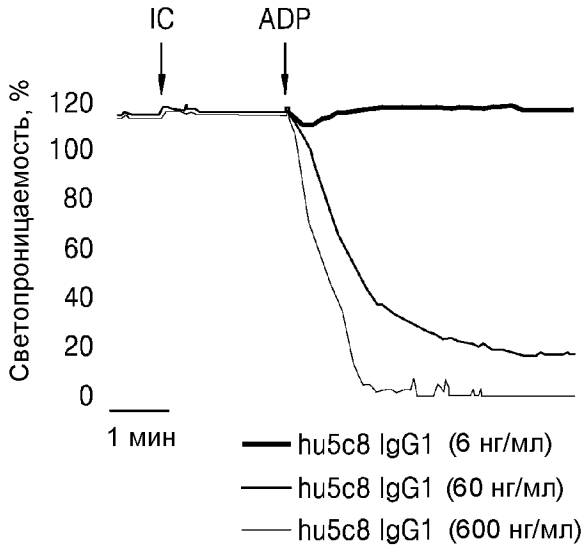
ФИГ. 8C


rhCD40L (в присутствии HSA)
Взаимодействие CD40L-CD40, %
120
100
80
60
40
20
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Концентрация антитела (нМ)
APB-A1
hu5c8 IgG1
SL335

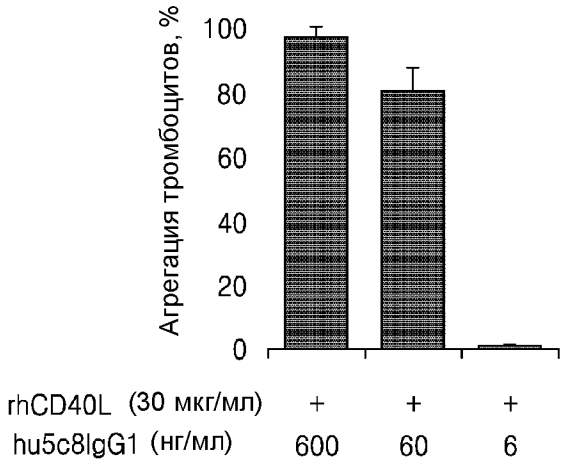
ФИГ. 8D


rhCD40L (без HSA)
Взаимодействие CD40L-CD40, %
120
100
80
60
40
20
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Концентрация антитела (нМ)
APB-A1
hu5c8 IgG1
SL335

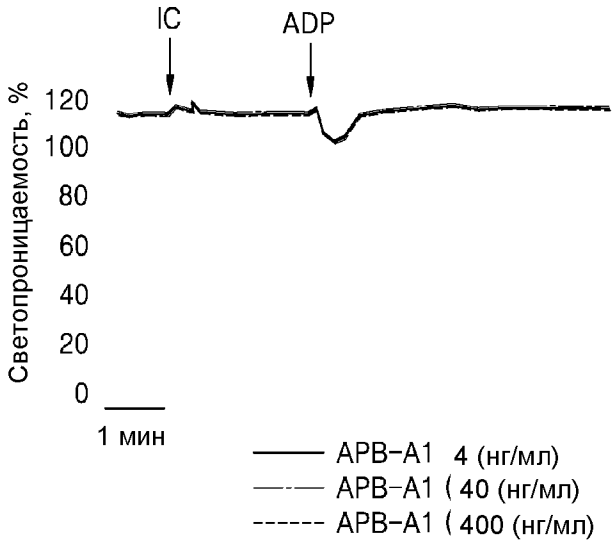
ФИГ. 9А


IC
ADP
Светопроницаемость, %
120
100
80
60
40
20
0
1 мин
hu5c8 IgG1 (6 нг/мл)
hu5c8 IgG1 (60 нг/мл)
hu5c8 IgG1 (600 нг/мл)

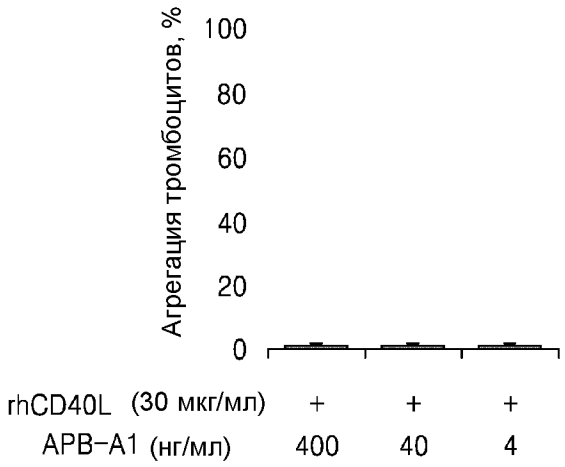
ФИГ. 9B


Агрегация тромбоцитов, %
100
80
60
40
20
0
rhCD40L (30 мкг/мл) + + +
hu5c8IgG1 (нг/мл) 600 60 6

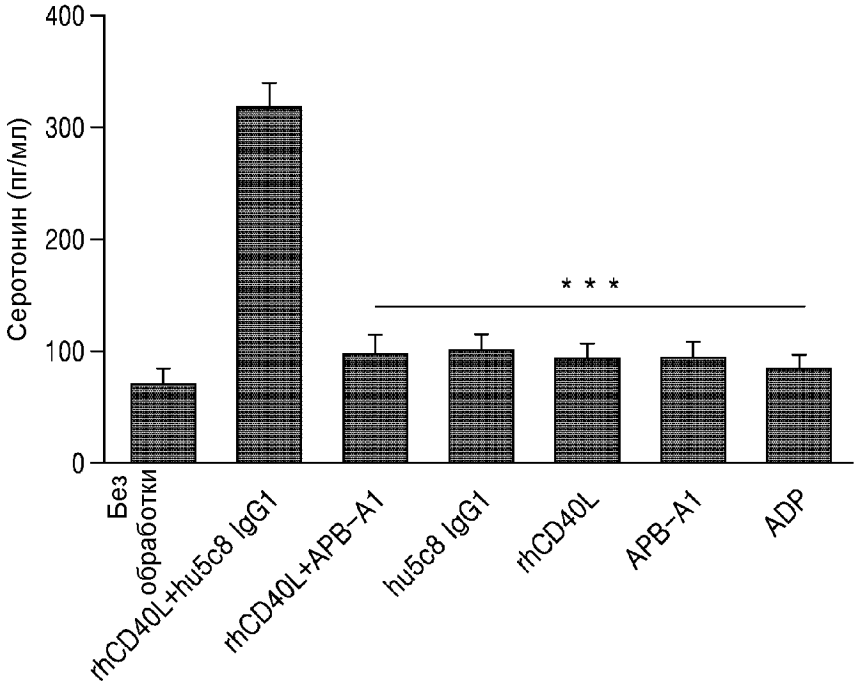
ФИГ. 9C


IC
ADP
Светопроницаемость, %
120
100
80
60
40
20
0
1 мин
APB-A1 4 (нг/мл)
APB-A1 (40 (нг/мл)
APB-A1 (400 (нг/мл)

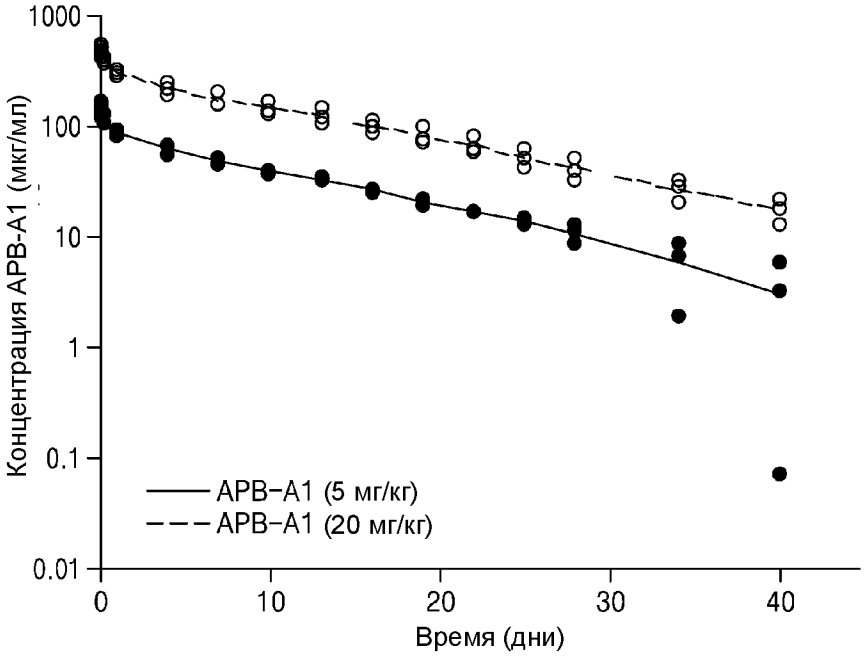
ФИГ. 9D


Агрегация тромбоцитов, %
100
80
60
40
20
0
rhCD40L (30 мкг/мл) + + +
APB-A1 (нг/мл) 400 40 4

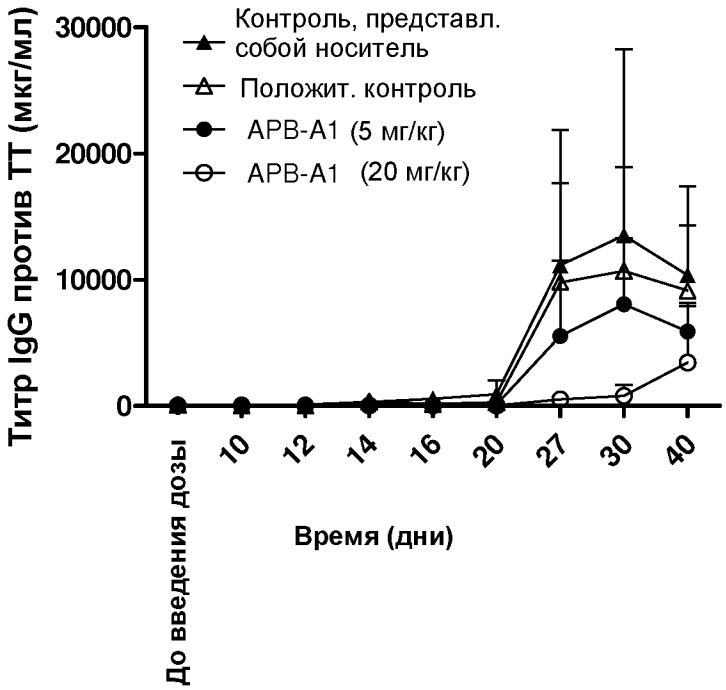
ФИГ. 10


Серотонин (пг/мл)
400
300
200
100
0
* * *
Без обработки
rhCD40L+hu5c8 IgG1
rhCD40L+APB-A1
hu5c8 IgG1
rhCD40L
APB-A1
ADP

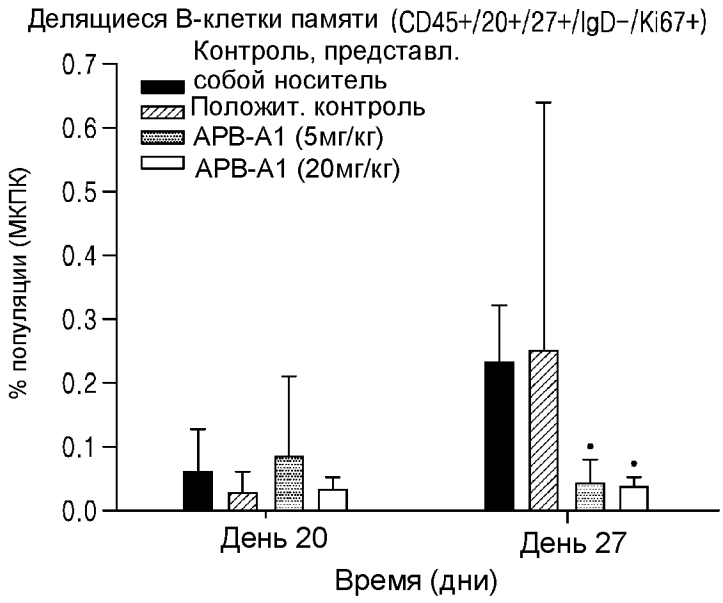
ФИГ. 11


1000
100
10
1
0.1
0.01
Концентрация APB-A1 (мкг/мл)
0
10
20
30
40
Время (дни)
APB-A1 (5 мг/кг)
APB-A1 (20 мг/кг)

ФИГ. 12А

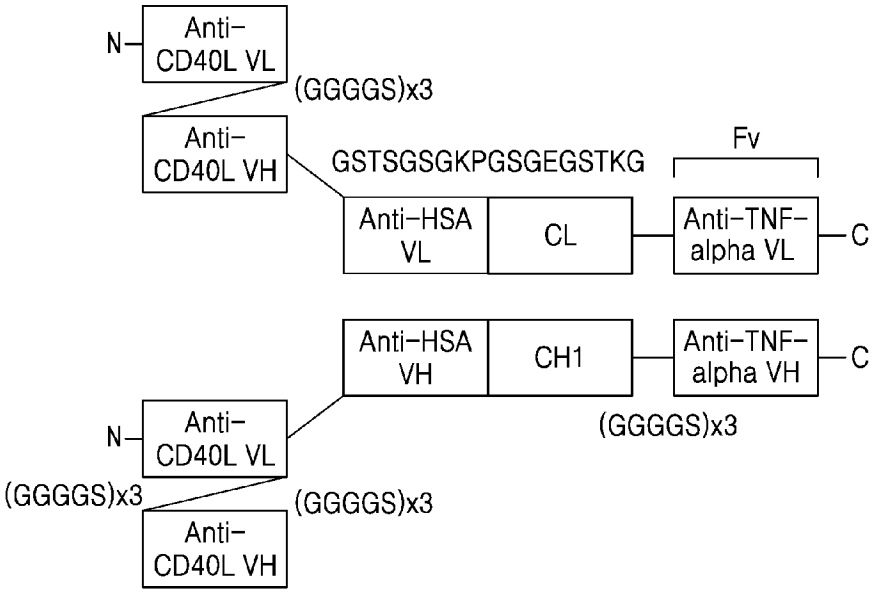

Титр IgG против TT (мкг/мл)
30000
20000
10000
0
Контроль, представл. собой носитель
Положит. контроль
APB-A1 (5 мг/кг)
APB-A1 (20 мг/кг)
До введения дозы
10
12
14
16
20
27
30
40
Время (дни)

ФИГ. 12B

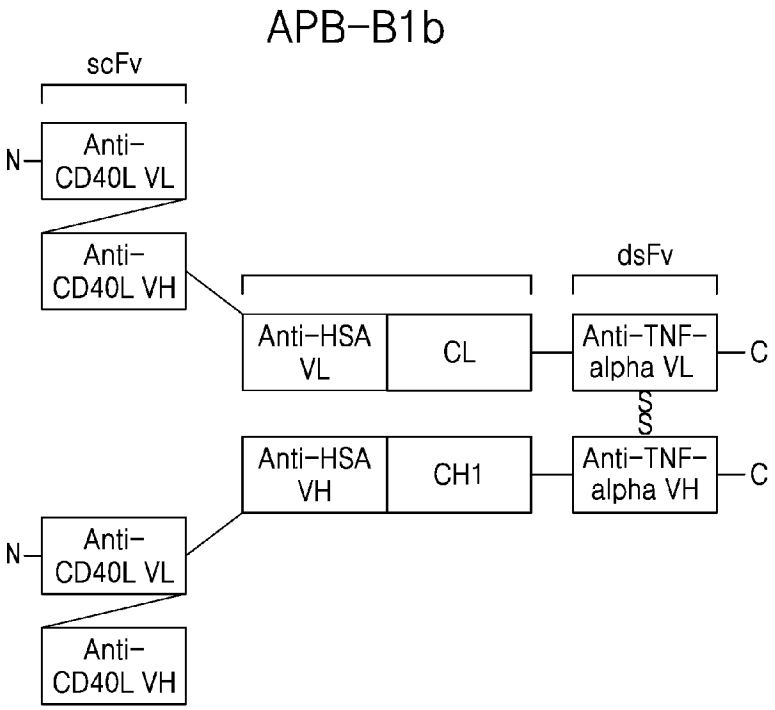

Делящиеся B-клетки памяти (CD45+/20+/27+/IgD−/Ki67+)
Контроль, представл. собой носитель
Положит. контроль
APB-A1 (5мг/кг)
APB-A1 (20мг/кг)
% популяции (МКПК)
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
День 20
День 27
Время (дни)

ФИГ. 13A

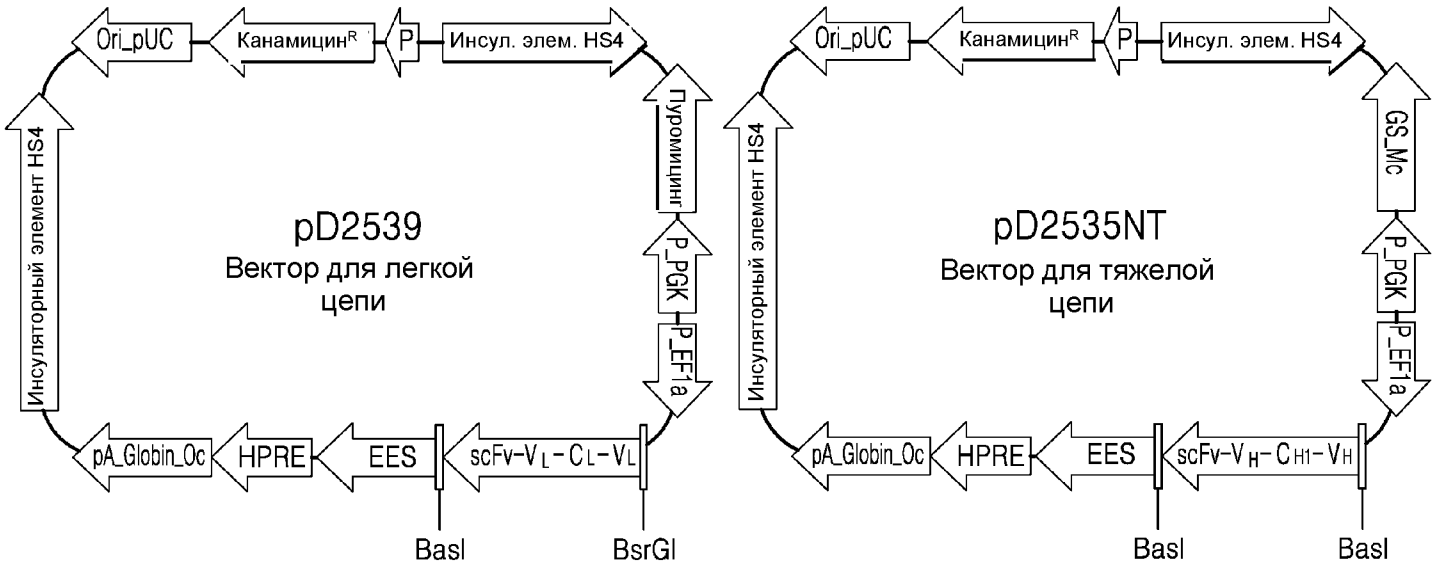
APB-B1a



ФИГ. 13B


APB-B1b
scFv
N
Anti-CD40L VL
Anti-CD40L VH
dsFv
Anti-HSA VL
CL
Anti-TNF-alpha VL
C
S
S
Anti-HSA VH
CH1
Anti-TNF-alpha VH
C
N
Anti-CD40L VL
Anti-CD40L VH

ФИГ. 13C


Ori_pUC
Канамицин^R
P
Инсул. элем. HS4
Пуромицин^r
P_PGK
P_EF1a
Инсуляторный элемент HS4
pA_Globin_Oc
HPRE
EES
scFv-V_L-C_L-V_L
BasI
BsrGI
pD2539
Вектор для легкой цепи
Ori_pUC
Канамицин^R
P
Инсул. элем. HS4
GS_Mc
P_PGK
P_EF1a
Инсуляторный элемент HS4
pA_Globin_Oc
HPRE
EES
scFv-V_H-C_{H1}-V_H
BasI
BasI
pD2535NT
Вектор для тяжелой цепи

ФИГ. 14

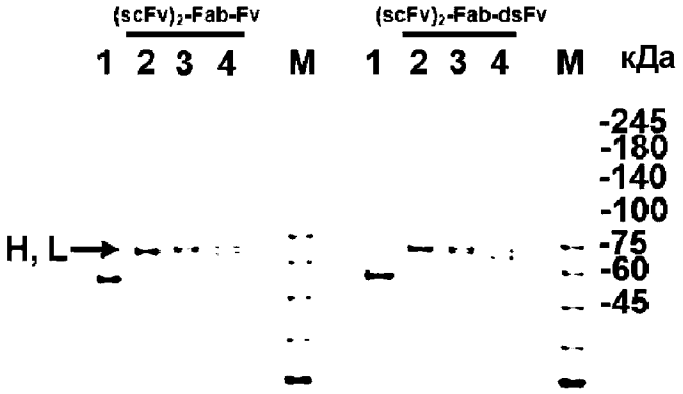
Тяжелая цепь APB-B1

```
        10         20         30         40         50         60         70         80
DIVLTQSPAT LSVSPGERAT ISCRASQRVS SSTYSYMHWY QQKPGQPPKL LIKYASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS

        90        100        110        120        130        140        150        160
SVEPEDFATY YCQHSWEIPP TFGQGTKLEI KRGGGGSGGG GSGGGGSQVQ LVQSGAEVVK PGASVKLSCK ASGYIFTSYY

       170        180        190        200        210        220        230        240
MYWVKQAPGQ GLEWIGEINP SNGDTNFNEK FKSKATLTVD KSASTAYMEL SSLRSEDTAV YYCTRSDGRN DMDSWGQGTL

       250        260        270        280        290        300        310        320
VTVSSGGGGS GGGGSGGGGS QVQLVQSGGG PVKPGGSLRL SCAASGFMFR AYSMNWVRQA PGKGLEWVSS ISSSGRYIHY

       330        340        350        360        370        380        390        400
ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARET VMAGKALDYW GQGTLVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSE

       410        420        430        440        450        460        470        480
GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP

       490        500        510        520        530        540        550        560
KSSGGGGSGG GGSGGGGSEV QLVESGGGLV QPGGSLRLSC AASGYVFTDY GMNWVRQAPG KGLEWMGWIN TYIGEPIYAD
                                                                    C
       570        580        590        600        610
SVKGRFTFSL DTSKSTAYLQ MNSLRAEDTA VYYCARGYRS YAMDYWGQGT LVTVSS
```

Легкая цепь APB-B1

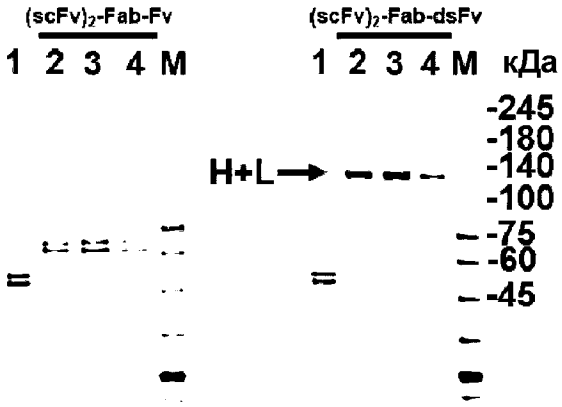
```
        10         20         30         40         50         60         70         80
DIVLTQSPAT LSVSPGERAT ISCRASQRVS SSTYSYMHWY QQKPGQPPKL LIKYASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS

        90        100        110        120        130        140        150        160
SVEPEDFATY YCQHSWEIPP TFGQGTKLEI KRGGGGSGGG GSGGGGSQVQ LVQSGAEVVK PGASVKLSCK ASGYIFTSYY

       170        180        190        200        210        220        230        240
MYWVKQAPGQ GLEWIGEINP SNGDTNFNEK FKSKATLTVD KSASTAYMEL SSLRSEDTAV YYCTRSDGRN DMDSWGQGTL

       250        260        270        280        290        300        310        320
VTVSSGSTSG SGKPGSGEGS TKGDIVLTQS PGTLSLSPGE TATLSCRASQ SVGSNLAWYQ QKPGQAPRLL IYGASTGATG

       330        340        350        360        370        380        390        400
VPARFSGSRS GTDFTLTITS LQPEDFATYY CQQYYSFLAK TFGQGTQLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL

       410        420        430        440        450        460        470        480
NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS NTLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGESGG

       490        500        510        520        530        540        550        560
GGSGGGGSGG GGSDIQMTQS PSSLSASVGD RVTITCKASQ NVGTNVAWYQ QKPGKAPKAL IYSASFLYSG VPYRFSGSGS

       570        580        590        600
GTDFTLTISS LQPEDFATYY CQQYNIYPLT FGQGTKVEIK R
                                   C
```

ФИГ. 15А



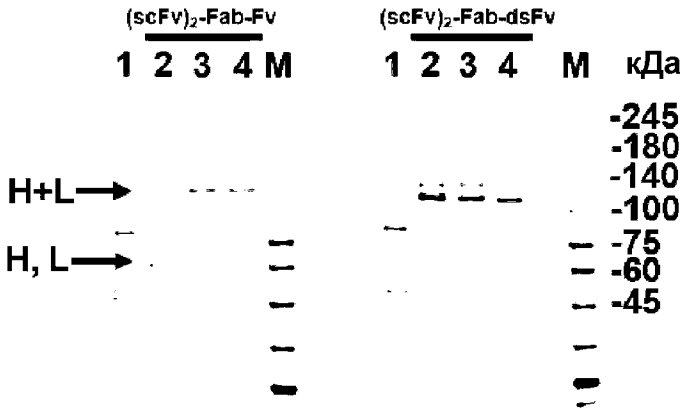
Восстанавливающие условия
(с кипячением)

ФИГ. 15B



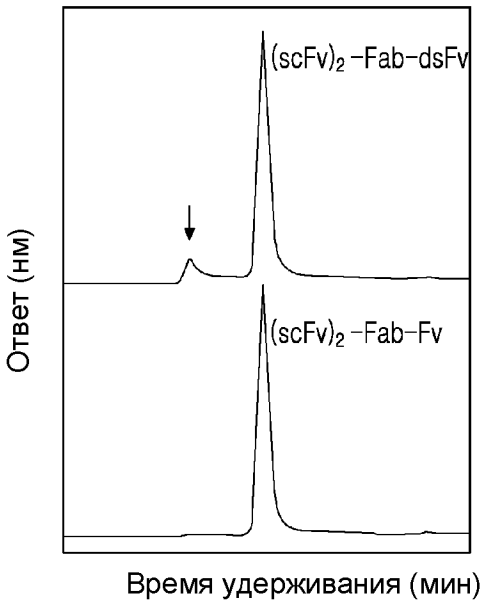
Невосстанавливающие условия (с кипячением)

ФИГ. 15C

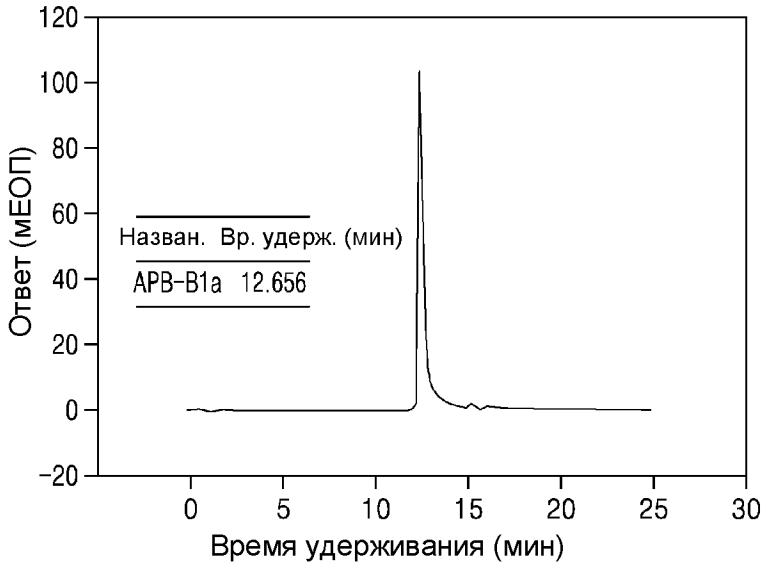


Невосстанавливающие условия (без кипячения)

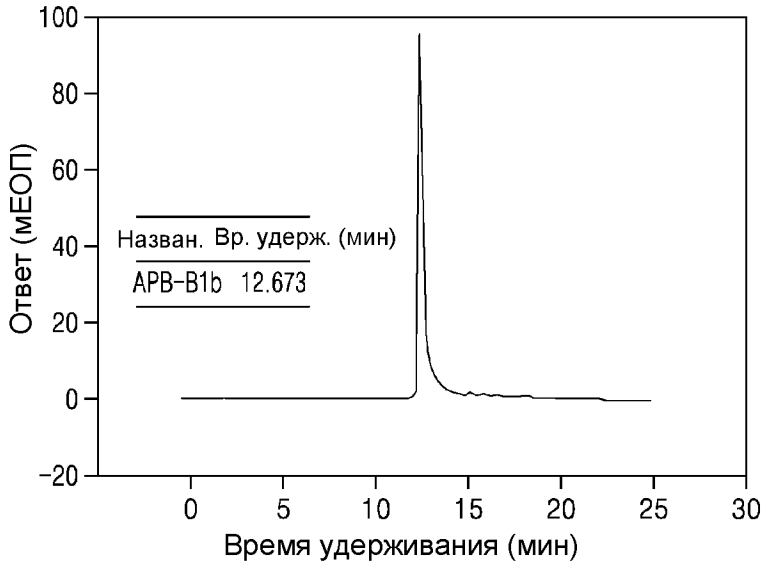
ФИГ. 15D



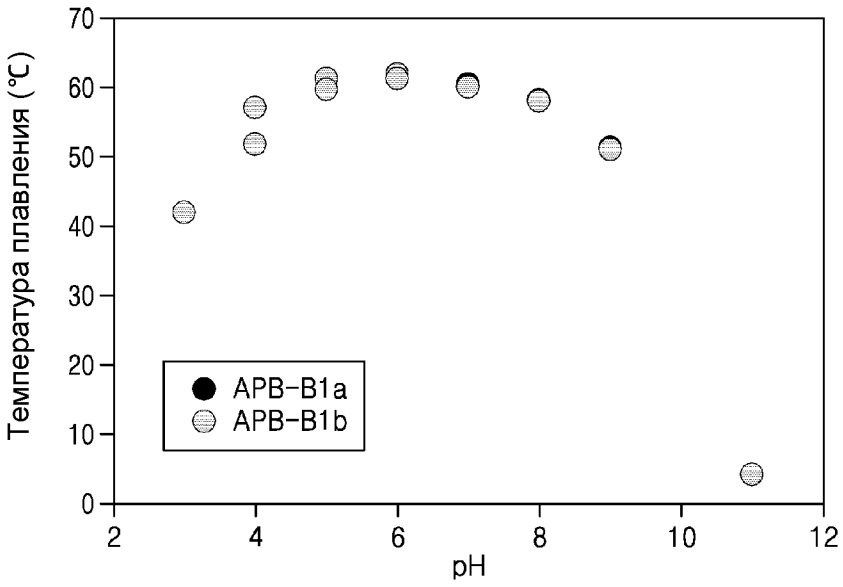
ФИГ. 16A


120
100
80
60
40
20
0
-20
Ответ (мЕОП)
Назван. Вр. удерж. (мин)
APB-B1a 12.656
0
5
10
15
20
25
30
Время удерживания (мин)

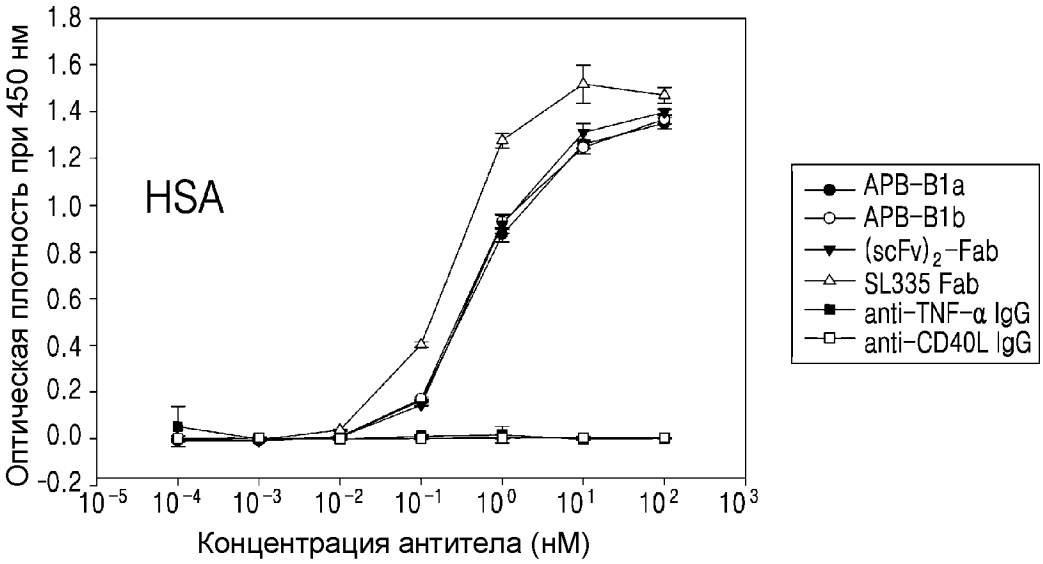
ФИГ. 16B


100
80
60
40
20
0
-20
Ответ (мЕОП)
Назван. Вр. удерж. (мин)
APB-B1b 12.673
0
5
10
15
20
25
30
Время удерживания (мин)

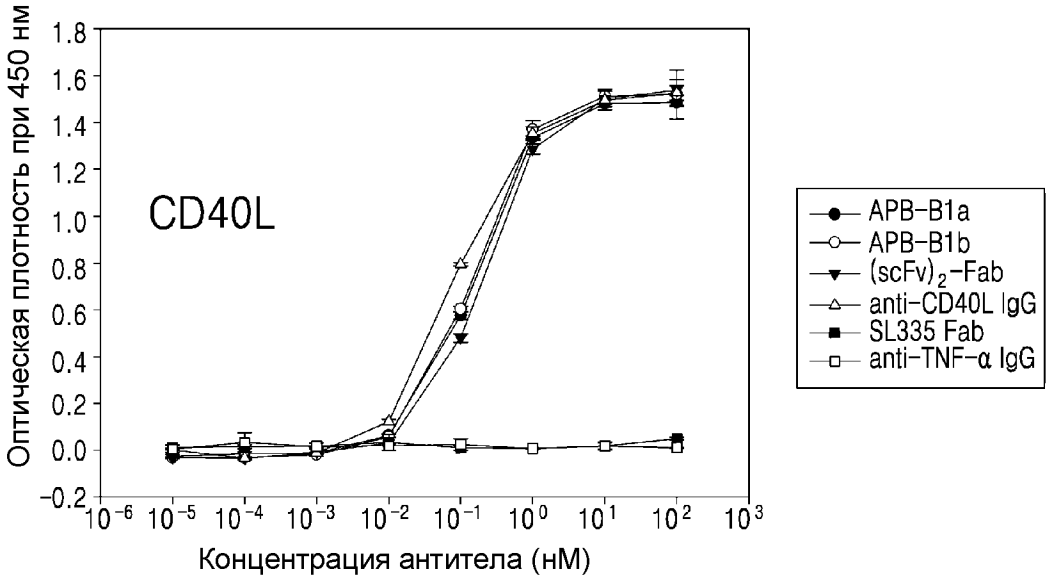
ФИГ. 17


Температура плавления (°C)
70
60
50
40
30
20
10
0
2
4
6
8
10
12
pH
APB-B1a
APB-B1b

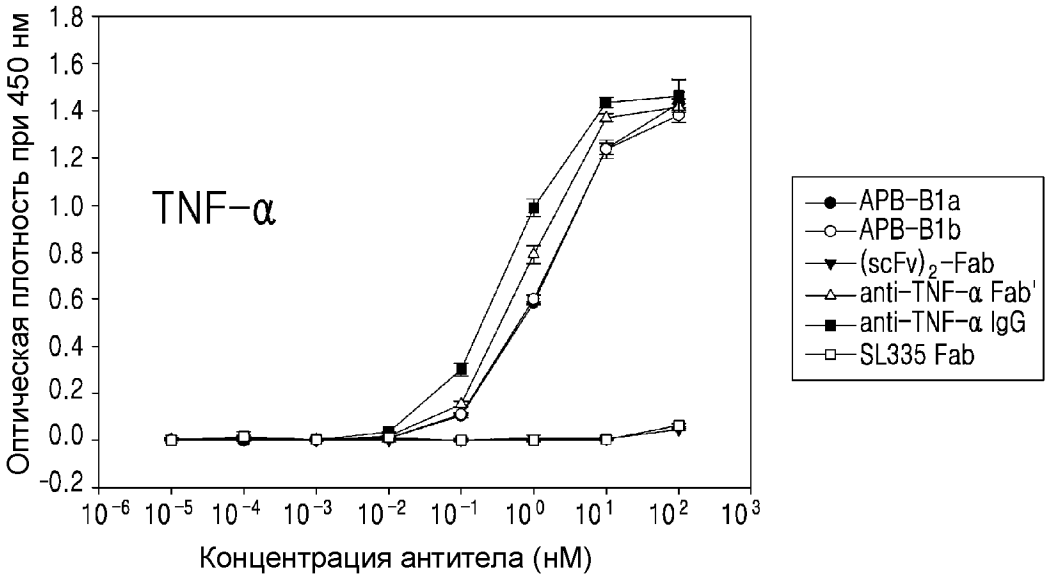
ФИГ. 18A


HSA
Оптическая плотность при 450 нм
Концентрация антитела (нМ)
APB-B1a
APB-B1b
(scFv)2-Fab
SL335 Fab
anti-TNF-α IgG
anti-CD40L IgG

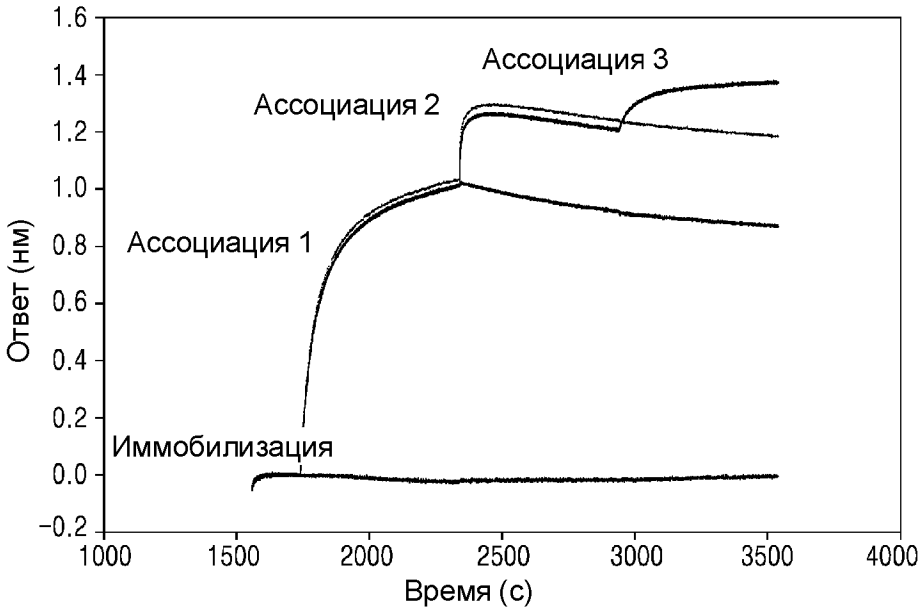
ФИГ. 18B


Оптическая плотность при 450 нм
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
CD40L
10^{-6} 10^{-5} 10^{-4} 10^{-3} 10^{-2} 10^{-1} 10^{0} 10^{1} 10^{2} 10^{3}
Концентрация антитела (нМ)
APB-B1a
APB-B1b
$(scFv)_2$-Fab
anti-CD40L IgG
SL335 Fab
anti-TNF-α IgG

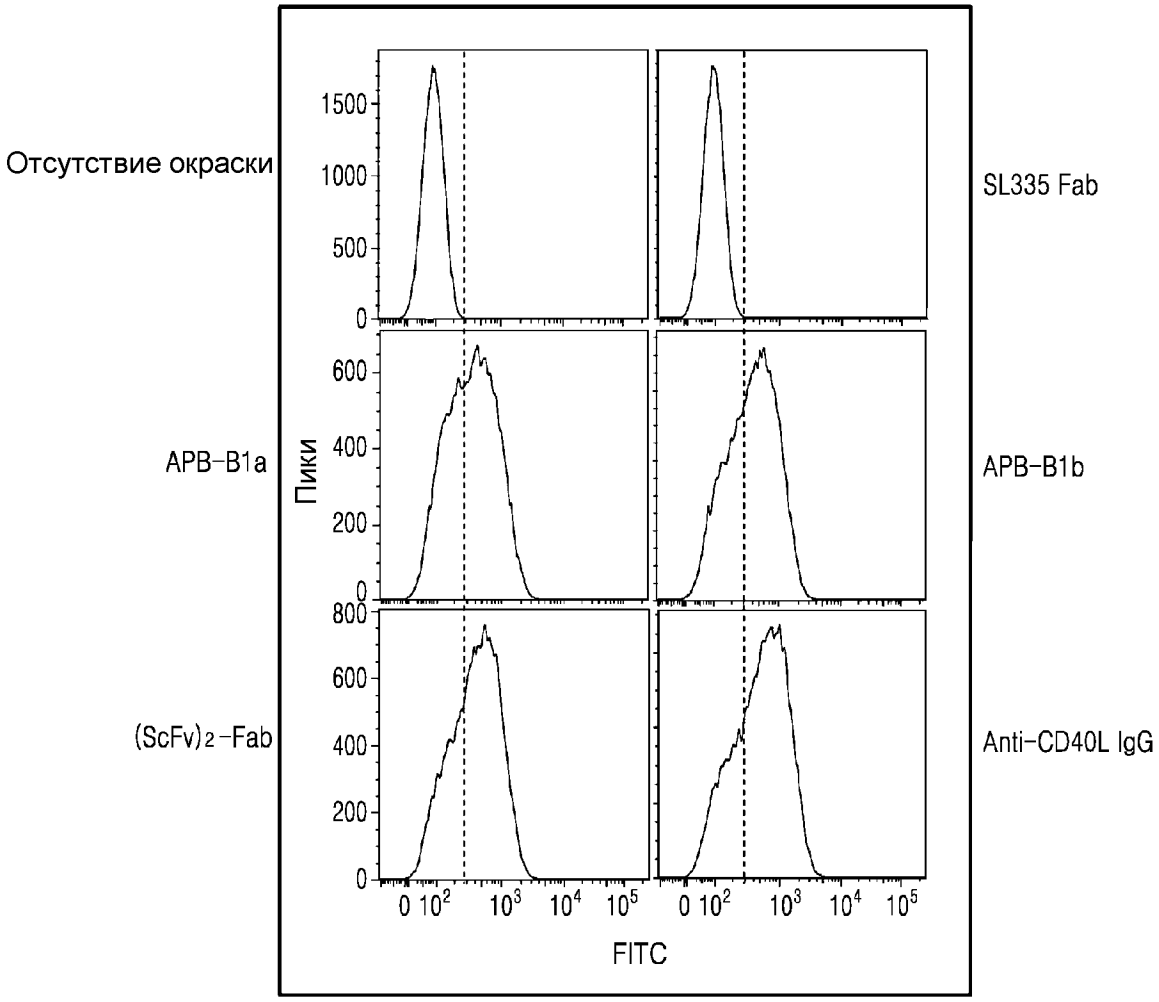
ФИГ. 18C


TNF-α
Оптическая плотность при 450 нм
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
10^{-6} 10^{-5} 10^{-4} 10^{-3} 10^{-2} 10^{-1} 10^{0} 10^{1} 10^{2} 10^{3}
Концентрация антитела (нМ)
APB-B1a
APB-B1b
$(scFv)_2$-Fab
anti-TNF-α Fab'
anti-TNF-α IgG
SL335 Fab

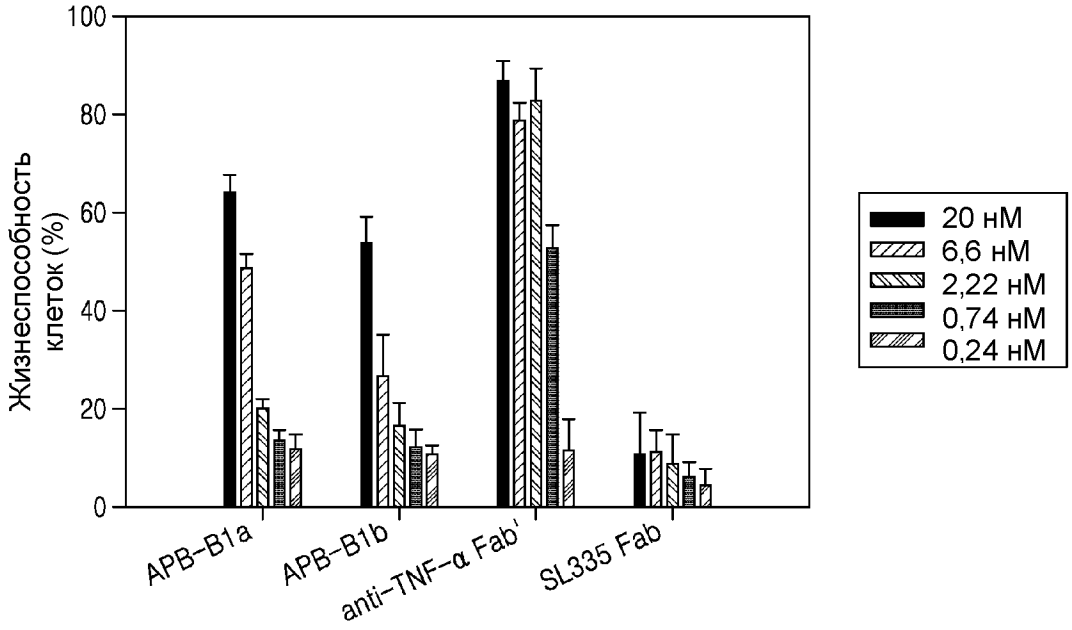
ФИГ. 19


1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
−0.2
Ответ (нм)
Ассоциация 3
Ассоциация 2
Ассоциация 1
Иммобилизация
1000
1500
2000
2500
3000
3500
4000
Время (с)

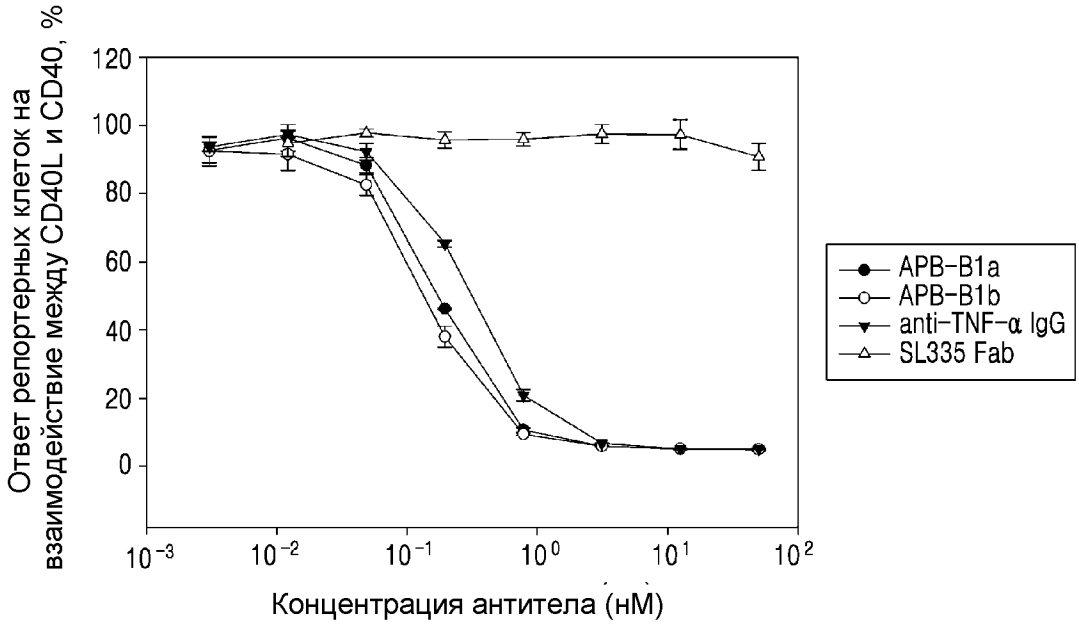
ФИГ. 20


Отсутствие окраски
SL335 Fab
APB-B1a
APB-B1b
(ScFv)2-Fab
Anti-CD40L IgG
Пики
FITC
0
500
1000
1500
200
400
600
800
0 10^2
10^3
10^4
10^5

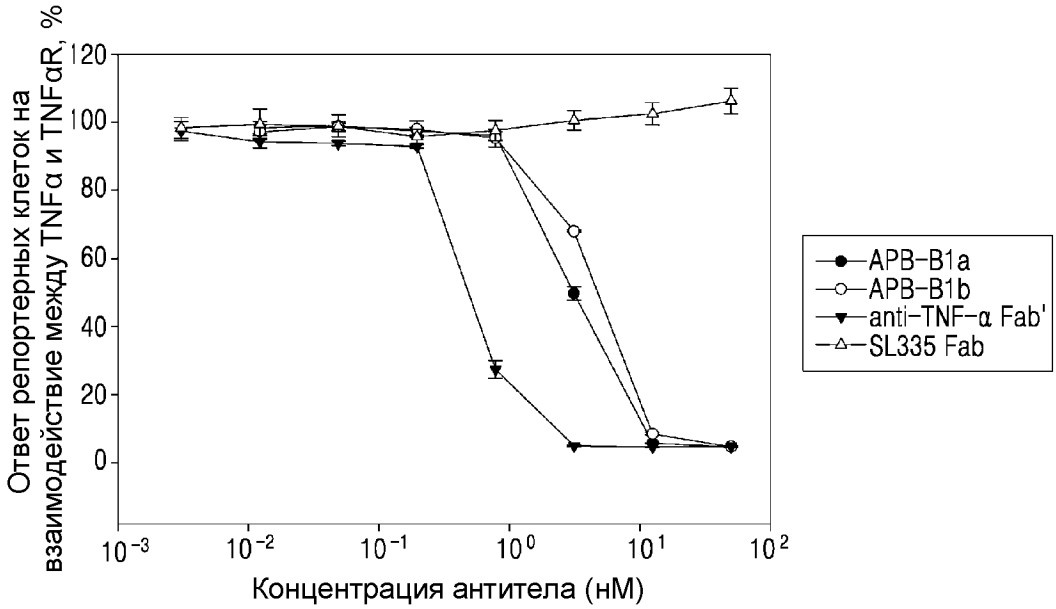
ФИГ. 21


Жизнеспособность клеток (%)
100
80
60
40
20
0
APB-B1a
APB-B1b
anti-TNF-α Fab'
SL335 Fab
20 нМ
6,6 нМ
2,22 нМ
0,74 нМ
0,24 нМ

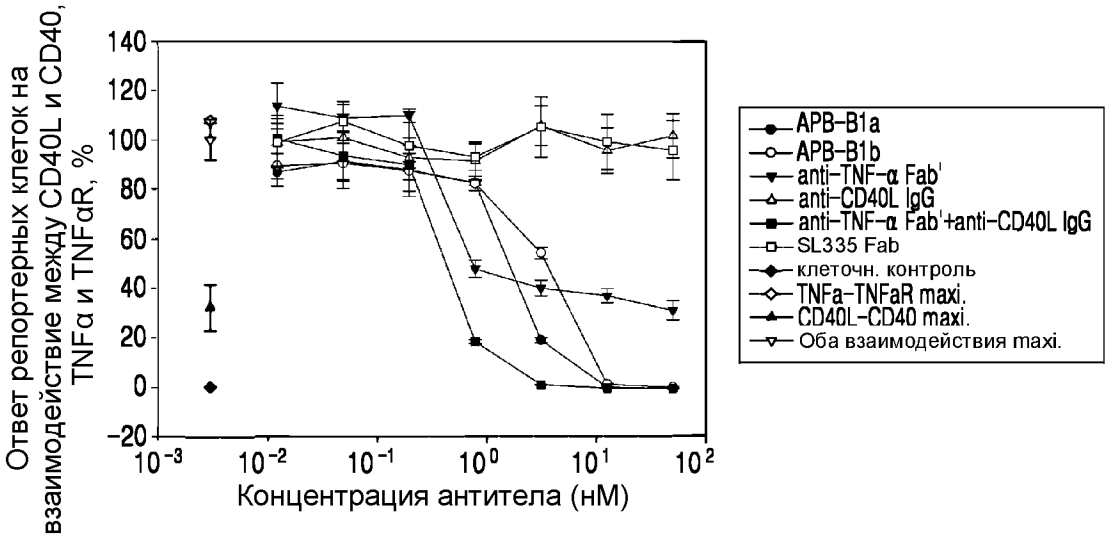
ФИГ. 22А


Ответ репортерных клеток на взаимодействие между CD40L и CD40, %
120
100
80
60
40
20
0
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
10^{2}
Концентрация антитела (нМ)
APB-B1a
APB-B1b
anti-TNF-α IgG
SL335 Fab

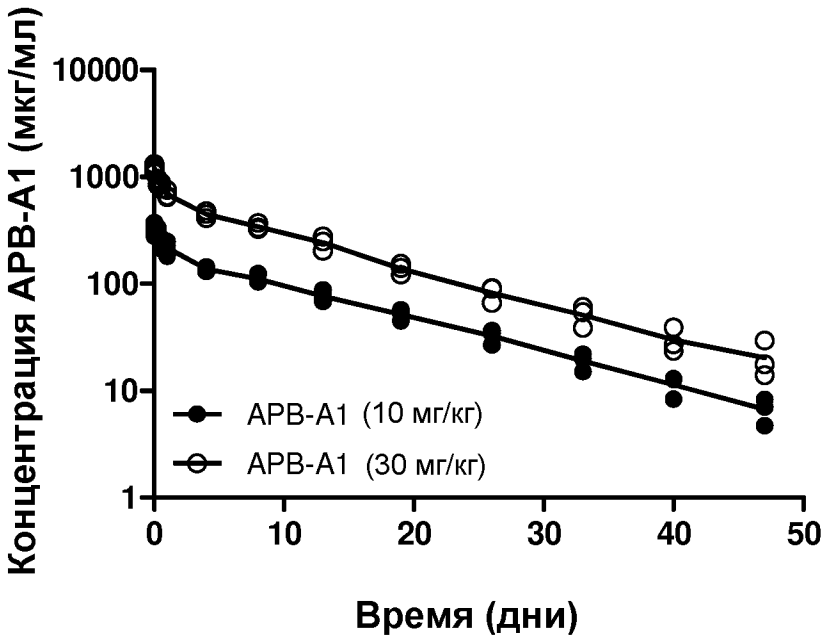
ФИГ. 22B


Ответ репортерных клеток на взаимодействие между TNFα и TNFαR, %
120
100
80
60
40
20
0
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
10^{2}
Концентрация антитела (нМ)
APB-B1a
APB-B1b
anti-TNF-α Fab'
SL335 Fab

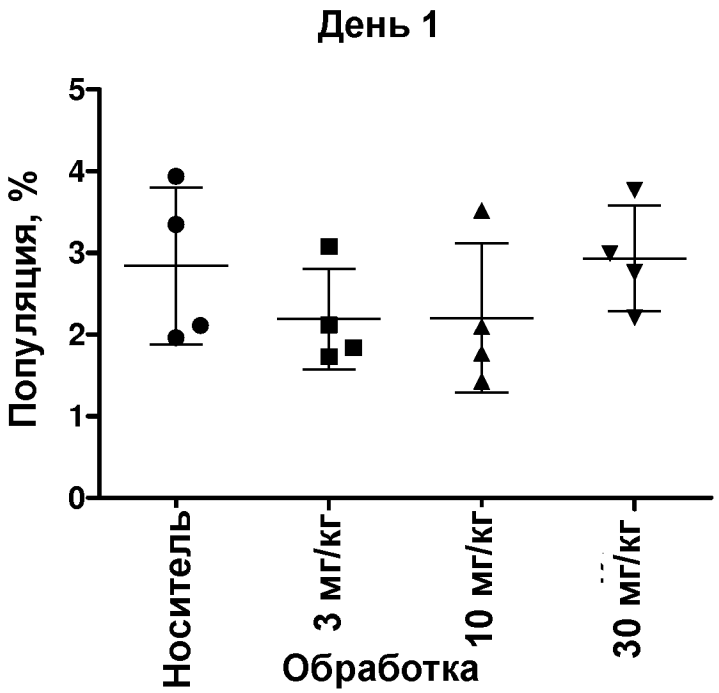
ФИГ. 22C


Ответ репортерных клеток на взаимодействие между CD40L и CD40, TNFα и TNFαR, %
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
10^{2}
Концентрация антитела (нМ)
APB-B1a
APB-B1b
anti-TNF-α Fab'
anti-CD40L IgG
anti-TNF-α Fab'+anti-CD40L IgG
SL335 Fab
клеточн. контроль
TNFa-TNFaR maxi.
CD40L-CD40 maxi.
Оба взаимодействия maxi.

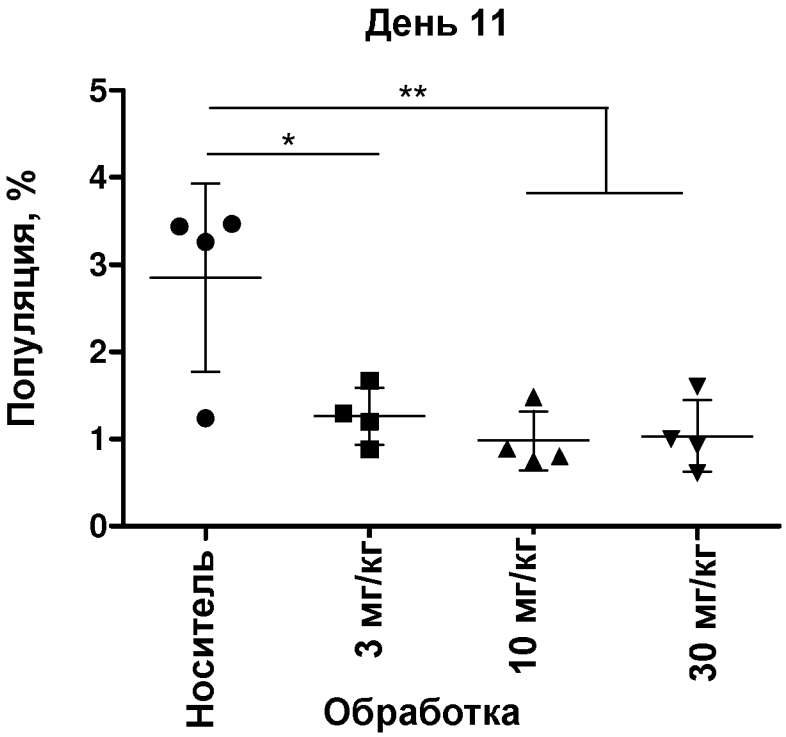
ФИГ. 23


Концентрация APB-A1 (мкг/мл)
10000
1000
100
10
1
0
10
20
30
40
50
APB-A1 (10 мг/кг)
APB-A1 (30 мг/кг)
Время (дни)

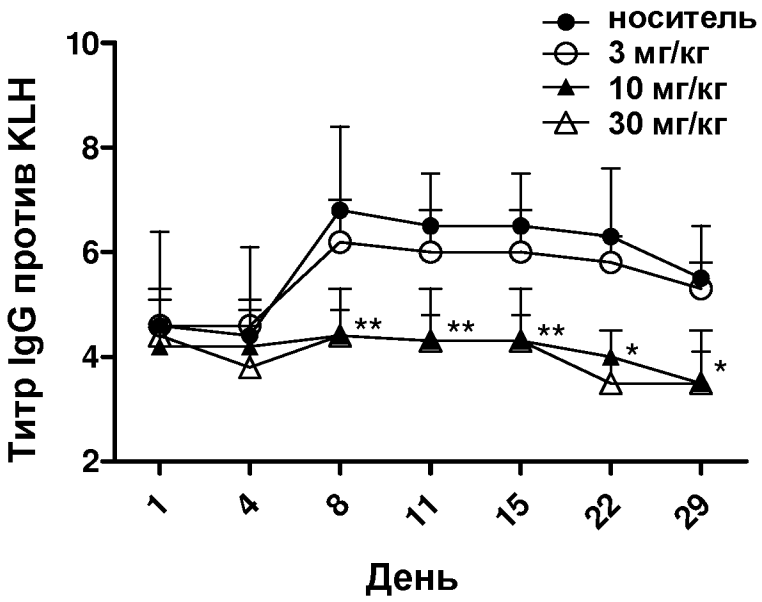
ФИГ. 24A



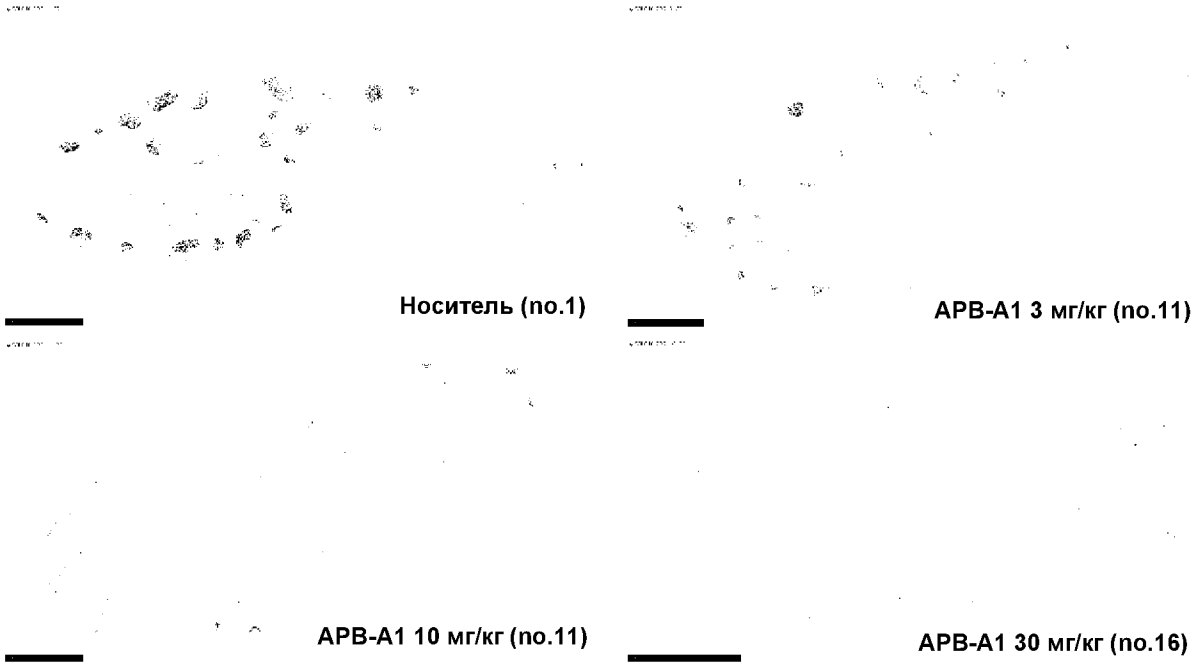
ФИГ. 24B



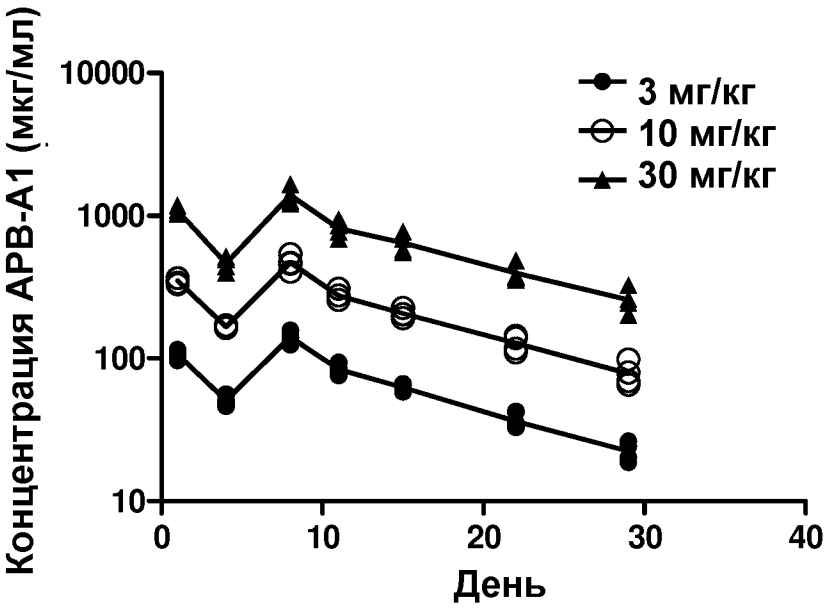
ФИГ. 25


носитель
3 мг/кг
10 мг/кг
30 мг/кг
Титр IgG против KLH
10
8
6
4
2
1
4
8
11
15
22
29
День
**
**
**
*
*

ФИГ. 26


Носитель (no.1)
APB-A1 3 мг/кг (no.11)
APB-A1 10 мг/кг (no.11)
APB-A1 30 мг/кг (no.16)

ФИГ. 27


Концентрация APB-A1 (мкг/мл)
10000
1000
100
10
0
10
20
30
40
День
3 мг/кг
10 мг/кг
30 мг/кг