



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.03.17

(51) Int. Cl. **C07K 16/46** (2006.01)

(21) Номер заявки
201991510

(22) Дата подачи заявки
2017.12.18

**(54) КАРКАСЫ АНТИТЕЛ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ АГРЕГИРОВАНИЯ
ПОЛИСПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ**

(31) **1621591.5**

(32) **2016.12.19**

(33) **GB**

(43) **2019.11.29**

(86) **PCT/EP2017/083301**

(87) **WO 2018/114795 2018.06.28**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЮСБ БИОФАРМА СРЛ (BE)

(72) Изобретатель:
**Бхатта Паллави, Хамфриз Дэвид Пол
(GB)**

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

(56) **WO-A2-2015189638**
WO-A1-2014206561

LEO BORRAS ET AL.: "Generic approach for the generation of stable humanized single-chain Fv fragments from rabbit monoclonal antibodies", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, US, vol. 285, no. 12, 9 March 2010

(2010-03-09), pages 9054-9066, XP002668298, ISSN: 0021-9258, DOI:10.1074/JBC.M109.072876 [retrieved on 2010-01-07], the whole document in particular, abstract and page 9064

US-B1-8399625

TIMOTHY J. EGAN ET AL.: "Novel multispecific heterodimeric antibody format allowing modular assembly of variable domain fragments", MABS, vol. 9, no. 1, 27 October 2016 (2016-10-27), pages 68-84, XP055467772, US, ISSN: 1942-0862, DOI:10.1080/19420862.2016.1248012, the whole document in particular, pages 69 and 75

EWERT S. ET AL.: "Biophysical Properties of Human Antibody Variable Domains", JOURNAL OF MOLECULAR BIO, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, vol. 325, no. 3, 17 January 2003 (2003-01-17), pages 531-553, XP004457555, ISSN: 0022-2836, DOI:10.1016/S0022-2836(02)01237-8, the whole document

WEIDLE U.H. ET AL.: "The intriguing options of multispecific antibody formats for treatment of cancer", CANCER GENOMICS & PROTEOMICS, INTERNATIONAL INSTITUTE OF ANTICANCER RESEARCH, GR, vol. 10, no. 1, 1 January 2013 (2013-01-01), pages 1-18, XP002728008, ISSN: 1109-6535, the whole document in particular, pages 5-6

(57) В изобретении предусмотрена молекула полиспецифического антитела, содержащая по меньшей мере два связывающих домена, каждый с вариабельной тяжелой областью VH и вариабельной легкой областью VL, где каждый связывающий домен обладает специфичностью к антигену и содержит шесть CDR, характеризующихся тем, что по меньшей мере один связывающий домен содержит (a) вариабельную тяжелую область VHA, имеющую каркас, содержащий SEQ ID NO: 1 для FR1, SEQ ID NO: 3 для FR2, SEQ ID NO: 4 для FR3 и SEQ ID NO: 5 для FR4, при условии, что CDRH3 в VHA отличается от RYYSAMPFAY (SEQ ID NO: 129), и вариабельную легкую область VLA, имеющую каркас, содержащий SEQ ID NO: 6 для FR1, SEQ ID NO: 7 для FR2, SEQ ID NO: 8 для FR3 и SEQ ID NO: 10 для FR4; или (b) вариабельную тяжелую область VHA, имеющую каркас, содержащий SEQ ID NO: 16 для FR1, SEQ ID NO: 18 для FR2, SEQ ID NO: 19 для FR3 и SEQ ID NO: 20 для FR4, при условии, что CDRH3 в VHA отличается от RYYSAMPFAY (SEQ ID NO: 129), и вариабельную легкую область VLA, имеющую каркас, содержащий SEQ ID NO: 11 для FR1, SEQ ID NO: 12 для FR2, SEQ ID NO: 13 для FR3 и SEQ ID NO: 15 для FR4; и где по меньшей мере одна вариабельная область VHA и по меньшей мере одна вариабельная область VLA присутствуют в dsscFv; и где указанная молекула полиспецифического антитела представляет собой Fab-dsscFv или Fab-(dsscFv)₂, где указанная молекула полиспецифического антитела является биспецифической или триспецифической.

Настоящее изобретение относится к молекуле антитела, содержащей каркас со сниженной предрасположенностью к агрегированию, и способу ее создания. Раскрытие также относится к фармацевтическим композициям, содержащим молекулу антитела по настоящему раскрытию, и использованию любой одной из них в лечении. Раскрытие также простирается на молекулы антител, получаемые с помощью способа.

Предпосылки

Путем одновременного связывания с двумя антигенами биспецифические антитела могут вызывать новые биологические свойства и давать усиленный клинический эффект через усовершенствованное направленное действие лекарственных средств. Fv и scFv представляют собой дискретные антигенсвязывающие домены, которые слиты с каркасами Fab или IgG для придания мультиспецифичности в широком спектре форматов (рассмотрено в Spiess et al., 2015). Превращение Fv в scFv через введение полипептидного линкера между V_H и V_L исходно выполняли для стабилизации относительно слабого интерфейса V_H - V_L , но динамическая замена домена ("дыхание") между проксимальными мономерами scFv может вести к меняющимся уровням мономера, димера и мультимеров более высокого порядка (Weatherill et al., 2012). Высокие уровни образования мультимеров в ходе экспрессии белка, таким образом, в конечном итоге ведут к низкому общему выходу терапевтического белка.

Формирование дисульфидной (ds) связи в scFv между V_H и V_L препятствует "дыханию" варибельного домена в очищенном scFv и, таким образом, фиксирует соотношения мономер:мультимер, чтобы делать возможной очистку мономерных продуктов (Weatherill, et al., 2012). Введение дисульфидной связи V_H - V_L необратимо блокирует все мультимерные формы в ходе экспрессии/очистки и, следовательно, облегчает выделение желательных (мономерных) частиц из нежелательных (мультимерных) посредством очистки.

Таким образом, присутствие дисульфидной связи не оптимизирует количество экспрессируемого мономера.

Однако в данной области сохраняется потребность в новом средстве для усовершенствования выхода мономера полиспецифических антител.

Краткое изложение раскрытия

Настоящее раскрытие предусматривает молекулу полиспецифического антитела, содержащую по меньшей мере два связывающих домена, каждый с варибельной тяжелой областью V_H и варибельной легкой областью V_L , где каждый связывающий домен обладает специфичностью к антигену и содержит шесть CDR, характеризующихся тем, что по меньшей мере один связывающий домен содержит варибельную тяжелую область, V_{HA} , имеющую каркас, содержащий валин в положении 5, лизин в положении 13, аланин в положении 24 и треонин в положении 96, при условии, что CDRH3 в V_{HA} отличается от RYYSAMPFAY (SEQ ID № 129), и варибельную легкую область, V_{LA} , имеющую каркас, содержащий лейцин в положении 11 и глутамин в положении 103. В одном из вариантов осуществления CDRH3 в V_{HA} также отличается от PPQYYEGSIYRLWFAH (SEQ ID № 117).

В одном из вариантов осуществления CDRL3 в V_{LA} отличается от QQNYDFPLT (SEQ ID № 136) или QQTWSDPWT (SEQ ID № 120).

Раскрытие резюмировано в следующих пунктах.

1. Молекула полиспецифического антитела, содержащая по меньшей мере два связывающих домена, каждый с варибельной тяжелой областью V_H и варибельной легкой областью V_L , где каждый связывающий домен обладает специфичностью к антигену и содержит шесть CDR, характеризующихся тем, что по меньшей мере один связывающий домен содержит варибельную тяжелую область, V_{HA} , имеющую каркас, содержащий валин в положении 5, лизин в положении 13, аланин в положении 24 и треонин в положении 96, при условии, что CDRH3 в V_{HA} отличается от RYYSAMPFAY (SEQ ID № 129), и варибельную легкую область, V_{LA} , имеющую каркас, содержащий лейцин в положении 11 и глутамин в положении 103.

2. Молекула полиспецифического антитела в соответствии с п.1, в которой по меньшей мере одна варибельная область V_{HA} имеет каркас, дополнительно содержащий одно или более из валина в положении 48, лейцина в положении 78, лизина в положении 86, треонина в положении 87 и треонина в положении 97.

3. Молекула полиспецифического антитела в соответствии с п.1 или 2, в которой по меньшей мере одна варибельная область V_{LA} имеет каркас, дополнительно содержащий одно или более из аланина в положении 1 и лейцина в положении 4.

4. Молекула полиспецифического антитела в соответствии с п.1, в которой по меньшей мере одна варибельная область V_{HA} имеет каркас, дополнительно содержащий одно или более из валина в положении 71, аланина в положении 74, серина в положении 77 и аланина в положении 78.

5. Молекула полиспецифического антитела в соответствии с п.1 или 2, в которой по меньшей мере одна варибельная область V_{LA} имеет каркас, дополнительно содержащий одно или более из валина в положении 44, треонина в положении 66, тирозина в положении 72, валина в положении 84, фенилаланина в положении 88 и лейцина в положении 107.

6. Молекула полиспецифического антитела в соответствии с п.1, в которой по меньшей мере одна

вариабельная область, V_{HA} , имеет каркас, содержащий SEQ ID NO: 1 для FR1, SEQ ID NO: 141, где X_9 представляет собой V или I, для FR2, SEQ ID NO: 142, где X_{10} представляет собой R или V, X_{11} представляет собой D или K, X_{12} представляет собой S или A, X_{13} представляет собой T или S, X_{14} представляет собой L или A, X_{15} представляет собой K или R, X_{16} представляет собой T или A и X_{17} представляет собой T или R, для FR3 и SEQ ID NO: 5 для FR4.

7. Молекула полиспецифического антитела в соответствии с п.6, в которой V_{HA} образует пару с V_{LA} , где V_{LA} имеет каркас, содержащий SEQ ID NO: 137, где X_1 представляет собой A или D и X_2 представляет собой L или M, для FR1, SEQ ID NO: 138, где X_3 представляет собой A или V, для FR2, SEQ ID NO: 139, где X_4 представляет собой S или T, X_5 представляет собой F или Y, X_6 представляет собой F или V и X_7 представляет собой Y или F, для FR3 и SEQ ID NO: 140, где X_8 представляет собой V или L, для FR4.

8. Молекула полиспецифического антитела в соответствии с п.1, в которой по меньшей мере одна вариабельная область, V_{HA} , имеет каркас, содержащий SEQ ID NO: 1 для FR1, SEQ ID NO: 2 или 3 для FR2, SEQ ID NO: 4 для FR3 и SEQ ID NO: 5 для FR4 или его производное с одним, двумя, тремя, четырьмя или пятью изменениями во всем каркасе и не более чем двумя изменениями аминокислот в любом одном из FR1, FR2, FR3 и FR4.

9. Молекула полиспецифического антитела в соответствии с п.8, в которой V_{HA} образует пару с V_{LA} , где V_{LA} имеет каркас, содержащий SEQ ID NO: 6 для FR1, SEQ ID NO: 7 для FR2, SEQ ID NO: 8 для FR3 и SEQ ID NO: 9 или 10 для FR4.

10. Молекула полиспецифического антитела в соответствии с п.1, в которой по меньшей мере одна вариабельная область, V_{LA} , имеет каркас, содержащий SEQ ID NO: 6 для FR1, SEQ ID NO: 7 для FR2, SEQ ID NO: 8 для FR3 и SEQ ID NO: 9 или 10 для FR4, или его производное с одним, двумя, тремя, четырьмя или пятью изменениями во всем каркасе и не более чем двумя изменениями аминокислот в любом одном из FR1, FR2, FR3 и FR4.

11. Молекула полиспецифического антитела в соответствии с п.10, в которой V_{LA} имеет каркас, содержащий SEQ ID NO: 6 для FR1, SEQ ID NO: 7 для FR2, SEQ ID NO: 8 для FR3 и SEQ ID NO: 9 или 10 для FR4.

12. Молекула полиспецифического антитела в соответствии с любым из пп.8 до 12, в которой V_{LA} содержит SEQ ID NO: 98 и V_{HA} содержит SEQ ID NO: 100 или V_{LA} содержит SEQ ID NO: 99 и V_{HA} содержит SEQ ID NO: 101.

13. Молекула полиспецифического антитела в соответствии с п.12, в которой один связывающий домен содержит SEQ ID NO: 106.

14. Молекула полиспецифического антитела в соответствии с п.1, в которой по меньшей мере одна вариабельная область, V_{HA} , имеет каркас, содержащий SEQ ID NO: 16 для FR1, SEQ ID NO: 17 или 18 для FR2, SEQ ID NO: 19 для FR3 и SEQ ID NO: 20 для FR4, или его производное с одним, двумя, тремя, четырьмя или пятью изменениями во всем каркасе и не более чем двумя изменениями аминокислот в любом одном из FR1, FR2, FR3 и FR4.

15. Молекула полиспецифического антитела в соответствии с п.14, в которой V_{HA} образует пару с V_{LA} , где V_{LA} имеет каркас, содержащий SEQ ID NO: 11 для FR1, SEQ ID NO: 12 для FR2, SEQ ID NO: 13 для FR3 и SEQ ID NO: 14 или 15 для FR4.

16. Молекула полиспецифического антитела в соответствии с п.1, в которой по меньшей мере одна вариабельная область, V_{LA} , имеет каркас, содержащий SEQ ID NO: 11 для FR1, SEQ ID NO: 12 для FR2, SEQ ID NO: 13 для FR3 и SEQ ID NO: 14 или 15 для FR4, или его производное с одним, двумя, тремя, четырьмя или пятью изменениями во всем каркасе и не более чем двумя изменениями аминокислот в любом одном из FR1, FR2, FR3 и FR4.

17. Молекула полиспецифического антитела в соответствии с п.16, в которой V_{LA} имеет каркас, содержащий SEQ ID NO: 11 для FR1, SEQ ID NO: 12 для FR2, SEQ ID NO: 13 для FR3 и SEQ ID NO: 14 или 15 для FR4.

18. Молекула полиспецифического антитела в соответствии с любым из пп.1-17, в которой V_{HA} содержит три CDR тяжелой цепи, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 143 для CDRH1, SEQ ID NO: 144 для CDRH2 и SEQ ID NO: 145 для CDRH3.

19. Молекула полиспецифического антитела в соответствии с любым из пп.1-18, в которой V_{LA} содержит три CDR легкой цепи, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 146 для CDRL1, SEQ ID NO: 147 для CDRL2 и SEQ ID NO: 148 для CDRL3.

20. Молекула полиспецифического антитела в соответствии с любым из пп.14-19, в которой V_{LA} содержит SEQ ID NO: 102 и V_{HA} содержит SEQ ID NO: 104 или V_{LA} содержит SEQ ID NO: 103 и V_{HA} содержит SEQ ID NO: 105.

21. Молекула полиспецифического антитела в соответствии с п.20, в которой один связывающий домен содержит SEQ ID NO: 111.

22. Молекула полиспецифического антитела в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в которой CDR имеют не относящееся к человеку происхождение.

23. Молекула полиспецифического антитела в соответствии с любым из предыдущих пунктов, где

молекула антитела является биспецифической или триспецифической, например, биспецифической.

24. Молекула полиспецифического антитела в соответствии с п.23, где формат молекулы антитела представляет собой Fab-dsscFv или Fab-(dsscFv)₂.

25. Акцепторный каркас для минимизации агрегирования в полиспецифическом антителе, содержащем SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 22 и 24, где XXX в каждом из положений CDR независимо представляет от 1 до 35 аминокислот.

26. Способ улучшения уровней экспрессии мономера молекулы антитела, имеющей по меньшей мере один связывающий домен с варибельной тяжелой областью и варибельной легкой областью, где каждая варибельная область имеет каркас и три CDR, указанный способ содержит стадию замены каркаса варибельной области на каркас, выбранный из группы, содержащей или состоящей из:

i) каркаса (такого как каркас области V_H), содержащего SEQ ID NO: 1 для FR1, SEQ ID NO: 2 или 3 для FR2, SEQ ID NO: 4 для FR3 и SEQ ID NO: 5 для FR4;

ii) каркаса (такого как каркас области V_H), содержащего SEQ ID NO: 16 для FR1, SEQ ID NO: 17 или 18 для FR2, SEQ ID NO: 19 для FR3 и SEQ ID NO: 20 для FR4;

iii) каркаса (такого как каркас области V_L), содержащего SEQ ID NO: 6 для FR1, SEQ ID NO: 7 для FR2, SEQ ID NO: 8 для FR3 и SEQ ID NO: 9 или 10 для FR4;

iv) каркаса (такого как каркас области V_L), содержащего V_{L1}, SEQ ID NO: 11 для FR1, SEQ ID NO: 12 для FR2, SEQ ID NO: 13 для FR3 и SEQ ID NO: 14 или 15 для FR4;

v) их сочетаний и

vi) производного любого из них с одним, двумя, тремя, четырьмя или пятью изменениями во всем каркасе и не более чем двумя изменениями аминокислот в любом одном из FR1, FR2, FR3 и FR4.

27. Способ в соответствии с п.26, в котором каркас V_H меняют на каркас, содержащий SEQ ID NO: 1 для FR1, SEQ ID NO: 2 или 3 для FR2, SEQ ID NO: 4 для FR3 и SEQ ID NO: 5 для FR4.

28. Способ в соответствии с п.26, в котором каркас V_H меняют на каркас, содержащий SEQ ID NO: 16 для FR1, SEQ ID NO: 17 или 18 для FR2, SEQ ID NO: 19 для FR3 и SEQ ID NO: 20 для FR4.

29. Способ в соответствии с любым одним из пп.26-28, в котором каркас V_L меняют на каркас, содержащий SEQ ID NO: 6 для FR1, SEQ ID NO: 7 для FR2, SEQ ID NO: 8 для FR3 и SEQ ID NO: 9 или 10 для FR4.

30. Способ в соответствии с любым одним из пп.26-28, в котором каркас V_L меняют на каркас, содержащий SEQ ID NO: 11 для FR1, SEQ ID NO: 12 для FR2, SEQ ID NO: 13 для FR3 и SEQ ID NO: 14 или 15 для FR4.

31. Способ в соответствии с любым одним из пп.26-28, в котором уровни мономера молекулы антитела анализируют до изменения каркаса или каркасов.

32. Способ в соответствии с любым одним из пп.26-28, в котором уровни мономера молекулы антитела анализируют после изменения каркаса или каркасов.

33. Способ в соответствии с любым одним из пп.26-32, в котором молекула антитела представляет собой молекулу полиспецифического антитела, например, биспецифического.

34. Способ в соответствии с п.29, в котором молекула полиспецифического антитела представляет собой Fab-dsscFv или Fab-(dsscFv)₂.

35. Способ в соответствии с любым одним из пп.26-34, в котором каркас или каркасы находятся в scFv или Fv, в том числе когда любой один из них является частью части молекулы полиспецифического антитела, такой как биспецифическая молекула.

36. Способ в соответствии с любым одним из пп.33-35, в котором молекула полиспецифического антитела содержит по меньшей мере два связывающих домена и способ включает дополнительную стадию изменения относительного положения связывающих доменов в молекуле антитела.

Краткое описание фигур

Фиг. 1. Представлена таблица, в которой приведен формат, включенный в "набор 1".

Фиг. 2. Приведены последовательности в соответствии с настоящим изобретением.

Фиг. 3. Набор 1. Титры экспрессии Fab и BYbe (когнатные каркасы), экспрессируемые в клетках ExpiHEK, n=2.

Фиг. 4. % мономеров для Fab и BYbe из набора 1 (когнатные пары).

Фиг. 5. SDS-PAGE для Fab из набора 1. Полноразмерные Fab (a) и легкие и тяжелые цепи (b).

Фиг. 6. SDS-PAGE для BYbe из набора 1

Фиг. 7. Представлены форматы Fab-dsFv и Fab-dsscFv и мономерные и димерные формы.

Фиг. 8. Представлены форматы Fab-2x dsscFv и формат Fab-dsscFv-dsFv.

Подробное раскрытие

Авторы настоящего изобретения исследовали влияние на мультимеризацию со стороны каркаса (FW) dsscFv и остатков CDR через пересадку определенного спектра Fab-dsscFv с заменой Fv FW/CDR. К удивлению, они обнаружили, что определенные каркасы могут положительно влиять на достигаемые уровни мономеров.

Настоящее раскрытие предусматривает молекулу полиспецифического антитела, содержащую по

меньшей мере два связывающих домена, каждый с вариабельной тяжелой областью V_H и вариабельной легкой областью V_L , где каждый связывающий домен обладает специфичностью к антигену и содержит шесть CDR, характеризующихся тем, что по меньшей мере один связывающий домен содержит вариабельную тяжелую область, V_{HA} , имеющую каркас, содержащий валин в положении 5, лизин в положении 13, аланин в положении 24 и треонин в положении 96, при условии, что CDRH3 в V_{HA} отличается от RYYSAMPFAY (SEQ ID № 129), и вариабельную легкую область, V_{LA} , имеющую каркас, содержащий лейцин в положении 11 и глутамин в положении 103. В одном из вариантов осуществления CDRH3 в V_{HA} также отличается от PPQYYEGSIYRLWFAH (SEQ ID № 117).

В одном из вариантов осуществления CDRL3 в V_{LA} отличается от QQNYDFPLT (SEQ ID № 136) или QQTWSDPWT (SEQ ID № 120).

В одном из вариантов осуществления по меньшей мере одна вариабельная область, V_{HA} , имеет каркас, дополнительно содержащий одно или более из валина в положении 48, лейцина в положении 78, лизина в положении 86, треонина в положении 87 и треонина в положении 97.

В одном из вариантов осуществления изобретения по меньшей мере одна вариабельная область, V_{LA} , имеет каркас, дополнительно содержащий одно или более из аланина в положении 1 и лейцина в положении 4.

Соответственно, настоящее изобретение предусматривает полиспецифическое антитело, содержащее вариабельные области V_{HA} и V_{LA} , имеющие одну из следующих комбинаций из остатков каркаса 497 в табл. 1.

Таблица 1

V_{LA}	V_{HA}
11L, 103Q	5V, 13K, 24A, 96T
11L, 103Q	5V, 13K, 24A, 48V, 78L, 86K, 87T, 96T, 97T
1A, 4L, 11L, 103Q	5V, 13K, 24A, 48V, 78L, 86K, 87T, 96T, 97T
1A, 4L, 11L, 103Q	5V, 13K, 24A, 96T

В альтернативном варианте осуществления по меньшей мере одна вариабельная область, V_{HA} , имеет каркас, дополнительно содержащий одно или более из валина в положении 71, аланина в положении 74, серина в положении 77 и аланина в положении 78.

В одном из вариантов осуществления по меньшей мере одна вариабельная область, V_{LA} , имеет каркас, дополнительно содержащий одно или более из валина в положении 44, треонина в положении 66, тирозина в положении 72, валина в положении 84, фенилаланина в положении 88 и лейцина в положении 107.

Соответственно, настоящее изобретение предусматривает полиспецифическое антитело, содержащее вариабельные области V_{HA} и V_{LA} , имеющие одну из следующих комбинаций из остатков каркаса 2109 в табл. 2.

Таблица 2

V_{LA}	V_{HA}
11L, 103Q	5V, 13K, 24A, 96T
11L, 103Q	5V, 13K, 24A, 71V, 74A, 77S, 78A, 96T,
11L, 44V, 66T, 72Y, 84V, 88F, 103Q, 107L	5V, 13K, 24A, 71V, 74A, 77S, 78A, 96T,
11L, 44V, 66T, 72Y, 84V, 88F, 103Q, 107L	5V, 13K, 24A, 96T

В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрено полиспецифическое антитело, в котором по меньшей мере одна вариабельная область, V_{HA} , имеет каркас, содержащий SEQ ID NO: 1 для FR1, SEQ ID NO: 141, где X_9 представляет собой V или I, для FR2, SEQ ID NO: 142, где X_{10} представляет собой R или V, X_{11} представляет собой D или K, X_{12} представляет собой S или A, X_{13} представляет собой T или S, X_{14} представляет собой L или A, X_{15} представляет собой K или R, X_{16} представляет собой T или A и X_{17} представляет собой T или R, для FR3 и SEQ ID NO: 5 для FR4, при условии, что CDRH3 в V_{HA} отличается от RYYSAMPFAY (SEQ ID № 129).

В одном из вариантов осуществления по этому аспекту, V_{HA} образует пару с V_{LA} , где V_{LA} имеет каркас, содержащий SEQ ID NO: 137, где X_1 представляет собой A или D и X_2 представляет собой L или M, для FR1, SEQ ID NO: 138, где X_3 представляет собой A или V, для FR2, SEQ ID NO: 139, где X_4 представляет собой S или T, X_5 представляет собой F или Y, X_6 представляет собой F или V и X_7 представляет собой Y или F, для FR3 и SEQ ID NO: 140, где X_8 представляет собой V или L, для FR4.

В одном из вариантов осуществления CDRL3 в V_{LA} отличается от QQNYDFPLT (SEQ ID № 136) или QQTWSDPWT (SEQ ID № 120).

Молекулы полиспецифических антител, имеющие каркасные остатки и последовательности V_{HA} и V_{LA} , как описано в настоящем изобретении, могут содержать любые подходящие остатки CDR. В одном из вариантов осуществления молекула полиспецифического антитела содержит три CDR тяжелой цепи в V_{HA} , имеющей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 143 для CDRH1, SEQ ID NO: 144 для CDRH2 и SEQ ID NO: 145 для CDRH3. В дополнительном варианте осуществления содержит три CDR легкой цепи в V_{LA} , имеющей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 146 для CDRL1, SEQ ID NO: 147 для CDRL2 и SEQ ID NO: 148 для CDRL3. В одном из вариантов осуществления молекула полиспецифического антитела содержит три CDR тяжелой цепи в V_{HA} , имеющей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 143 для CDRH1, SEQ ID NO: 144 для CDRH2 и SEQ ID NO: 145 для CDRH3, и три CDR легкой цепи в V_{LA} , имеющей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 146 для CDRL1, SEQ ID NO: 147 для CDRL2 и SEQ ID NO: 148 для CDRL3.

В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения полиспецифическое антитело содержит последовательности каркаса 497.

Соответственно, настоящее раскрытие предусматривает молекулу полиспецифического антитела, содержащую по меньшей мере два связывающих домена, каждый с вариабельной тяжелой областью и вариабельной легкой областью, где каждый связывающий домен обладает специфичностью к антигену и содержит шесть CDR, характеризующихся тем, что по меньшей мере одна вариабельная область, V_{HA} , имеет каркас, содержащий SEQ ID NO: 1 для FR1, SEQ ID NO: 2 или 3 для FR2, SEQ ID NO: 4 для FR3 и SEQ ID NO: 5 для FR4, или его производное с одним, двумя, тремя, четырьмя или пятью изменениями во всем каркасе и не более чем двумя изменениями аминокислот в любом одном из FR1, FR2, FR3 и FR4. В одном из вариантов осуществления имеет место не более чем одно аминокислотное изменение в любом одном из FR1, FR2, FR3 и FR4.

В одном из вариантов осуществления предусмотрена молекула полиспецифического антитела, содержащая по меньшей мере два связывающих домена, каждый с вариабельной тяжелой областью и вариабельной легкой областью, где каждый связывающий домен обладает специфичностью к антигену и содержит шесть CDR, характеризующихся тем, что по меньшей мере одна вариабельная область, V_{HA} , имеет каркас, содержащий SEQ ID NO: 1 для FR1, SEQ ID NO: 2 или 3 для FR2, SEQ ID NO: 4 для FR3 и SEQ ID NO: 5 для FR4.

В одном из вариантов осуществления предусмотрена молекула полиспецифического антитела в соответствии с настоящим раскрытием, в которой V_{HA} образует пару с V_{LA} , где V_{LA} имеет каркас, содержащий SEQ ID NO: 6 для FR1, SEQ ID NO: 7 для FR2, SEQ ID NO: 8 для FR3 и SEQ ID NO: 9 или 10 для FR4.

В одном из вариантов осуществления предусмотрена молекула полиспецифического антитела, содержащая по меньшей мере два связывающих домена, каждый с вариабельной тяжелой областью и вариабельной легкой областью, где каждый связывающий домен обладает специфичностью к антигену и содержит шесть CDR, характеризующихся тем, что по меньшей мере одна вариабельная область, V_{LA} , имеет каркас, содержащий SEQ ID NO: 6 для FR1, SEQ ID NO: 7 для FR2, SEQ ID NO: 8 для FR3 и SEQ ID NO: 9 или 10 для FR4, или его производное с одним, двумя, тремя, четырьмя или пятью изменениями во всем каркасе и не более чем двумя изменениями аминокислот в любом одном из FR1, FR2, FR3 и FR4. В одном из вариантов осуществления имеет место не более чем одно аминокислотное изменение в любом одном из FR1, FR2, FR3 и FR4.

В одном из вариантов осуществления предусмотрена молекула полиспецифического антитела в соответствии с настоящим раскрытием, в которой V_{LA} имеет каркас, содержащий SEQ ID NO: 6 для FR1, SEQ ID NO: 7 для FR2, SEQ ID NO: 8 для FR3 и SEQ ID NO: 9 или 10 для FR4.

В одном из вариантов осуществления предусмотрена молекула полиспецифического антитела в соответствии с настоящим раскрытием, в которой V_{HA} образует пару с V_{LA} и V_{HA} имеет каркас, содержащий SEQ ID NO: 21, и V_{LA} имеет каркас, содержащий SEQ ID NO: 23, или V_{HA} имеет каркас, содержащий SEQ ID NO: 22, и V_{LA} имеет каркас, содержащий SEQ ID NO: 24, где XXX в каждом из положений CDR независимо представляет от 1 до 35 аминокислот, например, для использования в scFv или молекуле, содержащей его.

В одном из вариантов осуществления по настоящему раскрытию предусмотрены акцепторные каркасы для минимизации агрегирования, содержащие SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 24, где XXX в каждом из положений CDR независимо представляет от 1 до 35 аминокислот, например, для использования в scFv или молекуле, содержащей его.

В одном из вариантов осуществления по настоящему раскрытию предусмотрена молекула полиспецифического антитела, содержащая по меньшей мере два связывающих домена, каждый с вариабельной тяжелой областью и вариабельной легкой областью, где каждый связывающий домен обладает специфичностью к антигену и содержит шесть CDR, характеризующихся тем, что одна вариабельная область, V_{HA} , образует пару с вариабельной областью V_{LA} , имея одну из следующих комбинаций аминокислотных последовательностей V_{HA} и V_{LA} в табл. 3.

Таблица 3

VL _A	VH _A
SEQ ID № 98 и	SEQ ID № 100
SEQ ID № 99 и	SEQ ID № 101

В независимом аспекте настоящее раскрытие предусматривает scFv антитело, содержащее SEQ ID NO: 106 или SEQ ID NO: 107. В одном из вариантов осуществления scFv антитело представляет собой часть полиспецифического антитела, такого как BYbe или TrYbe.

В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один связывающий домен с вариательной тяжелой областью V_{HA} и вариательной легкой областью V_{LA} содержит последовательности каркаса 2109, как описано ниже.

В дополнительном варианте осуществления по этому аспекту по настоящему изобретению полиспецифическое антитело содержит последовательности каркаса 2109. Соответственно, настоящее изобретение предусматривает молекулу полиспецифического антитела, содержащую по меньшей мере два связывающих домена, каждый с вариательной тяжелой областью и вариательной легкой областью, где каждый связывающий домен обладает специфичностью к антигену и содержит шесть CDR, характеризующихся тем, что по меньшей мере одна вариательная область, V_{HA}, имеет каркас, содержащий

SEQ ID NO: 16 для FR1, SEQ ID NO: 17 или 18 для FR2, SEQ ID NO: 19 для FR3 и SEQ ID NO: 20 для FR4, или его производное с одним, двумя, тремя, четырьмя или пятью изменениями во всем каркасе и не более чем двумя изменениями аминокислот в любом одном из FR1, FR2, FR3 и FR4; при условии, что CDRH3 в V_{HA} отличается от RYYSAMPFAY (SEQ ID № 129) или PPQYYEGSIYRLWFAH (SEQ ID № 117). В другом варианте осуществления имеет место не более чем одно аминокислотное изменение в любом одном из FR1, FR2, FR3 и FR4.

Настоящее раскрытие предусматривает молекулу полиспецифического антитела, содержащую по меньшей мере два связывающих домена, каждый с вариательной тяжелой областью и вариательной легкой областью, где каждый связывающий домен обладает специфичностью к антигену и содержит шесть CDR, характеризующихся тем, что по меньшей мере одна вариательная область, V_{HA}, имеет каркас, содержащий SEQ ID NO: 16 для FR1, SEQ ID NO: 17 или 18 для FR2, SEQ ID NO: 19 для FR3 и SEQ ID NO: 20 для FR4, при условии, что CDRH3 в V_{HA} отличается от RYYSAMPFAY (SEQ ID № 129) или PPQYYEGSIYRLWFAH (SEQ ID № 117).

В одном из вариантов осуществления предусмотрена молекула полиспецифического антитела в соответствии с настоящим раскрытием, в которой V_{HA} образует пару с V_{LA}, где V_{LA} имеет каркас, содержащий SEQ ID NO: 11 для FR1, SEQ ID NO: 12 для FR2, SEQ ID NO: 13 для FR3 и SEQ ID NO: 14 или 15 для FR4, при условии, что CDRL3 в V_{LA} отличается от QQNYDFPLT (SEQ ID № 136) или QQTWSDPWT (SEQ ID № 120).

В одном из вариантов осуществления предусмотрена молекула полиспецифического антитела, содержащая по меньшей мере два связывающих домена, каждый с вариательной тяжелой областью и вариательной легкой областью, где каждый связывающий домен обладает специфичностью к антигену и содержит шесть CDR, характеризующихся тем, что по меньшей мере одна вариательная область имеет каркас, содержащий V_{LA}, SEQ ID NO: 11 для FR1, SEQ ID NO: 12 для FR2, SEQ ID NO: 13 для FR3 и SEQ ID NO: 14 или 15 для FR4, или его производное с одним, двумя, тремя, четырьмя или пятью изменениями во всем каркасе и не более чем двумя изменениями аминокислот в любом одном из FR1, FR2, FR3 и FR4; при условии, что CDRL3 в V_{LA} отличается от QQNYDFPLT (SEQ ID № 136) или QQTWSDPWT (SEQ ID № 120).

В одном из вариантов осуществления имеет место не более чем одно аминокислотное изменение в любом одном из FR1, FR2, FR3 и FR4.

В одном из вариантов осуществления предусмотрена молекула полиспецифического антитела, содержащая по меньшей мере два связывающих домена, каждый с вариательной тяжелой областью и вариательной легкой областью, где каждый связывающий домен обладает специфичностью к антигену и содержит шесть CDR, характеризующихся тем, что по меньшей мере одна вариательная область имеет каркас, содержащий V_{LA}, SEQ ID NO: 11 для FR1, SEQ ID NO: 12 для FR2, SEQ ID NO: 13 для FR3 и SEQ ID NO: 14 или 15 для FR4, при условии, что CDRL3 в V_{LA} отличается от QQNYDFPLT (SEQ ID № 136) или QQTWSDPWT (SEQ ID № 120).

В одном из вариантов осуществления предусмотрена молекула полиспецифического антитела в соответствии с настоящим раскрытием, в которой V_{HA} образует пару с V_{LA} и V_{HA} имеет каркас, содержащий SEQ ID NO: 27, и V_{LA} имеет каркас, содержащий SEQ ID NO: 25, или V_{HA} имеет каркас, содержащий SEQ ID NO: 28, и V_{LA} имеет каркас, содержащий SEQ ID NO: 26, где XXX в каждом из положений CDR независимо представляет от 1 до 35 аминокислот, например, для использования в scFv или молекуле, содержащей его.

В одном из вариантов осуществления настоящего раскрытия предусматривает акцепторные каркасы для минимизации агрегирования, содержащие SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 27 или SEQ ID NO: 26 и 28,

где XXX в каждом из положений CDR независимо представляет от 1 до 35 аминокислот, например, для использования в scFv или молекуле, содержащей его.

В одном из вариантов осуществления по второму аспекту настоящее раскрытие предусматривает молекулу полиспецифического антитела, содержащую по меньшей мере два связывающих домена, каждый с вариабельной тяжелой областью и вариабельной легкой областью, где каждый связывающий домен обладает специфичностью к антигену и содержит шесть CDR, характеризующихся тем, что одна вариабельная область, V_{HA} , образует пару с вариабельной областью V_{LA} , имея одну из следующих комбинаций аминокислотных последовательностей V_{HA} и V_{LA} в табл. 4.

Таблица 4

V_{LA}	V_{HA}
SEQ ID № 102 и	SEQ ID № 104
SEQ ID № 103 и	SEQ ID № 105

В независимом аспекте настоящее раскрытие предусматривает scFv антитело, содержащее SEQ ID NO: 111 или SEQ ID NO: 112. В одном из вариантов осуществления scFv антитело представляет собой часть полиспецифического антитела, такого как BYbe или TrYbe.

Полиспецифическое антитело по настоящему изобретению может содержать остатки или последовательности каркаса 497, как определено выше, в одном или более, например двух, связывающих доменах. Полиспецифическое антитело по настоящему изобретению может содержать остатки или последовательности каркаса 2109, как определено выше, в одном или более, например двух, связывающих доменах. Полиспецифическое антитело по настоящему изобретению может содержать остатки или последовательности каркаса 497, как определено выше, в одном связывающем домене и остатки или последовательности каркаса 2109, как определено выше, в другом связывающем домене.

Соответственно, настоящее изобретение предусматривает следующие комбинации каркасов в табл. 5, как определено в первом и втором аспектах настоящего изобретения, для полиспецифических антител, содержащих два или больше связывающих домена.

Таблица 5

Связывающий домен 1 - каркасные остатки или последовательности из V_{HA} и V_{LA}	Связывающий домен 2 - каркасные остатки или последовательности из VH и V_{LB}
497	497
2109	2109
497	2109
497	другое
2109	другое

В любом варианте осуществления любого указанного выше первого и второго аспектов настоящего раскрытия, вариабельные области по настоящему раскрытию не содержат одну или более, например, все, из следующих CDR антитела 1:

CDRH1: GFTFSDYNMA (SEQ ID № 115)
 CDRH2: TITYEGRNTYYRDSVKG (SEQ ID № 116)
 CDRH3: PPQYYEGSIYRLWFAH (SEQ ID № 117)
 CDRL1: RADESVRTLMH (SEQ ID № 118)
 CDRL2: LVSNSEI (SEQ ID № 119)
 CDRL3: QQTWSDPWT (SEQ ID № 120)

В одном из вариантов осуществления любого указанного выше первого и второго аспектов настоящего раскрытия вариабельные области по настоящему раскрытию не содержат одну или более, например все, из следующих CDR антитела 2:

CDRH1: GVIFSDYYMA (SEQ ID № 121)
 CDRH2: SINFNADISYYRESVKG (SEQ ID № 122)
 CDRH3: DANRQNYDWFAY (SEQ ID № 123)
 CDRL1: KASESVSSSMYSYMH (SEQ ID № 124)
 CDRL2: RASNLES (SEQ ID № 125)
 CDRL3: QQSWTAPRT (SEQ ID № 126)

В одном из вариантов осуществления любого указанного выше первого и второго аспектов настоящего раскрытия вариабельные области по настоящему раскрытию не содержат одну или более, например все, из следующих CDR антитела 3:

CDRH1: GYTFTDNYIH (SEQ ID № 127)
 CDRH2: YINPSSAYAHYNEKFKT (SEQ ID № 128)
 CDRH3: RYYSAMPFAY (SEQ ID № 129)
 CDRL1: RASEDIYSGLA (SEQ ID № 130) или RASEDIYNGLA (SEQ ID № 131)
 CDRL2: DSSTLHT (SEQ ID № 132), или NSNTLHT (SEQ ID № 133),
 или NSSLHT (SEQ ID № 134), или DSNTLHT (SEQ ID № 135)
 CDRL3: QQNYDFPLT (SEQ ID № 136)

В одном из вариантов осуществления вариабельный домен в соответствии с настоящим раскрытием не имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 149.

В одном из вариантов осуществления вариабельный домен в соответствии с настоящим раскрытием не имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 150.

В одном из вариантов осуществления вариабельный домен в соответствии с настоящим раскрытием не имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 151.

В одном из вариантов осуществления вариабельный домен в соответствии с настоящим раскрытием не имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 152.

В одном из вариантов осуществления вариабельный домен в соответствии с настоящим раскрытием не имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 153.

В одном из вариантов осуществления полиспецифическое антитело в соответствии с настоящим изобретением, вариабельные области не содержат CDR антитела 1, которое определено выше, CDR антитела 2, которое определено выше, или CDR антитела 3, которое определено выше.

В одном из вариантов осуществления по меньшей мере один связывающий домен, такой как один связывающий домен в молекуле полиспецифического антитела, не содержит каркас по настоящему раскрытию.

Благоприятно использование каркасных последовательностей по настоящему раскрытию в вариабельных областях, подверженных агрегированию, например, через динамический процесс, обозначаемый как дыхание, может обеспечивать усовершенствованный выход мономера и/или сниженную предрасположенность к агрегированию.

Настоящее изобретение также относится к способу улучшения уровней экспрессии мономера молекулы антитела, имеющей по меньшей мере один связывающий домен с вариабельной тяжелой областью и вариабельной легкой областью, где каждая вариабельная область имеет каркас и три CDR, указанный способ включает стадию замены каркаса вариабельной области на каркас, выбранный из группы, содержащей или состоящей из:

- i) каркаса (такого как каркас области V_H), содержащего SEQ ID NO: 1 для FR1, SEQ ID NO: 2 или 3 для FR2, SEQ ID NO: 4 для FR3 и SEQ ID NO: 5 для FR4;
- ii) каркаса (такого как каркас области V_H), содержащего SEQ ID NO: 16 для FR1, SEQ ID NO: 17 или 18 для FR2, SEQ ID NO: 19 для FR3 и SEQ ID NO: 20 для FR4;
- iii) каркаса (такого как каркас области V_L), содержащего SEQ ID NO: 6 для FR1, SEQ ID NO: 7 для FR2, SEQ ID NO: 8 для FR3 и SEQ ID NO: 9 или 10 для FR4;
- iv) каркаса (такого как каркас области V_L), содержащего V_{L1} , SEQ ID NO: 11 для FR1, SEQ ID NO: 12 для FR2, SEQ ID NO: 13 для FR3 и SEQ ID NO: 14 или 15 для FR4;
- v) их сочетаний из каркаса V_H и каркаса V_L и
- vi) производного любого из них с одним, двумя, тремя, четырьмя или пятью изменениями во всем каркасе и не более чем двумя изменениями аминокислот в любом одном из FR1, FR2, FR3 и FR4.

В одном из вариантов осуществления предусмотрен способ в соответствии с настоящим раскрытием, в котором каркас V_H меняют на каркас, содержащий SEQ ID NO: 1 для FR1, SEQ ID NO: 2 или 3 для FR2, SEQ ID NO: 4 для FR3 и SEQ ID NO: 5 для FR4.

В одном из вариантов осуществления предусмотрен способ в соответствии с настоящим раскрытием, в котором каркас V_H меняют на каркас, содержащий SEQ ID NO: 16 для FR1, SEQ ID NO: 17 или 18 для FR2, SEQ ID NO: 19 для FR3 и SEQ ID NO: 20 для FR4.

В одном из вариантов осуществления предусмотрен способ в соответствии с настоящим раскрытием, в котором каркас V_L меняют на каркас, содержащий SEQ ID NO: 6 для FR1, SEQ ID NO: 7 для FR2, SEQ ID NO: 8 для FR3 и SEQ ID NO: 9 или 10 для FR4.

В одном из вариантов осуществления предусмотрен способ в соответствии с настоящим раскрытием, в котором каркас V_L меняют на каркас, содержащий V_{L1} , SEQ ID NO: 11 для FR1, SEQ ID NO: 12 для FR2, SEQ ID NO: 13 для FR3 и SEQ ID NO: 14 или 15 для FR4.

В одном из вариантов осуществления предусмотрен способ в соответствии с настоящим раскрытием, в котором уровни мономера молекулы антитела анализируют до изменения каркаса или каркасов.

В одном из вариантов осуществления предусмотрен способ в соответствии с настоящим раскрытием, в котором молекула антитела представляет собой молекулу полиспецифического антитела, такого как

биспецифическое или триспецифическое, например, биспецифическое.

В одном из вариантов осуществления предусмотрен способ в соответствии с настоящим раскрытием, в котором молекула полиспецифического антитела содержит по меньшей мере два связывающих домена и способ включает дополнительную стадию изменения относительного положения связывающих доменов в молекуле антитела.

В одном из вариантов осуществления по меньшей мере один связывающий домен полиспецифического антитела не содержит каркас со сниженной предрасположенностью к агрегации, как раскрыто в настоящем описании.

В одном из аспектов предусмотрена молекула антитела, которую получают или которая может быть получена с помощью способа по настоящему раскрытию.

Настоящее изобретение также относится к использованию каркаса, выбранного из группы, содержащей или состоящей из:

- i) каркаса (такого как каркас области V_H), содержащего SEQ ID NO: 1 для FR1, SEQ ID NO: 2 или 3 для FR2, SEQ ID NO: 4 для FR3 и SEQ ID NO: 5 для FR4;
- ii) каркаса (такого как каркас области V_H), содержащего SEQ ID NO: 16 для FR1, SEQ ID NO: 17 или 18 для FR2, SEQ ID NO: 19 для FR3 и SEQ ID NO: 20 для FR4;
- iii) каркаса (такого как каркас области V_L), содержащего SEQ ID NO: 6 для FR1, SEQ ID NO: 7 для FR2, SEQ ID NO: 8 для FR3 и SEQ ID NO: 9 или 10 для FR4;
- iv) каркаса (такого как каркас области V_L), содержащего V_{L1} , SEQ ID NO: 11 для FR1, SEQ ID NO: 12 для FR2, SEQ ID NO: 13 для FR3 и SEQ ID NO: 14 или 15 для FR4;
- v) их сочетаний и
- vi) производного любого из них с одним, двумя, тремя, четырьмя или пятью изменениями во всем каркасе и не более чем двумя изменениями аминокислот в любом одном из FR1, FR2, FR3 и FR4, для улучшения уровней мономера молекулы антитела.

В одном из аспектов настоящего изобретения предусмотрена молекула полиспецифического антитела, содержащая по меньшей мере два связывающих домена, каждый с варибельной тяжелой областью и варибельной легкой областью, где каждый связывающий домен обладает специфичностью к антигену и содержит шесть CDR, характеризующихся тем, что по меньшей мере одна варибельная область, V_{HA} , имеет каркас, содержащий SEQ ID NO: 1 для FR1, SEQ ID NO: 2 или 3 для FR2, SEQ ID NO: 4 для FR3 и SEQ ID NO: 5 для FR4, или его производное с одним, двумя, тремя, четырьмя или пятью изменениями во всем каркасе и не более чем двумя изменениями аминокислот в любом одном из FR1, FR2, FR3 и FR4. В одном из вариантов осуществления, в котором V_{HA} образует пару с V_{LA} , V_{LA} имеет каркас, содержащий SEQ ID NO: 6 для FR1, SEQ ID NO: 7 для FR2, SEQ ID NO: 8 для FR3 и SEQ ID NO: 9 или 10 для FR4.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение предусматривает молекулу полиспецифического антитела, содержащую по меньшей мере два связывающих домена, каждый с варибельной тяжелой областью и варибельной легкой областью, где каждый связывающий домен обладает специфичностью к антигену и содержит шесть CDR, характеризующихся тем, что по меньшей мере одна варибельная область, V_{LA} , имеет каркас, содержащий SEQ ID NO: 6 для FR1, SEQ ID NO: 7 для FR2, SEQ ID NO: 8 для FR3 и SEQ ID NO: 9 или 10 для FR4, или его производное с одним, двумя, тремя, четырьмя или пятью изменениями во всем каркасе и не более чем двумя изменениями аминокислот в любом одном из FR1, FR2, FR3 и FR4.

В одном из вариантов осуществления акцепторная последовательность тяжелой цепи зародышевой линии, используемая в настоящем раскрытии, в целом представляет собой JH4 V_H3 1-U 3-15 человека (V BASE, <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) и выбранная акцепторная последовательность легкой цепи зародышевой линии представляет собой JK1 или 4 VK1 2-1-(1) L4, L18, 02 или 012 человека (V BASE, <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>).

В одном из вариантов осуществления CDR, пересаженные из донорной в акцепторную последовательность, представляют собой то, что определено у Kabat, за исключением CDR-H1, где используют комбинированное определение Chothia/Kabat.

Система нумерации изложена в Kabat et al., 1987 в Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA (далее "Kabat et al. (выше)"). Эту систему нумерации используют в настоящем описании, за исключением того, где указано иное.

Обозначения остатков Kabat не всегда соответствуют непосредственно линейной нумерации аминокислотных остатков. Фактическая линейная аминокислотная последовательность может содержать меньше аминокислот или дополнительные аминокислоты относительно строгой нумерации Kabat, в соответствии с укорочением или инсерцией в структурном компоненте, будь то каркас или определяющая комплементарность область (CDR), базовой структуры варибельного домена. Правильную нумерацию Kabat для остатков можно определять для заданного антитела посредством выравнивания остатков по гомологии в последовательности антитела со "стандартной" последовательностью, нумерованной по Kabat.

CDR варибельного домена тяжелой цепи расположены в остатках 31-35 (CDR-H1), остатках 50-65 (CDR-H2) и остатках 95-102 (CDR-H3) в соответствии с системой нумерации Kabat. Однако в соответст-

вии с Chothia (Chothia, C. и Lesk, A.M. J. Mol. Biol., 196, 901-917 (1987)) петлевой эквивалент CDR-H1 идет от остатка 26 до остатка 32. Таким образом "CDR-H1", как используют в настоящем описании, содержит остатки с 26 до 35, как описано с помощью комбинации системы нумерации Kabat и топологического определения петель по Chothia.

CDR варибельного домена легкой цепи расположены в остатках 24-34 (CDR-L1), остатках 50-56 (CDR-L2) и остатках 89-97 (CDR-L3) в соответствии с системой нумерации Kabat.

"Полиспецифическое антитело", как используют в настоящем описании, относится к молекуле антитела, как раскрыто в настоящем описании, которая имеет два или больше связывающих домена, например два или три связывающих домена. В одном из вариантов осуществления молекула полиспецифического антитела по настоящему раскрытию имеет только два антигенсвязывающих участка.

В одном из вариантов осуществления конструкция представляет собой биспецифическое антитело. "Биспецифическая молекула", как используют в настоящем описании, относится к молекуле с двумя антигенсвязывающими участками, которые могут связывать один и тот же или различные антигены. В одном из вариантов осуществления биспецифическая молекула связывает два различных антигена. В одном из вариантов осуществления все домены связывают один и тот же антиген, включая связывание одного и того же эпитопа на антигене или связывание различных эпитопов на одном и том же антигене.

"Антигенсвязывающий участок", как используют в настоящем описании, относится к части молекулы, которая содержит пару варибельных областей, в частности когнатную пару, которые взаимодействуют специфически с целевым антигеном, т.е. часть молекулы, которая специфически распознает область, геометрическую форму, участок, эпитоп в другом белке/полипептиде.

"Специфически", как используют в настоящем описании, предназначено для обозначения сайта связывания, который распознает только антиген, к которому он обладает специфичностью, или сайт связывания, который имеет значительно более высокую аффинность связывания с антигеном, к которому он обладает специфичностью, по сравнению с аффинностью, которой он обладает к антигенам, в отношении которых он не обладает специфичностью, например, в 5, 6, 7, 8, 9, 10 раз более высокой аффинностью связывания.

Аффинность связывания можно измерять с помощью стандартных анализов, например поверхностного плазмонного резонанса, такого как BIAcore.

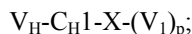
В одном из вариантов осуществления предусмотрена молекула полиспецифического антитела в соответствии с настоящим раскрытием, где молекула антитела является биспецифической или триспецифической, например биспецифической.

В одном из вариантов осуществления поливалентные форматы включают те, которые известны в данной области и которые описаны в настоящем описании (включая раскрытия в разделе с определениями в этом описании), например, где формат молекулы выбирают из группы, содержащей или состоящей из: диатела, одноцепочечного диатела, триатела, тетрадел, tandemного scFv, FabFv, Fab'Fv, FabdsFv, Fab-dsscFv (также обозначаемого как BYbe), Fab-(dsscFv)₂, Fab-scFv, diFab, diFab', tandemного scFv-Fc, scFv-Fc-scFv, одноцепочечного диатела-Fc, одноцепочечного диатела-CH₃, Ig-scFv, scFv-Ig, V-Ig, Ig-V и DVDlg, которые рассмотрены более подробно далее. FabdsFv и Fab-dsscFv (BYbe) также представлены на фиг. 7. В одном из вариантов осуществления полиспецифическое антитело не представляет собой A FabdsFv или не содержит dsFv. Форматы Fab-(dsscFv)₂ и Fab-dsscFv-dsFv также представлены на фиг. 8 и также известны как формат TrYbe.

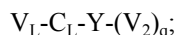
В одном из вариантов осуществления области V_{HA} и V_{LA}, имеющие каркасные остатки или последовательности, как описано в настоящем изобретении, присутствуют в scFv или dsscFv. scFv или dsscFv представляет собой часть молекулы полиспецифического антитела, в которой scFv или dsscFv можно связывать с другим антигенсвязывающим доменом, таким как Fab. Конкретными примерами являются те, где scFv или dsscFv представляют собой часть молекулы антитела BYbe или TrYbe.

Таким образом, в одном из аспектов настоящего изобретения молекула полиспецифического антитела содержит или состоит из:

а) полипептидной цепи формулы (I)



б) полипептидная цепь формулы (II)



где V_H представляет варибельный домен тяжелой цепи;

C_{H1} представляет домен константной области тяжелой цепи, например ее домен 1;

X представляет связь или линкер;

Y представляет связь или линкер;

V₁ представляет dsscFv;

V_L представляет варибельный домен, например варибельный домен легкой цепи;

C_L представляет домен из константной области, например домен константной области легкой цепи, такой как Cκ;

V₂ представляет dsscFv;

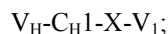
p равно 0 или 1;

q равно 0 или 1;

когда p равно 1, q равно 0, и когда q равно 1, p равно 0.

В одном из вариантов осуществления молекула полиспецифического антитела содержит или состоит из:

a) полипептидной цепи формулы (Ia)



b) полипептидной цепи формулы (IIa)



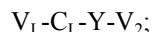
где V_H , C_{H1} , X , V_L , C_L и V_1 представляют собой то, что определено выше.

В одном из вариантов осуществления предусмотрена молекула полиспецифического антитела, которая содержит или состоит из:

a) полипептидной цепи формулы (Ib)



b) полипептидной цепи формулы (IIb)



где V_H , C_{H1} , X , V_L , C_L и V_2 представляют собой то, что определено выше.

В одном из вариантов осуществления молекула полиспецифического антитела в соответствии с настоящим раскрытием представляет собой BYbe (т.е. молекулу антитела формулы (Ia и IIa) или (Ib и IIb), также как показано на фиг. 7.

В способе в соответствии с настоящим изобретением в одном из вариантов осуществления вставляемый/заменяемый каркас или каркасы находятся в scFv, Fv, dsScFv или dsFv, в том числе, когда любой один из них является частью молекулы полиспецифического антитела, такой как BYbe.

В одном из вариантов осуществления вставляемый каркас находится в scFv компоненте молекулы антитела по настоящему раскрытию, такой как BYbe. В одном из вариантов осуществления вставляемый каркас находится в dsScFv компоненте молекулы антитела по настоящему раскрытию, таком как BYbe.

В одном из вариантов осуществления молекула полиспецифического антитела в соответствии с настоящим раскрытием предусмотрена в виде димера тяжелой и легкой цепей (вместе одну пару называют в настоящем описании как "мономер"):

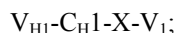
формулы (I) и (II) соответственно, где часть V_H-C_{H1} вместе с частью V_L-C_L образуют функциональный фрагмент Fab или Fab'; или

формулы (Ia) и (IIa) соответственно, где часть V_H-C_{H1} вместе с частью V_L-C_L образуют функциональный фрагмент Fab или Fab'; или

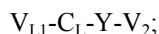
формулы (Ib) и (IIb) соответственно, где часть V_H-C_{H1} вместе с частью V_L-C_L образуют функциональный фрагмент Fab или Fab'.

В одном из аспектов настоящего изобретения молекула полиспецифического антитела предусмотрена в виде димера, содержащего или состоящего из:

a) полипептидной цепи формулы (I)



b) полипептидной цепи формулы (II)



где V_{H1} представляет вариабельный домен тяжелой цепи;

C_{H1} представляет домен константной области тяжелой цепи, например ее домен 1;

X представляет связь или линкер;

Y представляет связь или линкер;

V_1 представляет dsFv, sdAb, scFv или dsScFv;

V_{L1} представляет вариабельный домен легкой цепи;

C_L представляет домен из константной области легкой цепи, такой как Ск;

V_2 представляет dsFv, sdAb, scFv или dsScFv.

В одном из вариантов осуществления V_1 представляет собой dsScFv и V_2 представляет собой dsScFv, что также можно обозначать как Fab-(dsScFv)₂. V_1 и/или V_2 могут содержать каркасные последовательности V_{HA} и V_{LA} в соответствии с настоящим изобретением.

V_H представляет вариабельный домен. В одном из вариантов осуществления V_H представляет вариабельный домен тяжелой цепи. В одном из вариантов осуществления V_H представляет собой химерный вариабельный домен, то есть он содержит компоненты, происходящие по меньшей мере от двух видов, например, каркас человека и не относящиеся к человеку CDR. В одном из вариантов осуществления V_H гуманизируют. В одном из вариантов осуществления V_H полностью относится к человеку.

V_L представляет вариабельный домен. В одном из вариантов осуществления V_L представляет вариабельный домен легкой цепи. В одном из вариантов осуществления V_L представляет собой химерный вариабельный домен, т.е. он содержит компоненты, происходящие по меньшей мере от двух видов, например каркас человека и не относящиеся к человеку CDR. В одном из вариантов осуществления V_L гуманизируют. В одном из вариантов осуществления V_L полностью относится к человеку.

В целом, V_H и V_L вместе образуют антигенсвязывающий домен. В одном из вариантов осуществле-

ния V_H и V_L образуют когнатную пару.

"Когнатная пара", как используют в настоящем описании, относится к паре переменных доменов из одного антитела, которую создали *in vivo*, т.е. встречаемое в природе образование пар переменных доменов, выделенных у хозяина. Следовательно, когнатная пара представляет собой пару V_H и V_L . В одном из примеров когнатная пара связывает антиген кооперативно. Когнатные пары часто благоприятны, поскольку созревание аффинности к антигену происходит в организме-хозяине и может быть высоко оптимизированным и очень специфическим для указанного антигена.

"Переменная область", как используют в настоящем описании, относится к области в цепи антитела, содержащей три CDR и подходящий каркас. Переменные области для использования в настоящем раскрытии в целом получают из антитела (такого как антитело, выделенное из организма-хозяина), которое можно создавать любым известным в данной области способом.

"Полученный из", как используют в настоящем описании, относится к тому факту, что используемую последовательность или последовательность, выражено схожую с последовательностью, используемой, получали из исходного генетического материала, такого как легкая или тяжелая цепь антитела.

"Выраженно схожий", как используют в настоящем описании, предназначен для обозначения аминокислотной последовательности, которая по всей своей длине схожа на 95% или больше, например, схожа на 96, 97, 98 или 99%.

В одном из вариантов осуществления связывающий домен, образуемый с помощью V_H и V_L , обладает специфичностью к первому антигену.

В одном из вариантов осуществления домен C_{H1} представляет собой встречаемый в природе домен 1 из тяжелой цепи или ее производного, например последовательность C_{H1} IgG1, предоставленную в SEQ ID NO: 108, или последовательность C_{H1} IgG4, предоставленную в SEQ ID NO: 109.

В одном из вариантов осуществления фрагмент C_L , в легкой цепи, представляет собой константную последовательность κ или константную последовательность λ или производное любой из них, например последовательность κ , предоставленную в SEQ ID NO: 110.

Производное встречаемого в природе домена, как используют в настоящем описании, предназначено для обозначения, когда одну, две, три, четыре или пять аминокислот во встречаемой в природе последовательности заменили или удалили, например, чтобы оптимизировать свойства домена, например устранить нежелательные свойства, но где сохраняют отличительный признак(и) домена.

В одном из вариантов осуществления производные каркасов могут иметь 1, 2, 3 или 4 аминокислот, замененных на альтернативную аминокислоту, например, с использованием донорного остатка.

В одном из вариантов осуществления одна или более природных или сконструированных межцепных (т.е. между легкой и тяжелой цепями) дисульфидных связей присутствуют в функциональном фрагменте Fab или Fab'.

В одном из вариантов осуществления "природная" дисульфидная связь присутствует между C_{H1} и C_L в полипептидных цепях конструкций по настоящему раскрытию, например, формулы (I) и (II); или формулы (Ia) и (IIa); или формулы (Ib) и (IIb).

Когда домен C_L получают из κ или λ , природным положением для цистеина, образующего связь, является 214 в κ и λ человека (4-е изд. нумерации Kabat, 1987).

Точное местоположение цистеина, образующего дисульфидную связь, в C_{H1} зависит от конкретного домена, который используют фактически. Таким образом, например, в γ -1 человека природное положение дисульфидной связи находится в положении 233 (4-е изд. нумерации Kabat, 1987). Известно положение цистеина, образующего связь, для других изоформ человека, таких как γ 2, 3, 4, IgM и IgD, например, положение 127 для IgM, IgE, IgG2, IgG3, IgG4 человека и 128 в тяжелой цепи IgD и IgA2B человека.

Дисульфидная связь или связь(и) в константной области молекулы могут быть в дополнение к дисульфидной связи между парой переменных доменов V_H и V_L .

В одном из вариантов осуществления полиспецифическое антитело в соответствии с раскрытием имеет дисульфидную связь в положении, эквивалентном или соответствующем таковому, встречаемому в природе, между C_{H1} и C_L .

В одном из вариантов осуществления константная область, содержащая C_{H1} , и константная область, такая как C_L , имеет дисульфидную связь, которая находится в положении, не встречаемом в природе. Это можно конструировать в молекуле посредством введения цистеина(ов) в аминокислотную цепь в требуемом положении или положениях. Эта неестественная дисульфидная связь идет в дополнение к или в качестве альтернативы для природной дисульфидной связи, присутствующей между C_{H1} и C_L .

Введение сконструированных цистеинов можно осуществлять с использованием любого известного в данной области способа. Эти способы включают, но не ограничиваясь этим, мутагенез путем перекрывающейся ПЦР с достройкой, сайт-специфический мутагенез или каскадный мутагенез (см., в целом, Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, 1989; Ausbel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing & Wiley-Interscience, NY, 1993). Наборы для сайт-специфического мутагенеза коммерчески доступны, на-

пример набор для сайт-специфического мутагенеза QuikChange® (Stratagene, La Jolla, CA). Кассетный мутагенез можно осуществлять на основе Wells et al., 1985, Gene, 34:315-323. Альтернативно, мутантов можно создавать путем полного синтеза гена с помощью отжига, лигирования и ПЦР амплификации и клонирования перекрывающихся олигонуклеотидов.

В одном из вариантов осуществления дисульфидная связь между C_H1 и C_L полностью отсутствует, например, межцепные цистеины можно заменять на другую аминокислоту, такую как серин. Таким образом, межцепные дисульфидные связи отсутствуют в функциональном фрагменте Fab молекулы. Раскрытия, такие как WO 2005/003170, включенные в настоящий документ посредством ссылки, описывают, как предоставлять фрагменты Fab без межцепной дисульфидной связи.

В одном из вариантов осуществления V_1 представляет dsscFv. В одном из вариантов осуществления V_2 представляет dsscFv. Однако V_1 и V_2 оба одновременно не представляют dsscFv (т.е. только один присутствует в заданной конструкции).

В одном из вариантов осуществления p равно 1 и q равно 0. В одном из вариантов осуществления p равно 0 и q равно 1.

"Одноцепочечный вариабельный фрагмент" или "scFv", как используют в настоящем описании, относится к одноцепочечному вариабельному фрагменту, который стабилизирован пептидным линкером между вариабельными доменами V_H и V_L .

"Стабилизированный дисульфидной связью одноцепочечный вариабельный фрагмент" или "dsscFv", как используют в настоящем описании, относится к одноцепочечному вариабельному фрагменту, который стабилизирован пептидным линкером между вариабельными доменами V_H и V_L и также содержит междоменную дисульфидную связь между V_H и V_L .

В одном из вариантов осуществления дисульфидная связь между вариабельными доменами V_H и V_L из V_1 или V_2 находится между двумя из остатков, перечисленных ниже (пока контекст явно не указывает иное, в нижеследующем списке используют нумерацию Kabat). Повсюду, где отсылают к нумерации Kabat, релевантным источником является Kabat et al., 1987, в Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA.

В одном из вариантов осуществления дисульфидная связь находится в положении, выбранном из группы, содержащей:

$V_H37 + V_L95C$, см., например, Protein Science, 6, 781-788 Zhu et al. (1997);

$V_H44 + V_L100$, см., например, Biochemistry, 33 5451-5459 Reiter et al. (1994); или Journal of Biological Chemistry, vol. 269, No. 28, p. 18327-18331, Reiter et al. (1994); или Protein Engineering, vol. 10, No. 12, p. 1453-1459, Rajagopal et al. (1997);

$V_H44 + V_L105$, см., например, J. Biochem. 118, 825-831, Luo et al. (1995);

$V_H45 + V_L87$, см., например, Protein Science, 6, 781-788, Zhu et al. (1997);

$V_H55 + V_L101$, см., например, FEBS Letters, 377, 135-139, Young et al. (1995);

$V_H100 + V_L50$, см., например, Biochemistry, 29, 1362-1367, Glockshuber et al. (1990);

$V_H100b + V_L49$;

$V_H98 + V_L46$, см., например, Protein Science, 6, 781-788, Zhu et al. (1997);

$V_H101 + V_L46$;

$V_H105 + V_L43$, см., например, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 90, p. 7538-7542; Brinkmann et al. (1993) или Proteins, 19, 35-47, Jung et al. (1994);

$V_H106 + V_L57$, см., например, FEBS Letters, 377, 135-139, Young et al. (1995)

и положение или положения, соответствующие им в паре вариабельных областей, расположенных в молекуле.

В одном из вариантов осуществления дисульфидную связь формируют между положениями V_H44 и V_L100 .

Аминокислотные пары, перечисленные выше, находятся в положениях, благоприятных для замены на цистеины так, что можно формировать дисульфидные связи. Цистеины можно конструировать в этих желаемых положениях с помощью известных приемов. В одном из вариантов осуществления, следовательно, сконструированный цистеин в соответствии с настоящим раскрытием относится к тому, когда встречаемый в природе остаток в заданном аминокислотном положении заменен на остаток цистеина.

Введение сконструированных цистеинов можно осуществлять с использованием любого известного в данной области способа. Эти способы включают, но не ограничиваясь этим, мутагенез путем перекрывающейся ПЦР с достройкой, сайт-специфический мутагенез или кассетный мутагенез (см., в целом, Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, 1989; Ausbel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing & Wiley-Interscience, NY, 1993). Наборы для сайт-специфического мутагенеза коммерчески доступны, например набор для сайт-специфического мутагенеза QuikChange® (Stratagen, La Jolla, CA). Кассетный мутагенез можно осуществлять на основе Wells et al., 1985, Gene, 34:315-323. Альтернативно, мутантов можно создавать путем полного синтеза гена с помощью отжига, лигирования и ПЦР амплификации и клонирования перекрывающихся олигонуклеотидов.

Соответственно, в одном из вариантов осуществления переменные домены V_H и V_L из V_1 или V_2 можно связывать дисульфидной связью между двумя остатками цистеина, где положение пары остатков цистеина выбирают из группы, содержащей или состоящей из: V_H37 и V_L95 , V_H44 и V_L100 , V_H44 и V_L105 , V_H45 и V_L87 , V_H100 и V_L50 , V_H100b и V_L49 , V_H98 и V_L46 , V_H101 и V_L46 , V_H105 и V_L43 и V_H106 и V_L57 .

В одном из вариантов осуществления переменные домены V_H и V_L из V_1 или V_2 можно связывать дисульфидной связью между двумя остатками цистеина, один в V_H и один в V_L , которые находятся вне CDR, например, где положение пары остатков цистеина выбирают из группы, состоящей из V_H37 и V_L95 , V_H44 и V_L100 , V_H44 и V_L105 , V_H45 и V_L87 , V_H100 и V_L50 , V_H98 и V_L46 , V_H105 и V_L43 и V_H106 и V_L57 .

В одном из вариантов осуществления переменные домены V_H и V_L из V_1 связывают дисульфидной связью между двумя сконструированными остатками цистеина, один в положении V_H44 и другой в V_L100 .

В одном из вариантов осуществления переменные домены V_H и V_L из V_2 связывают дисульфидной связью между двумя сконструированными остатками цистеина, один в положении V_H44 и другой в V_L100 .

В одном из вариантов осуществления переменный домен тяжелой цепи из dsscFv V_1 прикрепляют к X или переменный домен тяжелой цепи из dsscFv V_2 прикрепляют к Y.

В одном из вариантов осуществления переменный домен легкой цепи из dsscFv V_1 прикрепляют к X или переменный домен легкой цепи из dsscFv V_2 прикрепляют к Y.

В одном из вариантов осуществления домен V_H из V_1 прикрепляют к X, например прикрепляют к C_H1 . В одном из вариантов осуществления домен V_L из V_1 прикрепляют к X, например прикрепляют к C_H1 . В одном из вариантов осуществления домен V_H из V_2 прикрепляют к Y, например прикрепляют к C_L . В одном из вариантов осуществления домен V_L из V_2 прикрепляют к Y, например прикрепляют к C_L . В одном из вариантов осуществления X представляет собой связь. В одном из вариантов осуществления Y представляет собой связь. В одном из вариантов осуществления оба X и Y представляют собой связи. Четко, когда p равно 0 и когда X представляет собой связь, тогда по существу X отсутствует, поскольку цепь заканчивается на C_H1 . Четко, когда q равно 0 и Y представляет собой связь, тогда по существу Y отсутствует, поскольку цепь заканчивается на C_L .

В одном из вариантов осуществления X представляет собой линкер, например, подходящий пептид для соединения частей C_H1 и V_1 . В одном из вариантов осуществления Y представляет собой линкер, например, подходящий пептид для соединения частей C_L и V_2 . В одном из вариантов осуществления оба X и Y представляют собой линкеры.

В одном из вариантов осуществления p равно 1 и X представляет собой линкер и q равно 0 и Y отсутствует.

В одном из вариантов осуществления q равно 1 и Y представляет собой линкер и p равно 0 и X отсутствует.

В одном из вариантов осуществления пептидный линкер составляет 50 аминокислот в длину или меньше, например, 20 аминокислот или меньше, например 19, 10, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислоту.

В одном из вариантов осуществления линкер основан на повторяющихся звеньях G4S (т.е. GGGGS, SEQ ID № 42), например, 1, 2, 3, 4 или 5 этих звеньев, например, SGGGSGGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID № 45).

В варианте осуществления линкер, используемый в конструкции по настоящему раскрытию, имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 46, например, последовательность можно использовать, когда X или Y представляет собой линкер.

Конечно, существует по меньшей мере три возможных местоположения для линкеров в конструкциях по данному раскрытию, X, Y и в компоненте scFv.

В одном из вариантов осуществления линкер выбирают из последовательности, представленной в настоящем описании, например, последовательности с 29 до 97. В одном из вариантов осуществления линкер выбирают из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 30. В одном из вариантов осуществления X имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29. В одном из вариантов осуществления Y имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30. Шарнирные последовательности представлены в SEQ ID NO: с 31 до 39. Последовательности гибкого линкера представлены в SEQ ID NO: с 40 до 80, где (S) является необязательным в последовательностях с 42 до 47.

Таблица 6

42	(S) GGGGS
43	(S) GGGGSGGGGS
44	(S) GGGGSGGGGSGGGGS
45	(S) GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
47	(S) GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

Примеры жестких линкеров включают пептидные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82 и PPP.

В одном из вариантов осуществления пептидный линкер представляет собой альбуминсвязывающий пептид.

Примеры альбуминсвязывающих пептидов предоставлены в WO2007/106120 и включают линкеры в SEQ ID NO: с 83 до 96.

Благоприятно использование альбуминсвязывающих пептидов в качестве линкера может увеличивать время полужизни биспецифической молекулы антитела.

В одном из вариантов осуществления представлен линкер (например, подходящий пептидный линкер), соединяющий переменные домены V_H и V_L в V_1 (т.е. между V_H и V_L). В одном из вариантов осуществления представлен линкер (например, подходящий пептидный линкер), соединяющий переменные домены V_H и V_L в V_2 (т.е. между V_H и V_L).

В одном из вариантов осуществления линкер, соединяющий переменные домены V_H и V_L в V_1 , имеет последовательность GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID № 97).

В одном из вариантов осуществления линкер, соединяющий переменные домены V_H и V_L в V_2 , имеет последовательность GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID № 97).

Термин "фрагмент Fab", как используют в настоящем описании, относится к фрагменту антитела, содержащему фрагмент легкой цепи, содержащий V_L (переменный легкий) домен и константный домен легкой цепи (C_L) и V_H (переменный тяжелый) домен и первый константный домен (CH_1) тяжелой цепи.

Fv относится к двум переменным доменам, например, совместно действующим переменным доменам, таким как когнатная пара или аффинно зрелые переменные домены, т.е. пара V_H и V_L .

Совместно действующие переменные домены, как используют в настоящем описании, представляют собой переменные домены, которые дополняют друг друга и/или оба вносят вклад в связывание антигена, чтобы сделать Fv специфичным к рассматриваемому антигену.

Термин "одноцепочечный Fv" или сокращенно "scFv", как используют в настоящем описании, относится к фрагменту антитела, который содержит домены антитела V_H и V_L , связанные (например, пептидным линкером) для того, чтобы формировать одну полипептидную цепь. Константные области тяжелой и легкой цепей не используют в этом формате.

Термин "однодоменное антитело", как используют в настоящем описании, относится к фрагменту антитела, состоящего из одного мономерного переменного домена антитела. Примеры однодоменных антител включают V_H или V_L или V_{HH} . Эти термины используют взаимозаменяемо в настоящем описании.

Диатело, как используют в настоящем описании, относится к двум парам V_H/V_L Fv и дополнительной паре V_H/V_L , которые имеют два линкера между Fv, так что V_H из первого Fv соединяют с V_L из второго Fv и V_L из первого Fv соединяют с V_H второго Fv.

Триатело, как используют в настоящем описании, относится к формату, схожему с диателом, содержащему три Fv и три линкера между Fv.

Тетратело, как используют в настоящем описании, относится к формату, схожему с диателом, содержащему четыре Fv и четыре линкера между Fv.

Тандемный scFv, как используют в настоящем описании, относится к двум scFv, связанным через один линкер так, что имеет место один линкер между Fv.

Тандемный scFv-Fc, как используют в настоящем описании, относится к двум тандемным scFv, где каждый из них присоединен к N-концу домена CH_2 , например, через шарнир, фрагмента константной области $-CH_2CH_3$.

FabFv, как используют в настоящем описании, относится к фрагменту Fv с переменной областью, прикрепленной к C-концу каждого из следующих, CH_1 тяжелой цепи и C_L легкой цепи. Формат можно предоставлять в виде его пегелированной версии.

Fab'Fv, как используют в настоящем описании, схож с FabFv, в котором часть Fab заменяют на Fab'. Формат можно предоставлять в виде его пегелированной версии.

FabdsFv, как используют в настоящем описании, относится к FabFv, в котором дисульфидная связь между Fv стабилизирует присоединенные C-концевые переменные области. Формат можно предоставлять в виде его пегелированной версии.

Fab-scFv, как используют в настоящем описании, представляет собой молекулу Fab с scFv, прикрепленным к C-концу легкой или тяжелой цепи.

Fab'-scFv, как используют в настоящем описании, представляет собой молекулу Fab' с scFv, прикрепленным к С-концу легкой или тяжелой цепи.

DiFab, как используют в настоящем описании, относится к двум молекулам Fab, связанным через их С-концы тяжелых цепей.

DiFab', как используют в настоящем описании, относится к двум молекулам Fab', связанным через одну или более дисульфидных связей в их шарнирных областях.

Как используют в настоящем описании, одноцепочечное диатело представляет собой диатело, содержащее линкер между Fv так, что молекула содержит три линкера и образует нормальный scFv, в котором каждый конец V_H и V_L связан с одной из переменных областей дополнительной пары Fv.

Одноцепочечное диатело-Fc, как используют в настоящем описании, представляет собой два одноцепочечных диатела, где каждое из них прикреплено к N-концу домена CH_2 , например, через шарнир фрагмента константной области $-CH_2CH_3$.

ScFv-Fc-scFv, как используют в настоящем описании, относится к четырем scFv, где каждый из них прикреплен к N-концу и С-концу тяжелой и легкой цепей фрагмента $-CH_2CH_3$.

Одноцепочечное диатело- CH_3 , как используют в настоящем описании, относится к двум молекулам одноцепочечных диател, каждая связана, например, через шарнир с доменом CH_3 .

IgG-scFv, как используют в настоящем описании, представляет собой полноразмерное антитело с scFv на С-конце каждой из тяжелых цепей или каждой из легких цепей.

scFv-IgG, как используют в настоящем описании, представляет собой полноразмерное антитело с scFv на N-конце каждой из тяжелых цепей или каждой из легких цепей.

V-IgG, как используют в настоящем описании, представляет собой полноразмерное антитело с переменным доменом на N-конце каждой из тяжелых цепей или каждой из легких цепей.

IgG-V, как используют в настоящем описании, представляет собой полноразмерное антитело с переменным доменом на С-конце каждой из тяжелых цепей или каждой из легких цепей DVD-Ig (также известное как IgG с двойным V-доменом) представляет собой полноразмерное антитело с 4 дополнительными переменными доменами, по одному на N-концах каждой тяжелой и каждой легкой цепи.

Настоящее раскрытие также предусматривает последовательности, которые на 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% схожи с последовательностью, раскрытой в настоящем описании.

"Идентичность", как используют в настоящем описании, указывает на то, что в любом конкретном положении в выровненных последовательностях аминокислотный остаток идентичен между последовательностями.

"Сходство", как используют в настоящем описании, указывает на то, что в любом конкретном положении в выровненных последовательностях аминокислотный остаток имеет схожий тип между последовательностями. Например, лейцин можно замещать на изолейцин или валин. Другие аминокислоты, которые можно часто заменять на другие, включают, но не ограничиваясь этим:

фенилаланин, тирозин и триптофан (аминокислоты, имеющие ароматические боковые цепи);

лизин, аргинин и гистидин (аминокислоты, имеющие основные боковые цепи);

аспартат и глутамат (аминокислоты, имеющие кислые боковые цепи);

аспарагин и глутамин (аминокислоты, имеющие амидные боковые цепи) и

цистеин и метионин (аминокислоты, имеющие серосодержащие боковые цепи).

Степени идентичности и сходства можно легко вычислять

(Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ред., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing. Informatics и Genome Projects, Smith, D.W., ред., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., и Griffin, H.G., ред., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987, Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. и Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991, программное обеспечение BLAST™, доступное в NCBI (Altschul, S.F. et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W. & States, D.J. 1993, Nature Genet. 3:266-272. Madden, T.L. et al., 1996, Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F. et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J. & Madden, T.L. 1997, Genome Res. 7:649-656).

В одном из вариантов осуществления предусмотрена молекула полиспецифического антитела в соответствии с настоящим раскрытием, в которой CDR имеют не относящееся к человеку происхождение, в частности от млекопитающего, например от крысы, мыши, кролика, верблюдового, овцы, козы или тому подобного. В одном из вариантов осуществления CDR относятся к человеку.

Можно получать антитела, создаваемые против антигенного полипептида, где необходима иммунизация животного посредством введения полипептидов животному, предпочтительно не относящемуся к

человеку животному, используя общеизвестные и стандартные протоколы, см., например, Handbook of Experimental Immunology, D.M. Weir (ред.), vol. 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, England, 1986). Можно иммунизировать многих теплокровных животных, таких как кролики, мыши, крысы, овцы, коровы, верблюды или свиньи. Однако мыши, кролики, свиньи и крысы в целом подходят больше всего.

Известны способы выделения репертуаров антител человека у человека, например, выделение из образца периферической крови, где образец от человека предварительно экспонируют для релевантного антигена (такого как патоген).

Моноклональные антитела можно получать любым известным в данной области способом, таким как способ с гибридомой (Kohler & Milstein, 1975, Nature, 256:495-497), способ с триомой, способ с В-клеточной гибридомой человека (Kozbor et al., 1983, Immunology Today, 4:72) и способ с EBV-гибридомой (Cole et al., Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy, p. 77-96, Alan R Liss, Inc., 1985).

Антитела также можно создавать с использованием способов с антителами отдельных лимфоцитов посредством клонирования и экспрессии кДНК варибельной области иммуноглобулина, созданной из отдельных лимфоцитов, отобранных по продуцированию специфических антител, например, с помощью способов, описанных в Babcock, J. et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93(15):7843-78481; WO 92/02551; WO 2004/051268 и WO 2004/106377.

Антитела для использования в настоящем раскрытии также можно создавать с использованием различных известных в данной области способов фагового дисплея и включают те, которые раскрыты в

Brinkman et al. (in J. Immunol. Methods, 1995, 182: 41-50), Ames et al. (J. Immunol. Methods, 1995, 184:177-186), Kettleborough et al. (Eur. J. Immunol. 1994, 24:952-958), Persic et al. (Gene, 1997 187 9-18), Burton et al. (Advances in Immunology, 1994, 57:191-280) и WO90/02809; WO91/10737; WO92/01047; WO92/18619; WO93/11236; WO95/15982; WO95/20401; и US5,698,426; US5,223,409; US5,403,484; US5,580,717; US5,427,908; US5,750,753; US5,821,047; US5,571,698; US5,427,908; US5,516,637; US5,780,225; US5,658,727; US5,733,743; US5,969,108 и WO2001/30305.

В одном из вариантов осуществления полиспецифические молекулы в соответствии с раскрытием гуманизируют (гуманизируют один, два или все связывающие домены).

Гуманизированный (что включает антитела с пересаженными CDR), как используют в настоящем описании, относится к молекулам, имеющим одну или более определяющих комплементарность областей (CDR) от не являющихся человеком биологических видов и каркасную область из молекулы иммуноглобулина человека (см., например, US 5585089; WO 91/09967). Следует принимать во внимание, что может быть необходимо только переносить остатки из CDR, которые определяют специфичность, а не CDR целиком (см., например, Kashmiri et al., 2005, Methods, 36, 25-34). Гуманизированные антитела могут необязательно дополнительно содержать один или более каркасных остатков, получаемых от не являющихся человеком биологических видов, от которых получали CDR.

Как используют в настоящем описании, термин "гуманизированная молекула антитела" относится к молекуле антитела, в которой тяжелая и/или легкая цепь содержит одну или более CDR (включая, при желании, одну или более модифицированных CDR) из донорного антитела (например, моноклонального антитела мыши), пересаженных в каркас варибельной области тяжелой и/или легкой цепи акцепторного антитела (например, антитела человека) см., например, US 5585089; WO 91/09967. Обзор см. в Vaughan et al., Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998. В одном из вариантов осуществления, вместо того, чтобы переносить CDR целиком, только один или более остатков, определяющих специфичность, из любой одной из CDR, описанных в настоящем описании выше, переносят в каркас антитела человека (см., например, Kashmiri et al., 2005, Methods, 36, 25-34). В одном из вариантов осуществления только остатки, определяющие специфичность, из одной или более CDR, описанных в настоящем описании выше, переносят в каркас антитела человека. В другом варианте осуществления только остатки, определяющие специфичность, из каждой из CDR, описанных в настоящем описании выше, переносят в каркас антитела человека.

В одном из вариантов осуществления гуманизируют полиспецифические молекулы в соответствии с раскрытием.

Когда пересаживают CDR или остатки, определяющие специфичность, можно использовать любую подходящую акцепторную каркасную последовательность варибельной области, учитывая класс/тип донорного антитела, из которого получают CDR, включая каркасные области мыши, примата и человека. Подходящим образом, гуманизированное антитело в соответствии с настоящим изобретением имеет варибельный домен, содержащий акцепторные каркасные области человека, а также одну или более CDR, предоставленных из донорного антитела или раскрытых в настоящем описании.

В гуманизированном антителе по настоящему изобретению, каркасные области необязательно

должны иметь точно ту же последовательность, что и акцепторное антитело. Например, нестандартные остатки можно изменять на более часто встречающиеся остатки для этого класса или типа акцепторной цепи. Альтернативно, выбранные остатки в акцепторных каркасных областях можно изменять с тем, чтобы они соответствовали остатку, который находится в том же положении в донорном антителе (см. Reichmann et al., 1998, Nature, 332, 323-324). Такие изменения следует сводить к минимуму, необходимо для восстановления аффинности донорного антитела. Протокол для выбора остатков в акцепторных каркасных областях, которые может потребоваться заменять, изложен в WO 91/09967.

Донорное антитело, как используют в настоящем описании, относится к исходному антителу, выделенному у организма-хозяина или идентифицированному в библиотеке.

Донорный остаток, как используют в настоящем описании, представляет собой остаток, находящийся в антителе, из которого берут CDR. В целом, донорное антитело является не относящимся к человеку и, таким образом, донорный остаток будет из не принадлежащего человеку антитела. В одном из вариантов осуществления донорный остаток представляет собой остаток в том же или соответствующем положении в донорном антителе относительно положения остатка, подлежащего замене в гуманизованном антителе.

Примеры каркасов человека, которые можно использовать в настоящем раскрытии, представляют собой KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY и POM (Kabat et al., выше). Например, KOL и NEWM можно использовать для тяжелой цепи, REI можно использовать для легкой цепи и EU, LAY и POM можно использовать как для тяжелой цепи, так и для легкой цепи. Альтернативно, можно использовать последовательности зародышевой линии человека; они доступны по адресу <http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/list2.php>.

В гуманизированной молекуле антитела по настоящему раскрытию акцепторные тяжелые и легкие цепи необязательно следует получать из того же антитела, и, при желании, они могут содержать составные цепи, имеющие каркасные области, полученные из различных цепей.

Каркасные области не обязательно должны иметь точно ту же последовательность, что и таковая в акцепторном антителе. Например, нестандартные остатки можно изменять на более часто встречающиеся остатки для этого класса или типа акцепторной цепи. Альтернативно, выбранные остатки в акцепторных каркасных областях можно изменять с тем, чтобы они соответствовали остатку, находящемуся в том же положении в донорном антителе (см. Reichmann et al., 1998, Nature, 332, 323-324). Такие изменения следует сводить к минимуму, необходимому для восстановления аффинности донорного антитела. Протокол для выбора остатков в акцепторных каркасных областях, которые могут требовать изменения, изложен в WO 91/09967.

Донорные остатки представляют собой остатки из донорного антитела, т.е. антитела, из которого исходно получали CDR. Донорные остатки можно заменять на подходящий остаток, полученный из каркаса рецептора человека (акцепторные остатки), например, остатки мыши, крысы или кролика.

В одном из вариантов осуществления полиспецифические антитела по настоящему раскрытию полностью относятся к человеку, в частности, один или более вариабельных доменов полностью относятся к человеку.

Молекулами полностью человека являются те, в которых все вариабельные области и константные области (где имеют место) как тяжелых, так и легких цепей имеют происхождение от человека или по существу идентичны последовательностям, происходящим от человека, необязательно из одного и того же антитела. Примеры полностью антител человека могут включать антитела, получаемые, например, способами фагового дисплея, описанными выше, и антитела, полученные с помощью мышей, у которых мышинные гены вариабельных и необязательно константных областей иммуноглобулинов заменены на их человеческие аналоги, например, как описано в общих чертах в EP 0546073; US 5545806; US 5569825; US 5625126; US 5633425; US 5661016; US 5770429; EP 0438474 и EP 0463151.

В одном из вариантов осуществления молекулы полиспецифических антител по раскрытию способны к избирательному связыванию двух, трех или больше различных антигенов, представляющих интерес.

В одном из вариантов осуществления антигены, представляющие интерес, связанные антигенсвязывающим доменом, образованным из V_H/V_L , или V_1 или V_2 , независимо выбирают из ассоциированного с клеткой белка, например, белка клеточной поверхности на клетках, таких как бактериальные клетки, дрожжевые клетки, Т-клетки, клетки эндотелия или опухолевые клетки, и растворимого белка.

Антигены, представляющие интерес, также могут представлять собой любой медицински релевантный белок, такой как те белки, которые находятся под повышающей регуляцией в ходе заболевания или инфекции, например, рецепторы и/или соответствующие им лиганды. Конкретные примеры белков клеточной поверхности включают молекулы адгезии, например, интегрины, такие как $\beta 1$ интегрины, например $V_{LA}-4$, Е-селектин, Р селектин или L-селектин,

CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11a, CD11b, CD18, CD19, CD20, CD23, CD25, CD33, CD38, CD40, CD45, CDW52, CD69, CD134 (OX40), ICOS, BCMP7, CD137, CD27L, CDCP1, DPCR1, DPCR1, дудулин 2, FLJ20584, FLJ40787, HEK2, KIAA0634, KIAA0659, KIAA1246, KIAA1455, LTBP2, LTK, MAL2, MRP2, нектинподобный 2, NKCC1, PTK7, RAIG1, TCAM1, SC6, BCMP101, BCMP84, BCMP11, DTD,

Эмбриональный опухолевый антиген (CEA), глобулин молочного жира человека (HMFG1 и 2), антигены МНС I класса и МНС II класса и VEGF и, где это применимо, их рецепторы.

Растворимые антигены включают интерлейкины, такие как IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-16, IL-23, вирусные антигены, например антигены респираторного синцитиального вируса или цитомегаловируса, иммуноглобулины, такие как IgE, интерфероны, такие как интерферон α , интерферон β или интерферон γ , колониестимулирующие факторы, такие как G-CSF или GM-CSF, и тромбоцитарные факторы роста, такие как PDGF- α и PDGF- β , и, где это применимо, их рецепторы. Другие антигены включают антигены бактериальной клеточной поверхности, бактериальные токсины, вирусы, такие как грипп, EBV, HerA, B и C, биотеррористические средства, радионуклиды и тяжелые металлы, а также яды и токсины змей и пауков.

В одном из вариантов осуществления молекулу антитела по раскрытию можно использовать для функционального изменения активности антигена, представляющего интерес. Например, молекула антитела может нейтрализовать, оказывать антагонистическое или агонистическое действие на активность указанного антигена, непосредственно или опосредованно.

В одном из вариантов осуществления V_1 обладает специфичностью к сывороточному альбумину человека.

В одном из вариантов осуществления V_2 обладает специфичностью к сывороточному альбумину человека.

В одном из вариантов осуществления V_1 или V_2 и V_H/V_L обладают специфичностью к двум различным антигенам. В одном из вариантов осуществления V_1 или V_2 и V_H/V_L обладают специфичностью к одному и тому же антигену, например связывая тот же или другой эпитоп в нем.

В одном из вариантов осуществления антиген, представляющий интерес, связанный с помощью V_H/V_L и/или V_1 или V_2 , обеспечивает возможность рекрутировать эффекторные функции, такие как активация пути комплемента и/или рекрутирование эффекторных клеток.

Рекрутирование эффекторной функции может быть непосредственным в том отношении, что эффекторная функция ассоциирована с клеткой, указанная клетка несет молекулу рекрутирования на своей поверхности. Опосредованное рекрутирование может происходить, когда связывание антигена с антигенсвязывающим доменом (таким как V_1 или V_2) в молекуле в соответствии с настоящим раскрытием с полипептидом рекрутирования вызывает высвобождение, например, фактора, который, в свою очередь, непосредственно или опосредованно может рекрутировать эффекторную функцию или может происходить через активацию сигнального пути. Примеры включают IL2, IL6, IL8, IFN γ , гистамин, C1q, опсонины и другие элементы классического и альтернативного каскадов активации комплемента, такие как C2, C4, C3-конвертаза и с C5 до C9.

Как используют в настоящем описании, "полипептид рекрутирования" включает Fc γ R, такой как Fc γ RI, Fc γ RII и Fc γ RIII, белок пути комплемента, такой как, но без ограничения, C1q и C3, белок маркера CD (маркера кластера дифференцировки), такой как, но без ограничения, CD68, CD115, CD16, CD80, CD83, CD86, CD56, CD64, CD3, CD4, CD8, CD28, CD45, CD19, CD20 и CD22. Дополнительные полипептиды рекрутирования, которые представляют собой белки маркеров CD, включают

CD1, CD1d, CD2, CD5, CD8, CD9, CD10, CD11, CD11a, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD40, CD43, CD44, CD45, CD46, CD49, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD58, CD59, CD61, CD62, D62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64, CD66e, CD68, CD70, CD71, CD72, CD79, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85, CD86, CD88, CD89, CD90, CD94, CD95, CD98, CD106, CD114, CD116, CD117, CD118, CD120, CD122, CD130, CD131, CD132, CD133, CD134, CD135, CD137, CD138, CD141, CD142, CD143, CD146, CD147, CD151, CD152, CD153, CD154, CD155, CD162, CD164, CD169, CD184, CD206, CD209, CD257, CD278, CD281, CD282, CD283 и CD304

или фрагмент любого из них, который сохраняет способность рекрутировать опосредованную клеткой эффекторную функцию, или непосредственно или опосредованно. Полипептид рекрутирования так-

же включает молекулы иммуноглобулинов, такие как IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE и IgA, которые обладают эффекторной функцией.

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен (такой как V_1 или V_2) в молекуле полиспецифического антитела в соответствии с настоящим раскрытием имеет специфичность к белку пути комплемента, например, C1q.

Кроме того, молекулы полиспецифических антител по настоящему раскрытию можно использовать для хелатирования радионуклидов с помощью антитела или фрагмента, который связывается с белком-хелатором нуклида. Такие слитые белки находят применение в визуализации или подходах направленной терапии радионуклидами. См., например, Altai et al., *Bioconjug Chem.* 2013 June, 19:24(6):1102-9, включенный в настоящее описание посредством ссылки.

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен в молекуле в соответствии с раскрытием (такой как V_1 или V_2) обладает специфичностью к белку маркера CD, выбранному из группы, содержащей CD68, CD80, CD86, CD64, CD3, CD4, CD8 CD45, CD16 и CD35.

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен в молекуле в соответствии с раскрытием (такой как V_1 или V_2) обладает специфичностью к белку-переносчику сыворотки, циркулирующей молекуле иммуноглобулина или CD35/CR1, например, для обеспечения увеличенного времени полужизни фрагмента антитела со специфичностью к указанному антигену, представляющему интерес, посредством связывания с указанным белком-переносчиком сыворотки, циркулирующей молекулой иммуноглобулина или CD35/CR1.

Как используют в настоящем описании, "белки-переносчики сыворотки" включают тироксинсвязывающий белок, транстиретин, $\alpha 1$ -кислый гликопротеин, трансферрин, фибриноген и альбумин или фрагмент любого из них.

Как используют в настоящем описании, "циркулирующая молекула иммуноглобулина" включает IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, sIgA, IgM и IgD или фрагмент любого из них.

CD35/CR1 представляет собой белок, присутствующий на красных клетках крови, который имеет время полужизни 36 суток (нормальный диапазон от 28 до 47 суток; Lanaro et al., 1971, *Cancer*, 28(3):658-661).

В одном из вариантов осуществления антиген, представляющий интерес, к которому V_H/V_L обладает специфичностью, представляет собой белок-переносчик сыворотки, такой как переносчик сыворотки человека, такой как альбумин, в частности, сывороточный альбумин человека.

В одном из вариантов осуществления антиген, представляющий интерес, к которому V_1 обладает специфичностью, представляет собой белок-переносчик сыворотки, такой как переносчик сыворотки человека, такой как альбумин, в частности, сывороточный альбумин человека.

В одном из вариантов осуществления антиген, представляющий интерес, к которому V_2 обладает специфичностью, представляет собой белок-переносчик сыворотки, такой как переносчик сыворотки человека, такой как альбумин, в частности, сывороточный альбумин человека.

В целом, V_1 или V_2 и V_H/V_L не обязаны оба обладать специфичностью к белку-переносчику сыворотки.

В одном из вариантов осуществления молекулы полиспецифических антител по настоящему раскрытию обрабатывают для усовершенствованной аффинности к целевому антигену или антигенам. Такие варианты можно получать с помощью множества протоколов созревания аффинности, включая введение мутаций в CDR (Yang et al., *J. Mol. Biol.*, 254, 392-403, 1995), перетасовку цепей (Marks et al., *Bio/Technology*, 10, 779-783, 1992), использование мутаторных штаммов *E. coli* (Low et al., *J. Mol. Biol.*, 250, 359-368, 1996), перетасовку ДНК (Patten et al., *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8, 724-733, 1997), фаговый дисплей (Thompson et al., *J. Mol. Biol.*, 256, 77-88, 1996) и ПЦР с имитацией полового размножения (Cramer et al., *Nature*, 391, 288-291, 1998). В Vaughan et al. (выше) рассмотрены эти способы созревания аффинности.

Усовершенствованная аффинность, как используют в настоящем описании, в этом контексте относится к усовершенствованию относительно исходной молекулы.

При желании, молекулу антитела для использования в настоящем раскрытии можно конъюгировать с одной или более эффекторными молекулами. Следует принимать во внимание, что эффекторная молекула может содержать одну эффекторную молекулу или две или больше таких молекул, связанных так, чтобы формировать один фрагмент, который можно прикреплять к антителам по настоящему изобретению. Где желательно получать фрагмент антитела, связанный с эффекторной молекулой, это можно получать стандартными химическими процедурами или процедурами с рекомбинантной ДНК, в которых фрагмент антитела связывают непосредственно или через сопрягающее средство с эффекторной молекулой. Приемы для конъюгирования таких эффекторных молекул с антителами хорошо известны в данной области (см., Hellstrom et al., *Controlled Drug Delivery*, 2-е изд., Robinson et al., ред., 1987, p. 623-53; Thorpe et al., 1982, *Immunol. Rev.*, 62:119-58 и Dubowchik et al., 1999, *Pharmacology и Therapeutics*, 83, 67-123). Конкретные химические процедуры включают, например, те, которые описаны в WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195, WO 89/01476 и WO 03/031581. Альтернативно, когда эффекторная молекула представляет собой белок или полипептид, связь можно создавать с использованием процедур рекомби-

нантной ДНК, например, как описано в WO 86/01533 и EP 0392745.

Термин "эффекторная молекула", как используют в настоящем описании, включает, например, биологически активные белки, например ферменты, другие антитела или фрагменты антител, синтетические или встречаемые в природе полимеры, нуклеиновые кислоты и их фрагменты, например ДНК, РНК и их фрагменты, радионуклиды, в частности радиоiodид, радиоизотопы, хелатированные металлы, наночастицы и репортерные группы, такие как флуоресцентные соединения или соединения, которые можно обнаруживать посредством ЯМР или ESR спектроскопии.

Другие эффекторные молекулы могут включать хелатированные радионуклиды, такие как ^{111}In и ^{90}Y , Lu177, ВИСМУТ-213, калифорний-252, иридий-192 и вольфрам-188/рений-188; или лекарственные средства, такие как, но не ограничиваясь этим, алкилфосфохолины, ингибиторы топоизомеразы I, таксоиды и сурамин.

Другие эффекторные молекулы включают белки, пептиды и ферменты. Ферменты, представляющие интерес, включают, но не ограничиваясь этим, протеолитические ферменты, гидролазы, лиазы, изомеразы, трансферазы. Белки, полипептиды и пептиды, представляющие интерес, включают, но не ограничиваясь этим, иммуноглобулины, токсины, такие как абрин, рицин А, экзотоксин *Pseudomonas* или дифтерийный токсин, белок, такой как инсулин, интерферон α , интерферон β , фактор роста нервов, тромбоцитарный фактор роста или тканевой активатор плазминогена, тромботическое средство или антиангиогенное средство, например, ангиостатин или эндостатин, или модификатор биологической реакции, такой как лимфокин, интерлейкин-1 (IL-1), интерлейкин-2 (IL-2), гранулоцитарно-макрофагальный колоние-стимулирующий фактор (GM-CSF), гранулоцитарный колоние-стимулирующий фактор (G-CSF), фактор роста нервов (NGF) или другой фактор роста и иммуноглобулины.

Другие эффекторные молекулы могут включать поддающиеся обнаружению вещества, которые можно использовать, например, в диагностике. Примеры поддающихся обнаружению веществ включают различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы, биолюминесцентные материалы, радиоактивные нуклиды, испускающие позитроны материалы (для использования в позитронно-эмиссионной томографии) и ионы нерадиоактивных парамагнитных металлов. Ионы металлов, которые можно конъюгировать с антителами для применения в качестве диагностических средств, в целом см. в US 4741900. Подходящие ферменты включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, β -галактозидазу или ацетилхолинэстеразу; подходящие простетические группы включают стрептавидин, авидин и биотин; подходящие флуоресцентные материалы включают умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеинизотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламинфлуоресцеин, дансилхлорид и фикоэритрин; подходящие люминесцентные материалы включают люминол; подходящие биолюминесцентные материалы включают люциферазу, люциферин и экворин; и подходящие радиоактивные нуклиды включают ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In и ^{99}Tc .

В другом варианте осуществления эффекторная молекула может увеличивать время полужизни антитела *in vivo* и/или снижать иммуногенность антитела и/или увеличивать доставку антитела через эпителиальный барьер в иммунную систему. Примеры подходящих эффекторных молекул этого типа включают полимеры, альбумин, альбуминсвязывающие белки или альбуминсвязывающие соединения, такие как те, которые описаны в WO 05/117984.

Когда эффекторная молекула представляет собой полимер, она в целом может представлять собой синтетический или встречаемый в природе полимер, например, необязательно замещенный полиалкилен с линейной или разветвленной цепью, полиалкениленовый или полиоксипалиленовый полимер или разветвленный или неразветвленный полисахарид, например, гомо- или гетерополисахарид.

Конкретные необязательные заместители, которые могут присутствовать на указанных выше синтетических полимерах, включают одну или более гидроксильных, метильных или метоксигрупп.

Конкретные примеры синтетических полимеров включают необязательно замещенные поли(этиленгликоль), поли(пропиленгликоль)поли(виниловый спирт) с линейной или разветвленной цепью или их производные, в частности, необязательно замещенный поли(этиленгликоль), такой как метоксиполи(этиленгликоль), или его производные.

Конкретные встречаемые в природе полимеры включают лактозу, амилозу, декстран, гликоген или их производные.

"Производные", как используют в настоящем описании, предназначены включать реакционноспособные производные, например, тиол-селективные реакционноспособные группы, такие как малеимиды и т.п. Реакционноспособную группу можно связывать непосредственно или через линкерный сегмент с полимером. Следует принимать во внимание, что остаток такой группы в некоторых случаях будет образовывать часть продукта в виде линкерной группы между фрагментом антитела и полимером.

Размер полимера можно варьировать по желанию, но в целом он находится в диапазоне усредненных молекулярных масс от 500 до 50000 Да, например, от 5000 до 40000 Да, например, от 20000 до 40000 Да. Размер полимера, в частности, можно выбирать на основе предполагаемого использования продукта, например способности к локализации в определенных тканях, таких как опухоли, или увеличению времени полужизни в циркуляции (обзор см. в Chapman, 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews*,

54, 531-545). Таким образом, например, когда продукт предназначен для того, чтобы покидать циркуляцию и проникать в ткань, например, для использования в лечении опухоли, может быть полезно использовать низкомолекулярный полимер, например, с молекулярной массой приблизительно 5000 Да. Для применений, где продукт остается в циркуляции, может быть полезно использовать более высокомолекулярный полимер, например, имеющий молекулярную массу в диапазоне от 20000 до 40000 Да.

Подходящие полимеры включают полиалкиленовый полимер, такой как поли(этиленгликоль) или, в частности, метоксиполи(этиленгликоль) или его производное и, в частности, с молекулярной массой в диапазоне приблизительно от 15000 приблизительно до 40000 Да.

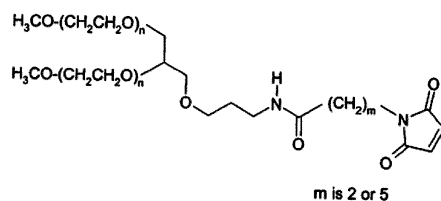
В одном из вариантов осуществления антитела для использования в настоящем раскрытии прикрепляют к фрагментам поли(этиленгликоля) (PEG). В одном конкретном примере антитело представляет собой фрагмент антитела, а молекулы PEG можно прикреплять через любую доступную боковую цепь аминокислоты или функциональную группу концевой аминокислоты, расположенной во фрагменте антитела, например, любую свободную амино-, имино-, тиоловую, гидроксильную или карбоксильную группу. Такие аминокислоты могут встречаться в природе во фрагменте антитела или могут быть сконструированы во фрагменте с использованием способов с рекомбинантной ДНК (см., например, US 5219996; US 5667425; WO 98/25971, WO 2008/038024). В одном из вариантов осуществления молекула антитела по настоящему изобретению представляет собой модифицированный фрагмент Fab, в котором модификация представляет собой добавление на С-конец его тяжелой цепи одной или более аминокислот для того, чтобы сделать возможным прикрепление эффекторной молекулы. Подходящим образом, дополнительные аминокислоты образуют модифицированную шарнирную область, содержащую один или более остатков цистеина, к которым можно прикреплять эффекторную молекулу. Можно использовать несколько участков для прикрепления двух или больше молекул PEG.

Подходящим образом PEG молекулы ковалентно связывают через тиоловую группу по меньшей мере одного остатка цистеина, расположенного во фрагменте антитела. Каждую молекулу полимера, прикрепленную к модифицированному фрагменту антитела, можно ковалентно связывать с атомом серы в остатке цистеина, расположенном во фрагменте. Ковалентная связь в целом представляет собой дисульфидную связь или, в частности, связь сера-углерод. Когда тиоловую группу используют в качестве точки прикрепления, можно использовать надлежащим образом активированные эффекторные молекулы, например, тиол-селективные производные, такие как малеимиды и производные цистеина. Активированный полимер можно использовать в качестве исходного материала при получении модифицированных полимерами фрагментов антител, как описано выше. Активированный полимер может представлять собой любой полимер, содержащий тиоловую реакционноспособную группу, например α -галогенкарбоновую кислоту или сложный эфир, например йодацетамид, имид, например малеимид, винилсульфон или дисульфид. Такие исходные материалы можно получать коммерчески (например, из Nektar, ранее Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, USA) или можно получать из коммерчески доступных исходных материалов, используя стандартные химические процедуры. Конкретные молекулы PEG включают 20K метокси-PEG-амин (который можно получать из Nektar, ранее Shearwater; Rapp Polymere; и SunBio) и M-PEG-SPA (который можно получать из Nektar, ранее Shearwater).

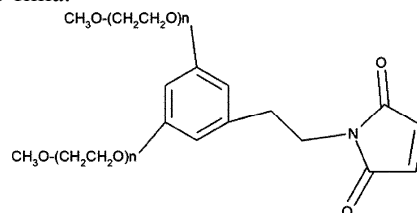
В одном из вариантов осуществления Fab или Fab' в конструкциях по настоящему раскрытию пегилируют, т.е. они имеют PEG (поли(этиленгликоль)), ковалентно прикрепленный к ним, например, в соответствии со способом, раскрытым в EP 0948544 или EP 1090037 [см. также "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical и Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ред.), Plenum Press, New York, "Poly(ethyleneglycol) Chemistry и Biological Applications", 1997, J. Milton Harris и S. Zalipsky (ред.), American Chemical Society, Washington DC и "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam и A. Dent, Grove Publishers, New York; Chapman, A. 2002, Advanced Drug Delivery Reviews, 2002, 54:531-545]. В одном из вариантов осуществления PEG прикрепляют к цистеину в шарнирной области. В одном из примеров модифицированный PEG фрагмент Fab имеет малеимидную группу, ковалентно связанную с одной тиоловой группой в модифицированной шарнирной области. Остаток лизина может быть ковалентно связан с малеимидной группой и к каждой из аминокислотных групп на остатке лизина можно прикреплять полимер метоксиполи(этиленгликоль), имеющий молекулярную массу приблизительно 20000 Да. Общая молекулярная масса PEG, прикрепленного к фрагменту Fab, следовательно, может составлять приблизительно 40000 Да.

Конкретные молекулы PEG включают 2-[3-(N-малеимидо)пропионамидо]этиламин модифицированного N,N'-бис-(метоксиполи(этиленгликолем) MW 20000) лизина, также известный как PEG2MAL40K (доступный в Nektar, ранее Shearwater).

Альтернативные источники линкеров PEG включают NOF, которые дают GL2-400MA2 (где m в следующей структуре равно 5) и GL2-400MA (где m равно 2) и n равно приблизительно 450:



То есть каждый PEG составляет приблизительно 20000 Да. Кроме того, альтернативные PEG эф-фекторные молекулы следующего типа:



доступны в Dr Reddy, NOF и Jenkem.

В одном из вариантов осуществления предусмотрена молекула антитела по настоящему раскрытию, которую пегилируют (например, с использованием PEG, описанного в настоящем описании), прикрепляя через остаток аминокислоты цистеина по или приблизительно по аминокислоте 226 в цепи, например, аминокислоте 226 тяжелой цепи (при последовательной нумерации).

В одном из вариантов осуществления предусмотрена полинуклеотидная последовательность, кодирующая молекулу по настоящему раскрытию, такая как последовательность ДНК. В одном из вариантов осуществления предусмотрена последовательность ДНК, кодирующая полипептидную цепь формулы (I), (Ia) или (Ib). В одном из вариантов осуществления представлена последовательность ДНК, кодирующая полипептидную цепь формулы (II), (IIa) или (IIb). В одном из вариантов осуществления предусмотрена полинуклеотидная последовательность, кодирующая один или более, например два или больше, полипептидных компонентов молекулы по настоящему раскрытию, например предусмотрена последовательность ДНК, кодирующая полипептид формулы (I) и (II), или (Ia) и (IIa), или (Ib) и (IIb).

В одном из вариантов осуществления полинуклеотид, такой как ДНК, содержится в векторе.

В одном из вариантов осуществления вектор содержит последовательность ДНК, кодирующую полипептид формулы (I), (Ia) или (Ib), например ДНК непосредственно не присоединяют или прикрепляют к последовательности ДНК, кодирующей полипептид формулы (I), (IIa) и/или (IIb).

В одном из вариантов осуществления вектор содержит последовательность ДНК, кодирующую полипептид формулы (II), (IIa) или (IIb), например ДНК непосредственно не присоединяют или прикрепляют к последовательности ДНК, кодирующей полипептид формулы (I), (Ia) и/или (Ib).

В одном из вариантов осуществления вектор содержит ДНК, кодирующую последовательность тяжелой и легкой цепей конструкции антитела в соответствии с настоящим раскрытием, например, на одной и той же или другой нити ДНК (т.е. соединенная ДНК или отдельная ДНК), например, где ДНК, кодирующую тяжелые и легкие цепи, предоставляют в одной плазмиде или векторе, где тяжелая цепь предоставлена в одной плазмиде/векторе и легкая цепь предоставлена в другой плазмиде/векторе.

Общие способы, с помощью которых можно конструировать векторы, способы трансфекции и способы культивирования хорошо известны специалистам в данной области. В этом отношении отсылают к "Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F.M. Ausubel (ред.), Wiley Interscience, New York и Maniatis Manual, который производит Cold Spring Harbor Publishing.

Также предусмотрена клетка-хозяин, содержащая один или более клонирующих или экспрессирующих векторов, содержащих одну или более последовательностей ДНК, описанных в настоящем документе, кодирующих антитело по настоящему раскрытию. Любую подходящую систему клетка-хозяин/вектор можно использовать для экспрессии последовательностей ДНК, кодирующих молекулу антитела по настоящему изобретению. Можно использовать бактериальные, например E. coli, и другие микробные системы или также можно использовать эукариотические, например млекопитающие, экспрессирующие системы клеток-хозяев. Подходящие млекопитающие клетки-хозяева включают СНО, миеломные или гибридомные клетки.

Настоящее раскрытие также предусматривает процесс получения молекулы антитела в соответствии с настоящим раскрытием, включающий культивирование клетки-хозяина, содержащей вектор по настоящему изобретению, в условиях, подходящих экспрессии белка с ДНК, кодирующей молекулу антитела по настоящему изобретению, и выделение молекулы антитела.

Для получения продуктов, содержащих как тяжелые, так и легкие цепи, клеточную линию можно трансфицировать двумя векторами, первый вектор кодирует полипептид легкой цепи, и второй вектор кодирует полипептид тяжелой цепи. Альтернативно, можно использовать один вектор, вектор содержит последовательности, кодирующие полипептиды легких цепей и тяжелых цепей, например, как раскрыто в настоящем описании. В одном из примеров клеточную линию можно трансфицировать тремя вектора-

ми, каждый кодирует полипептидную цепь молекулы антитела по настоящему изобретению.

В одном из вариантов осуществления клетку трансфицируют двумя векторами, каждый кодирует отличающийся полипептид по настоящему раскрытию, например, предусмотренный в одном и том же векторе или в различных векторах. В одном из вариантов осуществления клетка (клеточная линия) содержит ДНК, кодирующую полипептид формулы (Ia) и полипептид формулы (IIa), например, где ДНК, кодирующие каждый полипептид, находятся в одном и том же или различных векторах. В одном из вариантов осуществления клетка (клеточная линия) содержит ДНК, кодирующую полипептид формулы (Ib) и полипептид формулы (IIb), например, где ДНК, кодирующие каждый полипептид, находятся в одном и том же или различных векторах.

Следует принимать во внимание, что соотношение каждого вектора, трансфицируемого в клетку-хозяина, можно варьировать для того, чтобы оптимизировать экспрессию продукта полиспецифического антитела. В одном из вариантов осуществления соотношение векторов составляет 1:1. Следует принимать во внимание, что специалист способен находить оптимальное соотношение с помощью стандартного тестирования уровней экспрессии белков после трансфекции.

Также следует принимать во внимание, что, когда два или больше из полипептидных компонентов кодируют с помощью полинуклеотида в одном векторе, относительную экспрессию каждого полипептидного компонента можно варьировать, используя различные промоторы для каждого полинуклеотида, кодирующего полипептидный компонент по настоящему раскрытию.

Антитела и фрагменты в соответствии с настоящим раскрытием экспрессируют на хороших уровнях в клетках-хозяевах. Таким образом, свойства антител и/или фрагментов, похоже, способствуют коммерческой обработке.

Антитела по настоящему раскрытию можно использовать при лечении и/или профилактике, например, патологического состояния.

Настоящее раскрытие также предусматривает фармацевтическую или диагностическую композицию, содержащую молекулу антитела по настоящему раскрытию в комбинации с одним или более из фармацевтически приемлемого эксципиента, разбавителя или носителя. Соответственно, предусмотрено использование антитела по настоящему раскрытию или композиции, содержащей его, для использования в лечении и для изготовления лекарственного средства.

Композицию обычно поставляют в виде части стерильной фармацевтической композиции, которая обычно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее раскрытие также предусматривает процесс получения фармацевтической или диагностической композиции, включающий добавление и смешивание молекулы антитела по настоящему раскрытию вместе с одним или более из фармацевтически приемлемого эксципиента, разбавителя или носителя.

Молекула антитела может представлять собой единственный активный ингредиент в фармацевтической или диагностической композиции или ей могут сопутствовать другие активные ингредиенты, включая другие антительные ингредиенты, например антитела против IL-1 β , против Т-клеток, против IFN γ или против LPS, или неантительные ингредиенты, такие как ксантины. Другие подходящие активные ингредиенты включают антитела, способные вызывать толерантность, например антитела против CD3 или против CD4.

В дополнительном варианте осуществления молекулу антитела или композицию в соответствии с раскрытием используют в комбинации с дополнительным фармацевтически активным средством, например кортикостероидом (таким как флутиказона пропионат) и/или β 2-агонистом (таким как салбутамол, салметерол или формотерол), или ингибиторами клеточного роста и пролиферации (такими как рапамицин, циклофосфамид, метотрексат), или, альтернативно, ингибитором CD28 и/или CD40. В одном из вариантов осуществления ингибитор представляет собой низкомолекулярное соединение. В другом варианте осуществления ингибитор представляет собой биологическое терапевтическое или диагностическое средство, например, антитело со специфичностью к мишени.

Фармацевтические композиции подходящим образом содержат терапевтически эффективное количество антитела по изобретению. Термин "терапевтически эффективное количество", как используют в настоящем описании, относится к количеству терапевтического средства, необходимого для того, чтобы лечить, улучшать или предотвращать целевое заболевание или состояние, или для того, чтобы проявлять поддающийся обнаружению терапевтический или предупредительный эффект. Для любого антитела терапевтически эффективное количество можно оценивать изначально или в анализах клеточных культур или в животных моделях, обычно у грызунов, кроликов, собак, свиней или приматов. Животную модель также можно использовать для того, чтобы определять подходящий диапазон концентраций и путь введения. Затем такую информацию можно использовать для того, чтобы определять эффективные дозы и пути для введения человеку.

Точное терапевтически эффективное количество для субъекта-человека зависит от тяжести состояния заболевания, общего состояния здоровья субъекта, возраста, массы и пола субъекта, диеты, времени и частоты введения, комбинации(й) лекарственных средств, реакций чувствительности и толерантно-

сти/ответа на терапию. Это количество можно определять с помощью стандартных экспериментов, и оно находится в пределах суждения клинициста. В целом, терапевтически эффективное количество составляет от 0,01 до 50 мг/кг, например, от 0,1 до 20 мг/кг. Альтернативно, доза может составлять от 1 до 500 мг в сутки, например, от 10 до 100, 200, 300 или 400 мг в сутки. Фармацевтические композиции, в целях удобства, можно представлять в форме стандартных доз, содержащих предварительно определяемое количество активного средства по изобретению.

Композиции можно вводить пациенту индивидуально или можно вводить в комбинации (например, одновременно, последовательно или раздельно) с другими средствами, лекарственными средствами или гормонами.

В одном из вариантов осуществления антитела или композиции по настоящему раскрытию используют в комбинированной терапии, например комбинированной терапии для лечения злокачественной опухоли, в частности, где терапия включает введение химиотерапевтического средства и/или применение лучевой терапии.

Доза, в которой вводят молекулу антитела по настоящему раскрытию, зависит от природы состояния, подлежащего лечению, степени присутствующего воспаления и от того, используют ли молекулу антитела профилактически или для лечения существующего состояния.

Частота доз зависят от времени полужизни молекулы антитела и длительности ее эффекта. Если молекула антитела имеет короткое время полужизни (например, от 2 до 10 ч), может быть необходимо давать одну или более доз в сутки. Альтернативно, если молекула антитела имеет большое время полужизни (например, от 2 до 15 суток) может быть необходимо давать дозу только раз в сутки, раз в неделю или даже раз в каждый 1 или 2 месяца.

Сам фармацевтически приемлемый носитель не должен индуцировать образование антител, вредных для индивидуума, получающего композицию, и не должен быть токсичным. Подходящие носители могут представлять собой крупные, медленно метаболизируемые макромолекулы, такие как белки, полипептиды, липосомы, полисахариды, полимолочные кислоты, полигликолевые кислоты, полимерные аминокислоты, сополимеры аминокислот и неактивные вирусные частицы.

Можно использовать фармацевтически приемлемые соли, например, соли неорганических кислот, такие как гидрохлориды, гидробромиды, фосфаты и сульфаты, или соли органических кислот, такие как ацетаты, пропионаты, малонаты и бензоаты.

Фармацевтически приемлемые носители в терапевтических композициях дополнительно могут содержать жидкости, такие как вода, солевой раствор, глицерин и этанол. Дополнительно, вспомогательные вещества, такие как смачивающие или эмульгирующие средства или pH буферные вещества, могут присутствовать в таких композициях. Такие носители позволяют формулировать фармацевтические композиции в виде таблеток, пилюль, драже, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, взвесей и суспензий, для глотания пациентом.

Подходящие формы для введения включают формы, подходящие для парентерального введения, например, посредством инъекции или инфузии, например, посредством инъекции болюса или непрерывной инфузии. Когда продукт предназначен для инъекции или инфузии, он может принимать форму суспензии, раствора или эмульсии в маслянистом или водном носителе и он может содержать вспомогательные средства, такие как консервант, суспендирующее, стабилизирующее и/или диспергирующее средство. Альтернативно, молекула антитела может быть в сухой форме, для восстановления подходящей стерильной жидкостью перед использованием.

Когда сформулированы, композиции по изобретению можно вводить непосредственно субъекту. Субъекты, подлежащие лечению, могут являться животными. Однако в одном или более вариантах осуществления композиции адаптируют для введения субъектам-людям.

В одном из вариантов осуществления в составах в соответствии с настоящим раскрытием, pH конечного состава не схож со значением изоэлектрической точки антитела или фрагмента, например, если pH состава равен 7, то может подходить pI 8-9 или выше. Не желая ограничиваться теорией, полагают, что это в конечном итоге может давать конечный состав с усовершенствованной стабильностью, например, антитело или фрагмент остается в растворе.

Фармацевтические композиции по этому раскрытию можно вводить с помощью любого числа путей, включая в качестве неограничивающих примеров оральный, внутривенный, внутримышечный, внутриартериальный, интрамедуллярный, интратекальный, внутрижелудочковый, трансдермальный, чрескожный (например, см. WO 98/20734), подкожный, интраперитонеальный, интраназальный, энтеральный, топический, сублингвальный, интравагинальный или ректальный пути. Безыгольные шприцы также можно использовать для того, чтобы вводить фармацевтические композиции по изобретению. Обычно терапевтические композиции можно получать в виде инъектируемых, в виде или жидких растворов, или суспензий. Также можно получать твердые формы, подходящие для растворения или суспендирования в жидких носителях перед инъекцией. В одном из вариантов осуществления молекулы антител по настоящему изобретению вводят подкожно.

В одном из вариантов осуществления антитело или композицию в соответствии с настоящим раскрытием предоставляют предварительно заправленными в шприц, например, в формате, подходящем для

самостоятельного введения.

Непосредственную доставку композиций в целом следует выполнять посредством инъекции, подкожно, интраперитонеально, внутривенно или внутримышечно или доставлять в интерстициальное пространство ткани. Композиции также можно вводить в конкретную ткань, представляющую интерес. Лечение дозами может представлять собой схему с однократной дозой или схему с несколькими дозами.

Следует принимать во внимание, что активный ингредиент в композиции представляет собой молекулу антитела по настоящему раскрытию. По существу, она восприимчива к разрушению в желудочно-кишечном тракте. Таким образом, если композиция подлежит введению через путь с использованием желудочно-кишечного тракта, композиция должна содержать средства, которые защищают антитело от разрушения, но которые высвобождают антитело, когда оно абсорбировано из желудочно-кишечного тракта.

Подробное обсуждение фармацевтически приемлемых носителей доступно в Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).

В одном из вариантов осуществления состав предоставляют в виде состава для топического введения, включая ингаляцию.

Подходящие ингалируемые препараты включают ингалируемые порошки, аэрозоли с отмеренными дозами, содержащие газообразные пропелленты, или ингалируемые растворы, не содержащие газообразных пропеллентов (такие как растворы или суспензии для небулайзеров). Ингалируемые порошки в соответствии с раскрытием, содержащие активное вещество, могут состоять лишь из вышеуказанных активных веществ или из смеси указанных выше активных веществ и физиологически приемлемого эксципиента.

Эти ингалируемые порошки могут содержать моносахариды, (например, глюкозу или арабинозу), дисахариды (например, лактозу, сахарозу, мальтозу), олиго- и полисахариды (например, декстраны), многоатомные спирты (например, сорбит, маннит, ксилит), соли (например, хлорид натрия, карбонат кальция) или их смеси друг с другом. Моно- или дисахариды используют подходящим образом, использование лактозы или глюкозы, в частности, но не исключительно, в форме их гидратов.

У частиц для осаждения в легких должен быть размер частицы меньше чем 10 мкм, такой как 1-9 мкм, например, от 0,1 до 5 мкм, в частности, от 1 до 5 мкм. Размер частицы активного средства (такого как антитело или фрагмент антитела) имеет первостепенное значение.

Газообразные пропелленты, которые можно использовать для того, чтобы получать ингалируемые аэрозоли, известны в данной области. Подходящие газообразные пропелленты выбирают среди углеводородов, таких как н-пропан, н-бутан или изобутан, и галогенуглеводородов, таких как хлорированные и/или фторированные производные метана, этана, пропана, бутана, циклопропана или циклобутана. Вышеуказанные газообразные пропелленты можно использовать сами по себе или в виде их смесей.

Особенно подходящими газообразными пропеллентами являются галогенизированные производные алканов, выбранные из TG11, TG12, TG134a и TG227. Среди вышеуказанных галогенизированных углеводородов, TG134a (1,1,1,2-тетрафторэтан) и TG227 (1,1,1,2,3,3,3-гептафторпропан) и их смеси являются особенно подходящими.

Ингалируемые аэрозоли, содержащие газообразные пропелленты, также могут содержать другие ингредиенты, такие как соразтворители, стабилизаторы, поверхностно-активные средства (сурфактанты), антиоксиданты, смазывающие средства и средства для корректировки pH. Все эти ингредиенты известны в данной области.

Ингалируемые аэрозоли, содержащие газообразный пропеллент, в соответствии с изобретением могут содержать вплоть до 5% по массе активного вещества. Аэрозоли в соответствии с изобретением содержат, например, от 0,002 до 5% по массе, от 0,01 до 3% по массе, от 0,015 до 2% по массе, от 0,1 до 2% по массе, от 0,5 до 2% по массе или от 0,5 до 1% по массе активного.

Альтернативно, топическое введение в легкие также может происходить посредством введения жидкого раствора или суспензионного состава, например, с использованием устройства, такого как небулайзер, например небулайзер, соединенный с компрессором (например, небулайзер Pari LC-Jet Plus(R), соединенный с компрессором Pari Master(R), производства Pari Respiratory Equipment, Inc., Richmond, Va.).

В одном из вариантов осуществления состав предоставлен в виде дискретных ампул, содержащих стандартную дозу для доставки посредством распыления.

В одном из вариантов осуществления антитело поставляют в лиофилизированной форме для восстановления или, альтернативно, в виде суспензионного состава.

Антитело по настоящему раскрытию можно доставлять диспергированным в растворителе, например, в форме раствора или суспензии. Его можно суспендировать в подходящем физиологическом растворе, например физиологическом солевом растворе, фармакологически приемлемом растворителе или буферном растворе. Буферные растворы, известные в данной области, могут содержать от 0,05 до 0,15 мг эдета динатрия, от 8,0 до 9,0 мг NaCl, от 0,15 до 0,25 мг полисорбата, от 0,25 до 0,30 мг безводной лимонной кислоты и от 0,45 до 0,55 мг цитрата натрия на 1 мл воды с тем, чтобы достигать pH приблизительно от 4,0 до 5,0. Как отмечено выше, суспензию можно выполнять, например, из лиофилизированно-

го антитела.

Терапевтические суспензии или растворенные составы также могут содержать один или более эксципиентов. Эксципиенты хорошо известны в данной области и включают буферы (например, цитратный буфер, фосфатный буфер, ацетатный буфер и бикарбонатный буфер), аминокислоты, мочевины, спирты, аскорбиновую кислоту, фосфолипиды, белки (например, сывороточный альбумин), EDTA, хлорид натрия, липосомы, маннит, сорбит и глицерин. Растворы или суспензии можно инкапсулировать в липосомы или биоразрушаемые микросферы. Состав в целом предоставляют по существу в стерильной форме, используя стерильные процессы изготовления.

Это может включать получение и стерилизацию посредством фильтрования раствора в буферном растворителе, который используют для состава, асептического суспендирования антитела в стерильном растворе в буферном растворителе и дозирования состава в стерильную тару с помощью способов, известных специалистам в данной области.

Распыляемый состав в соответствии с настоящим раскрытием можно предоставлять, например, в виде единиц однократных доз (например, закупоренные пластмассовые контейнеры или флаконы), упакованных в оболочку из фольги. Каждый флакон содержит стандартную дозу в объем, например, 2 мл растворителя/буфера для растворения.

Антитела по настоящему раскрытию полагают подходящими для доставки через распыление.

Также предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая молекулу полиспецифического антитела в соответствии с настоящим раскрытием и эксципиент, разбавитель или носитель.

Раскрытие также распространяется на молекулу полиспецифического антитела или фармацевтическую композицию в соответствии с настоящим раскрытием для использования в лечении, в частности для использования в лечении состояния или нарушения, выбранного из группы, состоящей из инфекций (вирусных, бактериальных, грибковых и паразитарных), эндотоксического шока, ассоциированного с инфекцией, артрита, такого как ревматоидный артрит, астмы, такая как тяжелая астма, хронического обструктивного заболевания легких (COPD), воспалительного заболевания таза, болезни Альцгеймера, воспалительного заболевания кишечника, болезни Крона, язвенного колита, болезни Пейрони, целиакии, заболевания желчного пузыря, пилонидального заболевания, перитонита, псориаза, васкулита, хирургических адгезии, инсульта, диабета I типа, болезни Лайма, менингоэнцефалита, аутоиммунного увеита, иммуноопосредованных воспалительных нарушений центральной и периферической нервной системы, таких как рассеянный склероз, волчанка (такая как системная красная волчанка) и синдром Гийена-Барре, atopического дерматита, аутоиммунного гепатита, фиброзирующего альвеолита, базедовой болезни, IgA нефропатии, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, синдрома Менъера, пузырчатки, первичного билиарного цирроза, саркоидоза, склеродермии, гранулематоза Вегенера, других аутоиммунных нарушений, панкреатита, травмы (хирургической), реакции трансплантат против хозяина, отторжения трансплантата, заболевания сердца, включая ишемические заболевания, такие как инфаркт миокарда, а также атеросклероза, внутрисосудистой коагуляции, резорбции кости, остеопороза, остеоартрита, периодонтита, гипохлоргидрии и злокачественной опухоли, например, эпителиальной злокачественной опухоли.

Таким образом, предусмотрено использование молекулы полиспецифического антитела или фармацевтической композиции по настоящему раскрытию, для изготовления лекарственного средства для лечения состояния или нарушения, выбранного из группы, состоящей из инфекций (вирусных, бактериальных, грибковых и паразитарных), эндотоксического шока, ассоциированного с инфекцией, артрита, такого как ревматоидный артрит, астмы, такой как тяжелая астма, хронического обструктивного заболевания легких (COPD), воспалительного заболевания таза, болезни Альцгеймера, воспалительного заболевания кишечника, болезни Крона, язвенного колита, болезни Пейрони, целиакии, заболевания желчного пузыря, пилонидального заболевания, перитонита, псориаза, васкулита, хирургических адгезии, инсульта, диабета I типа, болезни Лайма, менингоэнцефалита, аутоиммунного увеита, иммуноопосредованных воспалительных нарушений центральной и периферической нервной системы, таких как рассеянный склероз, волчанка (такая как системная красная волчанка) и синдром Гийена-Барре, atopического дерматита, аутоиммунного гепатита, фиброзирующего альвеолита, базедовой болезни, IgA нефропатии, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, синдрома Менъера, пузырчатки, первичного билиарного цирроза, саркоидоза, склеродермии, гранулематоза Вегенера, других аутоиммунных нарушений, панкреатита, травмы (хирургической), реакции трансплантат против хозяина, отторжения трансплантата, заболевания сердца, включая ишемические заболевания, такие как инфаркт миокарда, а также атеросклероза, внутрисосудистой коагуляции, резорбции кости, остеопороза, остеоартрита, периодонтита, гипохлоргидрии и злокачественной опухоли, например, эпителиальной злокачественной опухоли.

Как используют в настоящем описании, термин "содержащий" в контексте данного описания следует интерпретировать как "включающий".

Варианты осуществления и предпочтения можно комбинировать, как подходит технически.

Раскрытие в настоящем документе описывает варианты осуществления, содержащие определенные цели. Раскрытие также распространяется на те же варианты осуществления, состоящие или состоящие по существу из указанных целей.

Источники, включая патентные документы, включены в настоящее описание посредством ссылки.

Положительные варианты осуществления, перечисленные в настоящем описании, можно использовать в качестве основы для оговорок.

По заявке на данное изобретение испрашивают приоритет G1621591.5, включенной в настоящее описание в полном объеме посредством ссылки. Корректировки в настоящем раскрытии могут быть на основе раскрытия, в частности, последовательностей, раскрытых в указанном приоритетном документе.

Примеры

Пример 1. Анализ вариантов 645, где CDR 645 пересаживали в каркасы 497 или 2109 в Fab и Fab-dsscFv

Fab конструировали в форматах Fab без шарнира (Fab) и все Fab-dsscFv антитела (также обозначаемые как BYbe) конструировали в виде HC BYbe, где тяжелую цепь (HC) Fab соединяют со стабилизированным дисульфидами scFv (ds HL т.е. V_H-линкер-V_L, линкер=GGGGSGGGSGGGSGGGGS SEQ ID № 97) через линкер на основе G₄S (SGGGSGGGGS SEQ ID № 43).

HC BYbe конструировали с использованием родительского трансплантата 645 (gL4gH5) и его вариантов 645, где CDR 645 пересаживали в каркасы 497 или 2109. Варианты 645 использовали или в положении scFv в виде ds HL, или в положении Fab с использованием A26 в качестве стабилизированного дисульфидами scFv. Конструировали антитела, представленные на фиг. 1, где FW обозначает каркас.

Способы.

Временная экспрессия expiHEK.

Плазмидами легких цепей и тяжелых цепей в соотношении 1:1, трансфицировали клетки ExpiHEK способом ExpiFectamine в 50 мл масштабе в двух повторениях, как рекомендовано производителем (Life Technologies). Трансфекции инкубировали при 37°C, встряхивая на 140 об/мин и в 8% CO₂. После 7 суток супернатанты собирали, фильтровали через 0,22 мкм фильтр и определяли выход экспрессии посредством HPLC с белком G, используя проприетарный Fab в качестве стандарта.

Очистка белка.

Супернатанты концентрировали 40-кратно с использованием концентраторов Centricon с MWCO 10 кДа и впоследствии загружали на колонку с белком G HiTrap (GE Healthcare). Колонку промывали PBS pH 7,4, после чего следовало элюирование связанного материала с использованием 0,1 М глицина pH 2,7. Элюат нейтрализовали с использованием 2 М Tris-HCl (pH 8,5) перед заменой буфера на PBS pH 7,4. Элюированные белки определяли количественно по поглощению на 280 нм и разводили до 1 мг/мл в PBS pH 7,4 и хранили при 4°C в течение по меньшей мере 16 ч перед дальнейшими анализами.

Эксклюзионная (SE) HPLC.

Для G3000 SE HPLC образцы очищенного белка (~20 мкг) загружали на TSKgel G3000SW, 10 мкм, колонка 7,5 мм ID×300 мм (Tosoh) и проявляли с использованием изократическим градиентом 0,2 М фосфата pH 7 на скорости 1 мл/мин. Непрерывное обнаружение по поглощению на 280 нм.

SDS-PAGE.

Получали образцы очищенного белка (2 мкг) для невозстанавливающего и восстанавливающего разделения в 4-20% геле из акриламида Tris/глицина SDS-полиакриламида Novex в соответствии с рекомендациями производителя (Life Technologies). Для невозстанавливающих гелей в образцы также добавляли 100 мМ N-этилмалеимида. Образцы загружали на гели и разделяли при постоянном напряжении 125 В в течение ~200 мин в подвижном буфере Tris/глицин. Белковые маркеры SeeBlue2 (Life Technologies) использовали в качестве стандарта. Гели окрашивали Instant Blue (Expedeon) и обесцвечивали несколькими заменами дистиллированной воды.

Тепловая стабильность.

Анализ ThermoFluor использовали для того, чтобы осуществлять мониторинг тепловой стабильности очищенных белков. Реакционная смесь содержала 5 мкл оранжевого красителя 30× SYPRO®, разведенного водой из 5000× стокового раствора, и 45 мкл образца очищенного белка на скорости 0,11 мг/мл в PBS pH 7,4. Аликвоты (10 мкл) смеси распределяли в четырех повторениях в планшет с 384 оптическими лунками для ПЦР и прогоняли на 7900HT Fast Real-Time PCR System (Agilent). Систему термического циклирования на основе эффекта Пельтье устанавливали на 20-99°C со скоростью изменения 1,1°C/мин. Устройством с зарядовой связью (CCD) осуществляли мониторинг изменений флуоресценции в лунках. Увеличение интенсивности флуоресценции наносили на график и точку перегиба склона(ов) использовали для того, чтобы создавать срединную точку термостабильного перехода (T_m).

Поверхностный плазмонный резонанс/двойной анализ аффинности.

Аффинности связывания и кинетические параметры для взаимодействий антител определяли посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR), проведенного на Biacore T100 или Biacore 3000 с использованием сенсорных чипов CM5 (GE Healthcare Bio-Sciences AB) и подвижного буфера HBS-EP (10 мМ HEPES (pH 7,4), 150 мМ NaCl, 3 мМ EDTA, 0,05% об./об. поверхностно-активного средства P20). Все эксперименты осуществляли при 25°C. Образцы антител захватывали на поверхности сенсорного чипа, используя или Fab козы со специфичностью к F(ab')₂ человека (Jackson ImmunoResearch), или само-

стоятельно созданное моноклональное антитело против C_H1 человека. Ковалентной иммобилизации захватывающего антитела достигали стандартной химической реакцией сопряжения по аминокгруппе до уровня 6000-7000 единиц ответа (RU).

Альбумин человека ChromPure (Jackson ImmunoResearch) титровали относительно захваченного антитела от 50 нМ. Каждый цикл анализа состоял из исходного захвата образца антитела с использованием 1 мин впрыска, перед фазой ассоциации, состоящей из 3 мин впрыска антигена (альбумин человека), после чего осуществляли мониторинг диссоциации в течение 10 мин. После каждого цикла регенерировали захватывающую поверхность. Используемые скорости потоков составляли 10 мкл/мин для захвата, 30 мкл/мин для фаз ассоциации и диссоциации и 10 мкл/мин для регенерации. У биспецифического антитела оценивали потенциал к одновременному связыванию как с сывороточным альбумином человека, так и с лигандом рецептора Т-клеток (лигандный антиген) посредством захвата лиганда (биспецифическое антитело) на поверхности сенсорного чипа перед выполнением или отдельных 3 мин впрысков 5 мкМ сывороточного альбумина человека: 50 нМ лигандного антигена или смешанного раствора как 5 мкМ сывороточного альбумина человека, так и 50 нМ лигандного антигена.

Для кинетического анализа осуществляли титрование антигена (для сывороточного альбумина человека обычно от 62,5 нМ до 2 мкМ), пустую проточную кювету использовали для вычитания эталона и впрыски пустого буфера включали для того, чтобы вычитать шум прибора и дрейф.

Кинетические параметры определяли посредством одновременной глобальной аппроксимации получаемых сенсограмм к стандартной модели связывания 1:1 с использованием программного обеспечения для оценки Biacore T100 V2.0.1 или Biacore 3000 Biaevaluation v3.2.

Результаты.

Временная экспрессия Fab и BУbe.

На фиг. 3 выходы экспрессии Fab с каркасами 497 или 2109 (фиг. 3, # 2? 3) сравнимы с родительским Fab 645 (фиг. 1, # 1). Как HC BУbe с 645 в качестве связанного дисульфидами HL scFv, двукратное увеличение экспрессии наблюдали, когда каркасы родительского трансплантата 645 заменяли на каркасы 497 или 2109 (фиг. 1, # 7-9). Когда 645 помещали в положение Fab в формате HC BУbe, не наблюдали значительное изменение экспрессии между родительским 645 и вариантами BУbe с каркасами 497 или 2109 (фиг. 3, # 10-12).

Биофизический анализ Fab и BУbe.

Эксклюзионная HPLC.

На фиг. 4 все Fab были высокомономерными, независимо от изотипа каркаса или CDR (фиг. 4, # 1-6). В качестве HC BУbe с 645 в положении scFv (ds HL) родительское BУbe 645 (фиг. 4, # 7) было на 59% мономерным, тогда как, когда CDR 645 пересаживали в каркасы 2109 (фиг. 4, # 9) или каркасы 497 (фиг. 4, # 8), % мономеров возрастал до 80 и 93% соответственно, что подтверждало значительное влияние каркасных остатков на мультимеризацию. С другой стороны, с 645 в положении Fab в формате HC BУbe каркасы 497 не оказывали эффекта, и как родительский 645, так и этот вариант были высокомономерными (фиг. 4, # 10, 11). С каркасами 2019 (фиг. 4, # 12), каркасные остатки, похоже, влияли на мультимеризацию, даже несмотря на то что, как Fab, эта комбинация CDR и каркасов и родительский 2109 (фиг. 4, # 3, 6), оба высокомономерны. SDS-PAGE

На фиг. 5 в невозстанавливающем и восстанавливающем SDS-PAGE полноразмерные Fab (фиг. 5a) и легкие и тяжелые цепи (фиг. 5b) мигрировали к своим предсказанным M_r ~49 и ~24-26 кДа соответственно (фиг. 5, # 1-6).

На фиг. 6 в невозстанавливающем SDS-PAGE наблюдали миграцию полноразмерного продукта BУbe (фиг. 6a) к ~89 кДа, что выше его предсказанной M_r (~79 кДа). Минорные полосы, представляющие мультимерные частицы и свободные легкие и тяжелые цепи, можно наблюдать выше и ниже этой полосы на всех дорожках соответственно. На восстанавливающем геле тяжелые (фиг. 6b) и легкие (фиг. 6c) цепи мигрировали к своим предсказанным молекулярным массам.

Таблица 7

Тепловая стабильность Fab и BYbe

Белок	Образец	Tm1	Tm2
645gL4gH5 Fab nh	№ 1	83,1	ND
645CDR-497FW/645CDR Fab nh	№ 2	80,2	ND
645CDR-2109FW Fab nh	№ 3	79,2	ND
A26 Fab nh	№ 4	82,4	ND
497 Fab nh	№ 5	71,4	ND
2109 Fab nh	№ 6	70,8	ND
A26 Fab-645 ds HL	№ 7	84,5	74,0
A26 Fab-645CDR-497FW ds HL	№ 8	70,5	ND
A26 Fab-645CDR-2109FW ds HL	№ 9	66,5	ND
645 Fab-A26 ds HL	№ 10	81,9	ND
645CDR-497FW Fab-645 ds HL	№ 11	73,5	ND
645CDR-2109FW Fab-645 ds HL	№ 12	83,4	69,5

Tm родительских Fab 645, 497 и 2109 составляли 83,1, 71,4 и 70,8°C соответственно (табл. 9, № 1, 5, 6). Пересадка CDR 645 в каркасы 497 или 2109 вела к Tm 80,2 и 79,2°C соответственно, что подтверждало важность остатков CDR при определении термостабильности. Однако, как HC BYbe, где вариант 645 представлял собой стабилизированный дисульфидами scFv, связанный с тяжелой цепью Fab A26, Tm для 645CDR/497FW и 645CDR/2109FW была значительно понижена на 15 и 18°C соответственно (табл. 9, № 7-9). Когда вариант 645 помещали в положение Fab в HC BYbe, Tm не подвергались значительному влиянию, где 645CDR/2109FW по-видимому также стабилен как родительский 645 (табл. 9, № 10-12).

Аффинность к сывороточному альбумину человека (HSA).

Таблица 8

Аффинность набора 1 к HSA

	Формат	Анализируемое вещество	ka (1/Ms)	kd (1/c)	KD (M)
№ 1	645 Fab nh	HSA	$1,46 \times 10^5$	$1,96 \times 10^{-4}$	$1,34 \times 10^{-9}$
№ 2	645CDR-497FW Fab nh	HSA	$1,30 \times 10^5$	$6,01 \times 10^{-4}$	$4,63 \times 10^{-9}$
№ 3	645CDR-2109FW Fab nh	HSA	$1,50 \times 10^5$	$2,27 \times 10^{-4}$	$1,52 \times 10^{-9}$
№ 7	A26 Fab - 645gH5gL4 dsHL BYBe (wt)	HSA	$1,50 \times 10^5$	$1,92 \times 10^{-4}$	$1,28 \times 10^{-9}$
№ 8	A26- Fab- 645CDR-497FW ds HL BYbe	HSA	$1,35 \times 10^5$	$4,77 \times 10^{-4}$	$3,53 \times 10^{-9}$
№ 9	A26- Fab- 645CDR-	HSA	$1,41 \times 10^5$	$6,79 \times 10^{-4}$	$4,81 \times 10^{-9}$

	2109FW ds HL BYbe				
№ 10	645gL4gH5 Fab-A26 BYbe wt	HSA	$1,56 \times 10^5$	$2,50 \times 10^{-4}$	$1,61 \times 10^{-9}$
№ 11	645CDR-497FW Fab-A26 ds HL BYbe	HSA	$1,51 \times 10^5$	$1,86 \times 10^{-4}$	$1,23 \times 10^{-9}$
№ 12	645CDR- 2109FW Fab- A26 ds HL BYbe	HSA	$1,37 \times 10^5$	$6,51 \times 10^{-4}$	$4,74 \times 10^{-9}$

В отношении порядка величины, скорости ассоциации и диссоциации и аффинности форматов к HSA в тестируемых комбинациях сравнимы с родительскими форматами.

Сводная таблица 9

	Белок	Выход экспресси и (мг/л)	%, мономер	Тепловая стабильност ь		Аффинность к HSA (KD (M))
				Tm1	Tm2	
№ 1	645 Fab nh	233,5	100,0	83,1	ND	$1,34 \times 10^{-9}$
№ 2	497FW/645CDR Fab nh	195,2	95,5	80,2	ND	$4,63 \times 10^{-9}$
№ 3	2109FW/645CDR Fab nh	199,8	95,0	79,2	ND	$1,52 \times 10^{-9}$
№ 4	A26 Fab nh	106,5	96,1	82,4	ND	nd
№ 5	497 Fab nh	81,8	92,4	71,4	ND	nd
№ 6	2109 Fab nh	62,4	100,0	70,8	ND	nd
№ 7	A26 -645 BYBe wt	53,6	60,6	84,5	74,0	$1,28 \times 10^{-9}$
№ 8	A26-497FW/645CDR BYbe	135,5	92,1	70,5	ND	$3,53 \times 10^{-9}$
№ 9	A26-2109FW/645CDR BYbe	156,5	79,9	66,5	ND	$4,81 \times 10^{-9}$
№ 10	645-A26 BYbe wt	160,9	98,9	81,9	ND	$1,61 \times 10^{-9}$
№	497FW/645CDR-A26 BYbe	115,9	96,8	73,5	ND	$1,23 \times 10^{-9}$
11						9
№ 12	2109FW/645CDR-A26 BYbe	116,9	71,0	83,4	69,5	$4,74 \times 10^{-9}$

ND = не обнаружено;

nd = не выполнено.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула полиспецифического антитела, содержащая по меньшей мере два связывающих домена, каждый с варибельной тяжелой областью V_H и варибельной легкой областью V_L , где каждый связывающий домен обладает специфичностью к антигену и содержит шесть CDR, характеризующихся тем, что по меньшей мере один связывающий домен содержит:

(a) варибельную тяжелую область V_{HA} , имеющую каркас, содержащий SEQ ID NO: 1 для FR1, SEQ ID NO: 3 для FR2, SEQ ID NO: 4 для FR3 и SEQ ID NO: 5 для FR4, при условии, что CDRH3 в V_{HA} отличается от RYYSAMFAY (SEQ ID NO: 129), и варибельную легкую область V_{LA} , имеющую каркас, содержащий SEQ ID NO: 6 для FR1, SEQ ID NO: 7 для FR2, SEQ ID NO: 8 для FR3 и SEQ ID NO: 10 для FR4; или

(b) варибельную тяжелую область V_{HA} , имеющую каркас, содержащий SEQ ID NO: 16 для FR1,

SEQ ID NO: 18 для FR2, SEQ ID NO: 19 для FR3 и SEQ ID NO: 20 для FR4, при условии, что CDRH3 в V_{HA} отличается от RYYSAMPFAY (SEQ ID NO: 129), и переменную легкую область V_{LA} , имеющую каркас, содержащий SEQ ID NO: 11 для FR1, SEQ ID NO: 12 для FR2, SEQ ID NO: 13 для FR3 и SEQ ID NO: 15 для FR4;

где по меньшей мере одна переменная область V_{HA} и по меньшей мере одна переменная область V_{LA} присутствуют в dsscFv и где указанная молекула полиспецифического антитела представляет собой Fab-dsscFv или Fab-(dsscFv)₂,

где указанная молекула полиспецифического антитела является биспецифической или триспецифической.

2. Молекула полиспецифического антитела по п.1, в которой V_{LA} содержит SEQ ID NO: 99 и V_{HA} содержит SEQ ID NO: 101.

3. Молекула полиспецифического антитела по п.2, в которой один связывающий домен содержит SEQ ID NO: 106.

4. Молекула полиспецифического антитела по п.1, в которой V_{LA} содержит SEQ ID NO: 103 и V_{HA} содержит SEQ ID NO: 105.

5. Молекула полиспецифического антитела по п.4, в которой один связывающий домен содержит SEQ ID NO: 111.

6. Молекула полиспецифического антитела по любому из пп.1-5, в которой V_{HA} содержит три CDR тяжелой цепи, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 143 для CDRH1, SEQ ID NO: 144 для CDRH2 и SEQ ID NO: 145 для CDRH3.

7. Молекула полиспецифического антитела по любому из пп.1-6, в которой V_{LA} содержит три CDR легкой цепи, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 146 для CDRL1, SEQ ID NO: 147 для CDRL2 и SEQ ID NO: 148 для CDRL3.

8. Молекула полиспецифического антитела по любому предшествующему пункту, в которой CDR происходят не от человека.

9. Молекула полиспецифического антитела по любому предшествующему пункту, где молекула антитела является биспецифической.

10. Акцепторный каркас для минимизации агрегации в полиспецифическом антителе по любому из предшествующих пунктов, где указанный акцепторный каркас содержит SEQ ID NO: 22 и 24, где XXX в каждом из положений CDR независимо представляют от 1 до 35 аминокислот, и где SEQ ID NO: 22 и 24 присутствуют в dsscFv, и где указанное полиспецифическое антитело представляет собой Fab-dsscFv или Fab-(dsscFv)₂.

11. Способ улучшения уровней экспрессии мономера молекулы антитела, имеющей по меньшей мере один связывающий домен с переменной тяжелой областью и переменной легкой областью, где каждая переменная область имеет каркас и три CDR, указанный способ включает стадию замены каркаса переменной области на каркас, выбранный из группы, содержащей или состоящей из комбинации:

i) каркаса области V_H , содержащего SEQ ID NO: 1 для FR1, SEQ ID NO: 3 для FR2, SEQ ID NO: 4 для FR3 и SEQ ID NO: 5 для FR4; и

ii) каркаса области V_L , содержащего SEQ ID NO: 6 для FR1, SEQ ID NO: 7 для FR2, SEQ ID NO: 8 для FR3 и SEQ ID NO: 10 для FR4; или

iii) каркаса области V_H , содержащего SEQ ID NO: 16 для FR1, SEQ ID NO: 18 для FR2, SEQ ID NO: 19 для FR3 и SEQ ID NO: 20 для FR4; и

iv) каркаса области V_L , содержащего V_L1 , SEQ ID NO: 11 для FR1, SEQ ID NO: 12 для FR2, SEQ ID NO: 13 для FR3 и SEQ ID NO: 15 для FR4,

где комбинация каркасов i) и ii) или iii) и iv) присутствует в dsscFv и где указанная молекула антитела представляет собой Fab-dsscFv или Fab-(dsscFv)₂.

Форматы: набор 1

	Формат	Fab	scFv	645	497FW	2109FW	('645')
#1	Fab	645gL4gH5	-				Fab nh
#2	Fab	645CDR/497FW	-				
#3	Fab	645CDR/2109FW	-				
#4	Fab контроль	A26	-				A26 Fab- '645' ds HL
#5	Fab контроль	497	-				
#6	Fab контроль	2109	-				
#7	HC BYbe	A26	645gH5gL4 ds HL				'645' Fab- A26 ds HL
#8	HC BYbe	A26	645CDR/497FW ds HL				
#9	HC BYbe	A26	645CDR/2109FW ds HL				
#10	HC BYbe	645gH5	A26 ds HL				
#11	HC BYbe	645CDR/497FW	A26 ds HL				
#12	HC BYbe	645CDR/2109FW	A26 ds HL				

Фиг. 1

Последовательности

Последовательности каркасов

(497 VH)FR1 SEQ ID № 1 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS

(497 VH)FR2 SEQ ID № 2 WVRQAPGKGLEWVG

(ds497 VH)FR2 SEQ ID № 3 WVRQAPGKCLEWVG

(497 VH) FR3 SEQ ID № 4 RFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTT

(497 VH) FR4 SEQ ID № 5 WGQGTTLVTVSS

Каркас 497 VH, содержащий SEQ ID № 1, 2, 4 и 5, где XXX представляет CDR SEQ ID № 21

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS XXX WVRQAPGKGLEWVG XXX RFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTT XXX WGQGTTLVTVSS

Каркас ds497 VH, содержащий SEQ ID № 1, 3, 4 и 5, где XXX представляет CDR SEQ ID № 22

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS XXX WVRQAPGKCLEWVG XXX RFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTT XXX WGQGTTLVTVSS

(497 VL)FR1 SEQ ID № 6 AIQLTQSPSSLSASVGDRTITC

(497 VL)FR2 SEQ ID № 7 WYQQKPGKAPKLLIY

(497 VL)FR3 SEQ ID № 8 GVPSRFRSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC

(497 VL)FR4 SEQ ID № 9 FGQGTKVEIK

(ds497 VL)FR4 SEQ ID № 10 FGCGTKVEIK

Каркас 497 VL, содержащий SEQ ID № 6, 7, 8 и 9, где XXX представляет CDR SEQ ID № 23

AIQLTQSPSSLSASVGDRVITC XXX WYQQKPGKAPKLLIY XXX GVPSRFSGSGSGTDFLTITISLQPEDFATYYC XXX FGQGTKVEIK

Каркас ds497 VL, содержащий SEQ ID № 6, 7, 8 и 10, где XXX представляет CDR SEQ ID № 24

AIQLTQSPSSLSASVGDRVITC XXX WYQQKPGKAPKLLIY XXX GVPSRFSGSGSGTDFLTITISLQPEDFATYYC XXX FGCGTKVEIK

(2109 VL)FR1 SEQ ID № 11 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC

(2109 VL)FR2 SEQ ID № 12 WYQQKPGKVPKLLIY

(2109 VL)FR3 SEQ ID № 13 GVPSRFSGSGSGTDFLTITISLQPEDVATYFC

(2109 VL)FR4 SEQ ID № 14 FGQGTKLEIK

(ds2109 VL)FR4 SEQ ID № 15 FGCGTKLEIK

Каркас 2109 VL, содержащий SEQ ID № 11, 12, 13 и 14, где XXX представляет CDR SEQ ID № 25

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC XXX WYQQKPGKVPKLLIY XXX GVPSRFSGSGSGTDFLTITISLQPEDVATYFC XXX FGQGTKLEIK

Каркас ds2109 VL, содержащий SEQ ID № 11, 12, 13 и 15, где XXX представляет CDR SEQ ID № 26

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC XXX WYQQKPGKVPKLLIY XXX GVPSRFSGSGSGTDFLTITISLQPEDVATYFC XXX FGCGTKLEIK

(2109 VH)FR1 SEQ ID № 16 EVQLVESGGGLVPGGSLRLSCAAS

(2109 VH)FR2 SEQ ID № 17 WVRQAPGKGLEWIG

(ds2109 VH)FR2 SEQ ID № 18 WVRQAPGKCLEWIG

(2109 VH)FR3 SEQ ID № 19 RFTISVDKAKNSAYLQMNSLRAEDTAVYYCTR

(2109 VH)FR4 SEQ ID № 20 WGQGTLLVTVSS

Каркас 2109 VH, содержащий SEQ ID № 16, 17, 19 и 20, где XXX представляет CDR SEQ ID № 27

EVQLVESGGGLVPGGSLRLSCAAS XXX WVRQAPGKGLEWIG XXX RFTISVDKAKNSAYLQMNSLRAEDTAVYYCTR XXX WGQGTLLVTVSS

Каркас ds2109 VH, содержащий SEQ ID № 16, 18, 19 и 20, где XXX представляет CDR SEQ ID № 28

EVQLVESGGGLVPGGSLRLSCAAS XXX WVRQAPGKCLEWIG XXX RFTISVDKAKNSAYLQMNSLRAEDTAVYYCTR XXX WGQGTLLVTVSS

Последовательности FW 2109 и 497:

VL FR1 SEQ ID №137 X₁IQX₂TQSPSSLSASVGDRVITC где X₁ представляет собой A или D, X₂ представляет собой L или M
 VL FR2 SEQ ID №138 WYQQKPGKX₃PKLLIY где X₃ представляет собой A или V
 VL FR3 SEQ ID №139 GVPSRFSGX₄GSGTDX₅TLTISLQPEDX₆ATYX₇C где X₄ представляет собой S или T, X₅ представляет собой F или Y, X₆ представляет собой F или V, X₇ представляет собой Y или F
 VL FR4 SEQ ID № 140 FGQGTKX₈EIK где X₈ представляет собой V или L
 VH FR2 SEQ ID №141 WVRQAPGKLEWXX₉G где X₉ представляет собой V или I
 VH FR3 SEQ ID №142 RFTISX₁₀DX₁₁X₁₂KNX₁₃X₁₄YLMNSLX₁₅X₁₆EDTAVYYCTX₁₇ где X₁₀ представляет собой R или V, X₁₁ представляет собой D или K, X₁₂ представляет собой S или A, X₁₃ представляет собой T или S, X₁₄ представляет собой L или A, X₁₅ представляет собой K или R, X₁₆ представляет собой T или A, X₁₇ представляет собой T или R.

CDR 645

Последовательности CDR антитела 645

CDRH1:	GIDLSNYAIN	(SEQ ID №143)
CDRH2:	IIWASGTTFYATWAKG	(SEQ ID №144)
CDRH3:	TVPGYSTAPYFDL	(SEQ ID №145)
CDRL1:	QSSPSVWSNFLS	(SEQ ID №146)
CDRL2:	EASKLTS	(SEQ ID №147)
CDRL3:	GGGYSSISDTT	(SEQ ID №148)

CDR 645 L с каркасом 497 VL, содержащим SEQ ID № 6, 7, 8 и 9 SEQ ID № 98

AIQLTQSPSSLSASVGRVTITC**QSSPSVWSNFL**SWYQQKPGKAPKLLI**YEASKLTS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**GGGYSSI**
SDTTFGOGTKVEIK

CDR 645 L с каркасом ds497 VL, содержащим SEQ ID № 6, 7, 8 и 10 SEQ ID № 99
 AIQLTQSSPSSLSEAGVDRTVITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYICGGGYSSI
 SDTTFGCGTKVSEIK

CDR 645 H с каркасом 497 VH, содержащим SEQ ID № 1, 2, 4 и 5 SEQ ID № 100

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GIDLSNYA**INWVRQAPGKGLEWVG**I I WASGTTFFYATWAKGR**FTISRDDSKNTLYLQMN**SLK**LEDTAVYYCT**T**
ITVPGYSTAPYFDLWGOGTILTVSS

CDR 645 H с каркасом ds497 VH, содержащим SEQ ID № 1, 3, 4 и 5 SEQ ID № 101
EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWVGIIWASGTTFTATWAKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCT
TTPVGYSTAPYFDLWGOGTLTVTSS

CDR 645 L с каркасом 2109 VL, содержащим SEQ ID № 11, 12, 13 и 14 SEQ ID № 102

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**QSSPSVWSNFLSW**YQQKPGKVPKLLI**YEASKLT**SGVPSRFRSGTSGTDYTLTISSLPEDVATYFCGGGYSTI
SDTTFGOGTKLEIK

CDR 645 L с каркасом ds2109 VL, содержащим SEQ ID № 11, 12, 13 и 15 SEQ ID № 103

DIQMTQSPSSLSASVGRDVITITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKVPKLLIYE**EASKLTS**GVPSRFSGTSGSDTYTLTISSLQPEDVATYFCGGY**SSI**

SDTTTFGCGTKLEIK

CDR 645 H с каркасом 2109 VH, содержащим SEQ ID № 16, 17, 19 и 20 SEQ ID № 104

CDR 645 Н с каркасом ds2109 VH, содержащим SEQ ID № 16, 18, 19 и 20 SEQ ID № 105

EVQLVESGGGLVLPKGGSLRLSCAAS**GIDLSNYAIN**WVRQAPGKCLEWIG**I****IWASGTTFYATWAK**GRFTISVDKAKNSAYLQMNSLRAEDTAVYYCT**RTVPGYSTAPYFDLWGOGTLVT**VSS

scFv 645CDR/497FW ds HL SEQ ID № 106

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GIDLSNYAINWVRQAPGKC**LEWVG**I**I**WASGTTFYATWAKGR**FTISRDDSKNTLYLQMN**SLK**TEDTAVYYCT**TTPVPGYSTAPYFDL**WGQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGAIQLTQSPSSLASVGDRTITC**QSSPSVWSNFL**SWYQQKPGKAPK**LLIYE**
ASKLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLT**ISS**LQPEDFATYYC**GGGYSSISD**TTFGCGTKVEIK

Линкер-scFv 645CDR/497FW ds HL SEO ID № 107

SGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVPRPGGSLRLSCAAS**GIDLSNYAIN**WVRQAPGKCLEWVGII**IWASGTTFFYATWAKGR**FTISRDDSKNTLYLQMNSL
KTEDTAVYYCTT**TPPGYSTAPYFDL**WGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGGSAIQLTQSPSSLASVGDVRVITIT**QSSPSVWSNFL**SWYQQK
PGKAPKLLI**EASKLTS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY**CGGYSSISD**TTFGCGTKVEIK

scFv 645CDR/2109 FW ds HL SEQ ID № 111

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GIDLSNYAIN**WVRQAPGCKLEWIG**I****IWASGTTFYATWAKGRFT**ISVDKAKNSAYLQMNLSRAEDTAVYYCT**R****TPVTPGSA****TAPYFDL**WGQGLTVLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSIQMTQSPFSLASAVGDRVITIT**CQSSPSVSNFL**SWYQQKPGKVPK**LLIYE****AS****KL****TS**GVPSRFGSGTGGSGTDYTLTISSLPEDVATY**FCGGGYSISD**TTFGCGTKLEIK

Линкер-scFv 645CDR/2109 FW ds HL SEO ID № 112

SGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVPRPGGSLRLSCAAS**GIDLSNYAIN**WVRQAPGKCLEWIGI**I**WAS**G**TT**F**YAT**W**AKGRFTISVDKAKNSAYLQMNSL
RAEDTAVYYCT**R****T****V****P****G****S****T****A****P****F****D****L****W****G****Q****T****L****V****T****S****S****G****G****G****S****G****G****G****S****G****G****G****S****D****I****Q****M****T****Q****S****P****S****S****L****S****A****S****V****G****D****R****V****T****I****T****C****Q****S****S****P****S****V****S****N****F****L****S****W****Y****Q****Q****K**
PGKVPKLLI**E****A****S****K****L****T****S****G****V****P****S****R****F****S****G****T****G****S****G****T****D****Y****L****T****I****S****S****L****O****P****E****D****V****A****T****F****C****G****G****Y****S****S****I****S****D****T****T****F****G****C****G****T****K****L****E****I****K**

1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105

645gL4 SEQ ID NO:113
DIQMTQSPSSVSASVGRVITITCQSSPSVWSN FLSWYQQKPKGKAPKLLIYEASKLTS~~GVPSRFRSGSGSGTDFTLT~~ISSLQPEDFATYYCGGGYSSISD TTFGGGTKEVEIK

497gL2 SEQ ID NO:98
AIQLTQSPSSLASVGRVITITCQSSPSVWSN FLSWYQQKPKGKAPKLLIYEASKLTS~~GVPSRFRSGSGSGTDFTLT~~ISSLQPEDFATYYCGGGYSSISD TTFGGGTKEVEIK

CA2109gL18 SEQ ID NO:102
DIQMTQSPSSLASVGRVITITCQSSPSVWSN FLSWYQQKPKGKAPKLLIYEASKLTS~~GVPSRFRSGSGSGTDYTLT~~ISSLQPEDVATYFCGGYSSISD TTFGGGTKEVEIK

Полужирный с подчеркиванием = CDR легкой цепи 645
497FW/645CDR VL : D01A, M04L, V11L, G103Q [4 изменения]
2109FW/645CDR VL: V11L, A44V, S66T, F72Y, F84V, Y88F, G103Q, V107L [8 изменений]

1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 abc 55 60 65 70 75 80 abc 85 90 95 100 105 110

645gH5 SEQ ID NO: 114
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDLSNYAIN WVRQAPGKGLWIGIIW ASGTTFYATWAKGRFTISRDNSEKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYF DL WGQGTILVTVSS

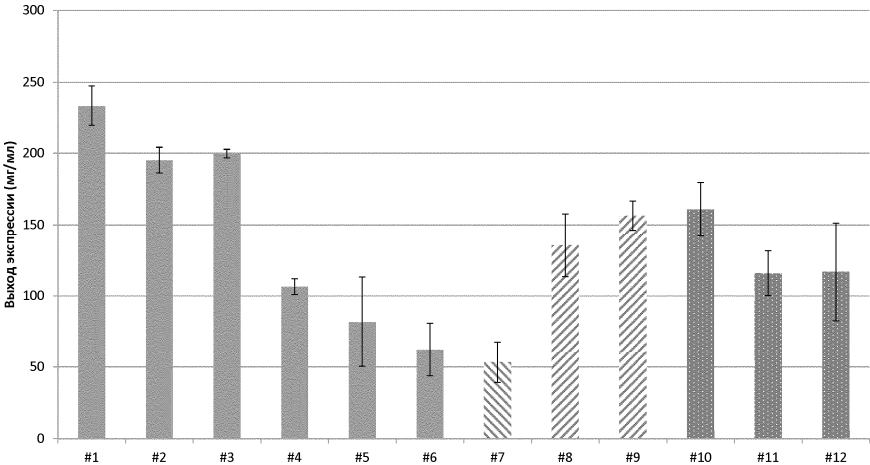
497gH7 SEQ ID NO: 100
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDLSNYAIN WVRQAPGKGLWVGIIW ASGTTFYATWAKGRFTISRDDSEKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCTTTPVPGYSTAPYF DL WGQGTILVTVSS

CA2109gH2 SEQ ID NO:104
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDLSNYAIN WVRQAPGKGLWIGIIW ASGTTFYATWAKGRFTISVDKAKNSAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRTVPGYSTAPYF DL WGQGTILVTVSS

Полужирный с подчеркиванием = CDR тяжелой цепи 645
497FW/645CDR VH : L05V, Q13K, V24A, I48V, V78L, R86K, A87T, A96T, R97T [9 изменений]
2109FW/645CDR VH: L05V, Q13K, V24A, R71V, S74A, T77S, V78A, A96T, [8 изменений]

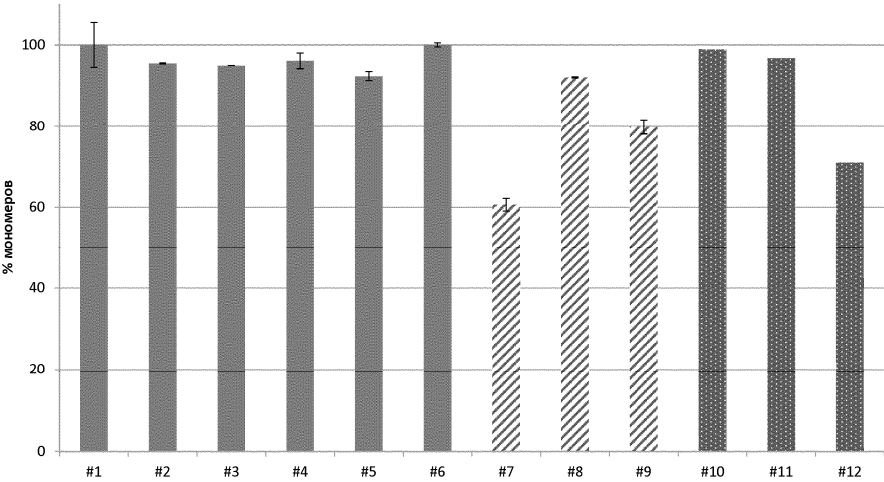
Фиг. 2b

Набор 1. Титры экспрессии Fab и BУbe (когатные каркасы),
экспрессируемых в клетках ExpiHEK, n=2



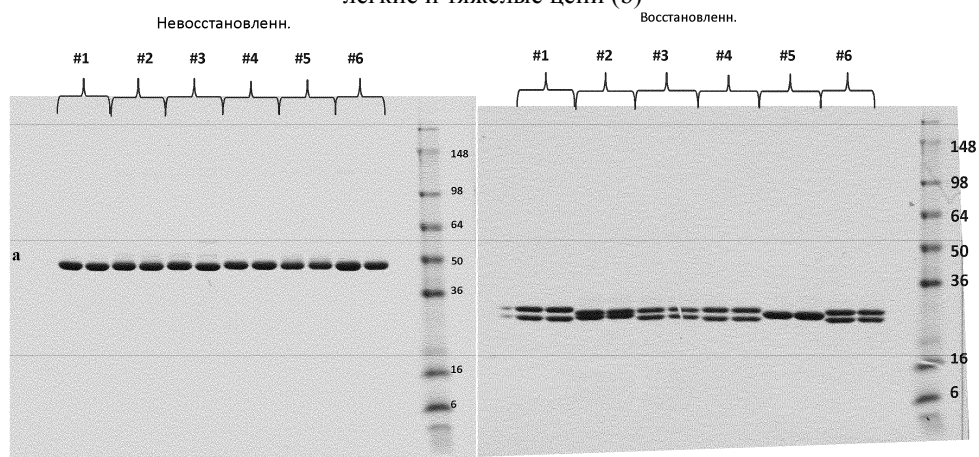
Фиг. 3

% мономеров Fab и BУbe из набора 1 (когатные пары)



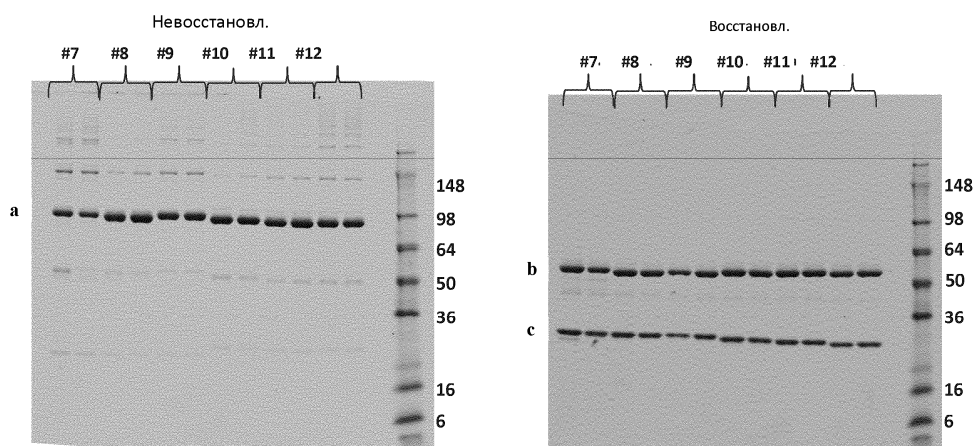
Фиг. 4

SDS-PAGE для Fab из набора 1. Полноразмерный Fab (а) и
легкие и тяжелые цепи (b)

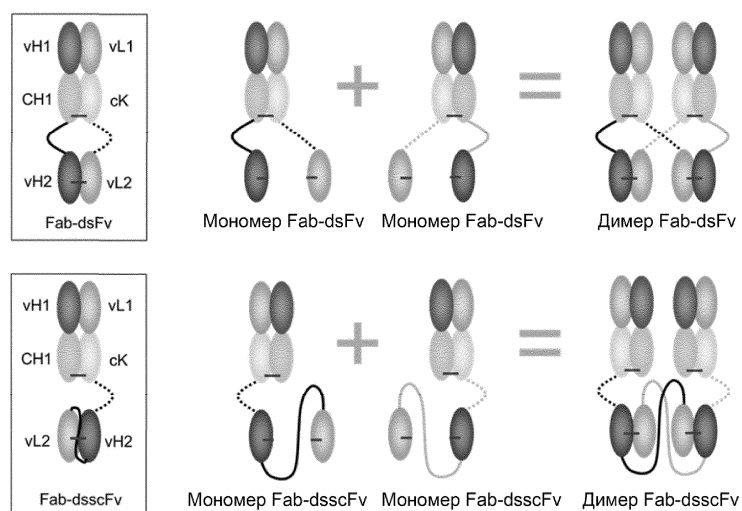


Фиг. 5

SDS-PAGE для BYbe из набора 1

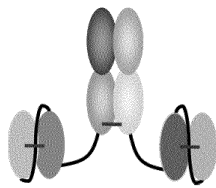


Фиг. 6

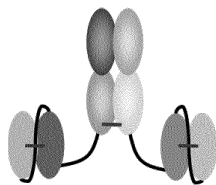


Фиг. 7

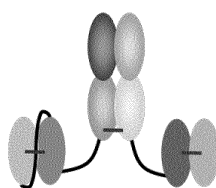
Форматы Fab-2х dsscFv и формат Fab-dsscFv-dsFv



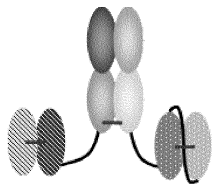
Fab-(HC)-dsscFv-(LC)-dsscFv



Fab-(LC)-dsscFv-(HC)-dsscFv



Fab-(HC)dsscFv-(LC)dsFv



Fab-(HC)dsFv-(LC)dsscFv

ФИГ. 8

