

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043032**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.04.19

(21) Номер заявки
201892691

(22) Дата подачи заявки
2017.05.19

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(54) **ОДНОДОМЕННЫЙ БЕЛОК, СВЯЗЫВАЮЩИЙ СЫВОРОТОЧНЫЙ АЛЬБУМИН**

(31) **62/339,682**

(32) **2016.05.20**

(33) **US**

(43) **2019.04.30**

(86) **PCT/US2017/033665**

(87) **WO 2017/201488 2017.11.23**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ХАРПУН ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:
**Дабридж Роберт Б., Лемон Брайан Д.,
Остин Ричард Дж., Эвнин Люк, Гуно
Жанмари (US)**

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

(56) WO-A1-2012131053
HARDING et al. "The immunogenicity of
humanized and fully human antibodies," mAbs, 01
May 2010 (01.05.2010), Vol. 2, Iss. 3, Pgs. 256-265.
entire document
US-A1-20090259026
US-B2-9309327
US-B2-9327022

(57) В изобретении описаны однодоменные белки, связывающие сывороточные альбумины с повышенной термостабильностью, аффинностью связывания и устойчивыми профилями агрегации. Описаны также мультиспецифичные связывающие белки, включающие однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, согласно изобретению. Изобретение предусматривает также фармацевтические композиции, содержащие связывающие белки, описанные в данной заявке, и способы применения таких композиций.

B1

043032

043032

B1

Настоящая заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США № 62/339,682, поданной 20 мая 2016 года, которая во всей полноте включена в настоящее изобретение посредством отсылки.

Список последовательностей

Настоящая заявка содержит Список последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и тем самым включён в настоящее изобретение посредством отсылки во всей полноте. Указанная ASCII копия, созданная 18 мая 2017 года, получила название 47517-703_601_SEQ.txt и имеет объём 22,218 байт.

Включение посредством отсылки

Все публикации, патенты и заявки на патент, упомянутые в данном описании, вводятся в настоящее изобретение посредством отсылки в той степени, как если бы было указано, что каждая(ый) индивидуальная(ый) публикация, патент или заявка на патент включена (включён) посредством отсылки и представлена (представлен) во всей полноте.

Сведения о предшествующем уровне техники

Альбумин представляет собой самый распространённый (основной) белок плазмы крови, высоко-растворимый, очень стабильный, и имеет чрезвычайно продолжительный период полужизни в кровотоке (период полувыведения). Альбумин можно использовать разными способами для повышения периода полужизни терапевтических молекул в кровотоке. В настоящем изобретении предусматривается однодоменный альбуминсвязывающий белок, который можно использовать для пролонгирования периода полужизни (полувыведения) терапевтических молекул.

Сущность изобретения

Согласно одному варианту в изобретении предусматривается однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, содержащий области (участки), определяющие комплементарность, CDR1, CDR2 и CDR3, где (a) аминокислотная последовательность CDR1 представлена как GF_X₁X₂X₃X₄FGMS (SEQ ID NO: 1), X₁ обозначает треонин, аргинин, лизин, серии или пролин, X₂ обозначает фенилаланин или тирозин, X₃ означает серии, аргинин или лизин, X₄ означает серии, лизин, аргинин или аланин; (b) аминокислотная последовательность CDR2 представлена последовательностью SISGSX₅X₆TLYAX₇SX₈K (SEQ ID NO: 2), X₅ обозначает серии, аргинин, треонин или аланин, X₆ обозначает аспарагиновую кислоту, гистидин, валин или треонин, X₇ обозначает аспарагиновую кислоту, гистидин, аргинин или серии, X₈ обозначает валин или лейцин; и (c) аминокислотная последовательность CDR3 представлена последовательностью GGSLX₉X₁₀ (SEQ ID NO: 3), X₉ обозначает серии, аргинин, треонин или лизин и X₁₀ обозначает аргинин, лизин, валин, пролин или аспарагин, при этом X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆, X₇, X₈, X₉ и X₁₀ не обозначают одновременно треонин, фенилаланин, серии, серии, серии, аспарагиновую кислоту, аспарагиновую кислоту, валин, серии и аргинин, соответственно. Согласно некоторым вариантам однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, имеет следующую формулу: f₁-r₁-f₂-r₂-f₃-r₃-f₄, где f₁ обозначает последовательность SEQ ID NO: 1; r₂ обозначает последовательность SEQ ID NO: 2; и r₃ обозначает последовательность SEQ ID NO: 3; и где f₁, f₂, f₃ и f₄ обозначают остатки карбасной области, выбранные таким образом, чтобы указанный белок был по меньшей мере на восемьдесят процентов идентичен аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 10. Согласно некоторым вариантам однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, содержит аминокислотную последовательность, в которой r₁ включает SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 16. Согласно некоторым вариантам однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, содержит аминокислотную последовательность, в которой r₂ включает SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 22. Согласно некоторым вариантам однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, содержит аминокислотную последовательность, в которой r₃ включает SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 24. Согласно некоторым вариантам однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, содержит аминокислотную последовательность, в которой r₁ включает SEQ ID NO: 14. Согласно некоторым вариантам однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, содержит аминокислотную последовательность, в которой r₁ включает SEQ ID NO: 15, r₂ включает SEQ ID NO: 17 и r₃ включает SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, содержит аминокислотную последовательность, в которой r₁ включает SEQ ID NO: 16, и r₃ включает SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, содержит аминокислотную последовательность, в которой r₁ включает SEQ ID NO: 15 и r₂ включает SEQ ID NO: 18. Согласно некоторым вариантам однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, содержит аминокислотную последовательность, в которой r₁ включает SEQ ID NO: 14 и r₃ включает SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, содержит аминокислотную последовательность, в которой r₁ включает SEQ ID NO: 15, r₂ включает SEQ ID NO: 19 и r₃ включает SEQ ID NO: 24. Согласно некоторым вариантам однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, содержит аминокислотную последовательность, в которой r₁ включает SEQ ID NO: 14 и r₂ включает SEQ ID NO: 20. Согласно некоторым вариантам однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, содержит аминокислотную последовательность, в которой r₁ включает SEQ ID NO: 15 и r₂ вклю-

звещающего сывороточный альбумин, находится в диапазоне от около 1 нМ и до около 5 нМ.

Согласно другому варианту в настоящем изобретении предусматривается полинуклеотид, кодирующий однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, по настоящему изобретению. В соответствии с другим вариантом описывается вектор, содержащий полинуклеотид, раскрываемый в настоящем изобретении. Согласно другому варианту описывается клетка-хозяин, трансформированная вектором по настоящему изобретению. Согласно одному варианту в изобретении предусматривается фармацевтическая композиция, содержащая (i) однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, по настоящему изобретению, полинуклеотид по настоящему изобретению, вектор по настоящему изобретению или клетку-хозяина по настоящему изобретению, и (ii) фармацевтически приемлемый носитель.

Согласно другому варианту в изобретении описывается способ получения однодоменного белка, связывающего сывороточный альбумин, по настоящему изобретению, причём указанный способ включает культивирование хозяина, трансформированного или трансфицированного с использованием вектора, содержащего нуклеотидную последовательность по настоящему описанию, кодирующую однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, в условиях, предусматривающих экспрессию однодоменного белка, связывающего сывороточный альбумин, и выделение и очистку полученного белка от культуры.

Также описывается способ лечения или уменьшения интенсивности пролиферативного заболевания, опухолевого заболевания, воспалительного заболевания, иммунологического нарушения, аутоиммунного заболевания, инфекционного заболевания, вирусного заболевания, аллергической реакции, паразитарной (инвазионной) реакции, болезни "трансплантат-против-хозяина" или "хозяин-против-трансплантата", включающий введение однодоменного белка, связывающего сывороточный альбумин, по настоящему изобретению субъекту, нуждающемуся в этом. Согласно некоторым вариантам субъектом является человек. Согласно некоторым вариантам субъект также включает введение агента в комбинации с однодоменным белком, связывающим сывороточный альбумин, по настоящему изобретению.

Согласно другому варианту в изобретении описывается мультиспецифичный связывающий белок, содержащий однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, по настоящему изобретению. Согласно другому варианту в изобретении описывается антитело, содержащее однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, по настоящему изобретению.

Согласно другому варианту в изобретении описывается мультиспецифичное антитело, биспецифичное антитело, sdAb (однодоменное антитело), переменный домен тяжёлой цепи, пептид или лиганд, содержащий однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, по настоящему изобретению. Согласно одному варианту в изобретении предусматривается антитело, содержащее однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, по настоящему изобретению, при этом указанное антитело представляет собой однодоменное антитело. Согласно некоторым вариантам однодоменное антитело получено из переменной области тяжёлой цепи IgG.

В одном варианте описывается мультиспецифичный/(ое) связывающий/(ее) белок/антитело, содержащий/(ее) однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, по настоящему изобретению и CD3 связывающий домен. В одном варианте описывается способ лечения или уменьшения интенсивности лечения или уменьшения интенсивности пролиферативного заболевания, опухолевого заболевания, воспалительного заболевания, иммунологического нарушения, аутоиммунного заболевания, инфекционного заболевания, вирусного заболевания, аллергической реакции, паразитарной (инвазионной) реакции, болезни "трансплантат-против-хозяина" или "хозяин-против-трансплантата", включающий введение мультиспецифичного антитела по настоящему изобретению субъекту, нуждающемуся в этом.

Краткое описание фигур

Новые признаки изобретения с характерными особенностями представлены в прилагаемой формуле изобретения. Для лучшего понимания признаков и преимуществ настоящего изобретения даётся ссылка на нижеприведённое подробное описание, где представлены иллюстративные варианты, в которых используются принципы изобретения, и прилагаемые фигуры, из которых:

На фиг. 1 иллюстрируется специфическое связывание фага, несущего родительские антитела к HSA, по определению титрованием методом ELISA (ИФА), с HSA антигеном и CD3 антигеном.

На фиг. 2 иллюстрируется перекрёстная реактивность фага, несущего анти-HSA антитела, по отношению к сывороточному альбумину человека, яванского макака и мыши по определению титрованием методом ELISA (ИФА).

На фиг. 3 представлены профили аффинности связывания девяти клонов для более точного определения Kd с использованием очищенных sdAbs (однодоменных антител, одAb).

На фиг. 4 представлена температура экспозиции с гидрофобными веществами (T_h °C) для некоторых вариантов анти-HSA sdAb (одAb).

На фиг. 5 иллюстрируется свойство некоторых вариантов анти-HSA sdAb образовывать димер в сравнении с образованием мономера при низких значениях pH.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

Хотя предпочтительные варианты настоящего изобретения показаны и описаны в настоящей заяв-

ке, для специалистов в данной области техники очевидно, что такие варианты даются только в качестве примеров. Множество вариантов, изменений и замен в пределах изобретения будут очевидны специалистам в данной области. Следует иметь в виду, что различные варианты изобретения по данному описанию могут применяться при практическом осуществлении изобретения. Предполагается, что в нижеприведённой формуле изобретения определяется объём изобретения и что тем самым охватываются способы и структуры в объёме этой формулы и их эквиваленты.

Некоторые определения.

Терминология, употребляемая в настоящей заявке, даётся лишь с целью описания конкретных случаев и не предполагается как ограничивающая. В контексте настоящей заявки предполагается, что формы единственного числа включают также формы множественного числа, если в контексте однозначно не указано иное. Также в тех случаях, когда термины "включающий", "включает", "имеющий", "имеет", "с" или их варианты употребляются как в подробном описании, так и/или в формуле изобретения, то предполагается, что такие термины являются неограничительными, аналогично термину "содержащий".

Термин "около" или "приблизительно" означает, с допустимой погрешностью, пределы конкретной величины, определяемые специалистом в данной области, которые частично зависят от того, как эта величина измеряется или определяется, например, от ограничений системы измерения. Например, "около" может означать в пределах 1 или более 1 стандартного отклонения, в соответствии с практикой, принятой для данной величины. Если не указано иное, в случае, когда в заявке или в Формуле изобретения описываются конкретные значения, то следует понимать, что термин "около" означает приемлемый интервал погрешности для конкретной величины.

Термины "индивидуум" ("человек"), "пациент" или "субъект" употребляются взаимозаменяемо, как синонимы. Употребление любого из этих терминов не требует описания ситуации и не ограничивается ситуацией, характеризующейся наблюдением (например, постоянным или периодическим) медицинского работника (например, врача, медсестры, среднего медработника, фельдшера, сиделки или работника хосписа).

Термин "каркасные" или "FR" остатки (или области) относятся к остаткам вариабельного домена, отличным от остатков CDR или гипервариабельной области по настоящему описанию. "Человеческая консенсусная каркасная область" означает каркасную область, которая представляет обычно (чаще всего) встречающийся аминокислотный остаток при отборе каркасных последовательностей VL или VH человеческого иммуноглобулина.

В данном контексте термин "вариабельная область" или "вариабельный домен" относится к тому факту, что последовательности некоторых участков вариабельных доменов значительно отличаются от последовательности антител и используются при связывании каждого конкретного антитела с его конкретным антигеном и специфичности каждого конкретного антитела в отношении его конкретного антигена. Однако вариабельность не распределена равномерно по всем вариабельным доменам антител. Она сконцентрирована в трёх сегментах, называемых областями, определяющими комплементарность (CDRs), или гипервариабельными областями, в вариабельных доменах как лёгкой, так и тяжёлой цепи. Наиболее высококонсервативные участки вариабельных доменов называются каркасной областью (FR). Вариабельные домены нативной тяжёлой и лёгкой цепей, каждый, содержат четыре FR области, как правило, принимающие β -складчатую конфигурацию, связанную тремя CDRs, которые образуют петли, связывающие β -складчатую структуру, а в некоторых случаях образующие часть β -складчатой структуры. CDRs в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости с помощью FR областей и при использовании CDRs из другой цепи способствуют образованию антигенсвязывающего сайта антител (см. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991)). Константные домены не включены непосредственно в связывание антитела с антигеном, но выполняют различные эффекторные функции, например, такие как участие антитела в антителозависимой клеточной токсичности. Выражения "нумерация остатков вариабельного домена согласно Kabat" или "нумерация положений аминокислотных остатков по Kabat" и их варианты относятся к системе нумерации, применяемой для вариабельных доменов тяжёлой цепи или вариабельных доменов лёгкой цепи при составлении (создании) антител и описанной в публикации Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). При использовании этой системы нумерации действительная линейная аминокислотная последовательность может содержать меньше аминокислот или дополнительные аминокислоты, что соответствует укорочению или inserции в FR или CDR вариабельного домена. Например, вариабельный домен тяжёлой цепи может включать inserцию одной аминокислоты (остаток 52a согласно Kabat) после остатка 52 H2 и встроенные остатки (например, остатки 82a, 82b и 82c и т.д., согласно Kabat) после остатка 82 FR тяжёлой цепи. Нумерацию остатков по Kabat для данного антитела можно определить выравниванием в областях гомологии последовательности антитела со "стандартной" последовательностью с нумерацией по Kabat. Не предполагается, что CDRs по настоящему изобретению обязательно соответствует условиям нумерации по Kabat.

В данном контексте термин (выражение) "процент (%)" идентичности аминокислотной последова-

тельности" применительно к последовательности определяется как процентное содержание (относительное количество) аминокислотных остатков в кандидатной последовательности, идентичных аминокислотным остаткам в специфической (конкретной) последовательности, после выравнивания последовательностей и введения гэпов, при необходимости, для достижения максимальной идентичности последовательностей в процентах, и при этом какие-либо консервативные замены не рассматриваются как часть идентичности последовательностей. Выравнивание аминокислотных последовательностей с целью определения их процентной идентичности можно осуществлять различными способами, известными специалистам в данной области, например, используя общедоступную компьютерную программу, такую как BLAST, BLAST-2, ALIGN, или программу Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области могут определить подходящие параметры для количественного определения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей.

В данном контексте термин "период полувыведения" употребляется в его общепринятом смысле, как это описано в публикации Goodman and Gillman's *The Pharmaceutical Basis of Therapeutics* 21-25 (Alfred Goodman Gilman, Louis S. Goodman, and Alfred Gilman, eds., 6th ed. 1980). Коротко говоря, предполагается, что термин охватывает количественное определение динамики выведения лекарства. Выведение (элиминация) большинства лекарств происходит по экспоненте (т.е. следует кинетике реакций первого порядка), поскольку концентрации лекарства не приближаются к концентрациям, необходимым для насыщения процесса исчезновения (удаления из организма). Скорость экспоненциального процесса может быть выражена его константной скоростью, k , которая показывает относительное изменение в единицу времени, или его полупериодом, $t_{1/2}$, временем, необходимым для завершения процесса на 50%. Единицами измерения этих констант являются время^{-1} и время, соответственно. Константа скорости реакции первого порядка и полупериод реакции связаны простым уравнением ($k \times t_{1/2} = 0,693$), и, соответственно, могут заменяться. Так как кинетика элиминации (удаления) первого порядка предписывает, что в единицу времени теряется постоянная доля лекарства, то кривая зависимости \log концентрации лекарства от времени является линейной всё время (непрерывно) после фазы начального распределения (т.е. после завершения абсорбции и распределения лекарственного средства). Период полувыведения лекарства можно точно определить на основании этого графика.

В данном контексте термин "аффинность связывания" относится к аффинности белков, описанных в настоящей заявке, к их связывающим мишеням и выражается количественно с использованием значений " K_d ". Если указано, что у двух или более белков аффинности связывания с их мишенями сравнимы, тогда значения K_d в отношении связывания соответствующих белков с их мишенями находятся в пределах $\pm 2^x$ -кратного интервала относительно друг друга. Если указано, что у двух или более белков аффинности связывания с одной единственной мишенью сравнимы, тогда значения K_d в отношении связывания соответствующих белков с единственной указанной мишенью находятся в пределах $\pm 2^x$ -кратного интервала относительно друг друга. Если указано, что белок связывает две или более мишеней со сравнимыми аффинностями связывания, тогда значения K_d в отношении связывания указанного белка с двумя или более мишенями находятся в пределах $\pm 2^x$ -кратного интервала относительно друг друга. В принципе более высокое значение K_d соответствует более слабому связыванию. Согласно некоторым вариантам величину " K_d " определяют анализом связывания с антигеном, меченым радиоактивным изотопом (RIA), или методом поверхностного плазмонного резонанса с использованием биосенсора VIAcore™-2000 или VIAcore™-3000 (VIAcore, Inc., Piscataway, N.J.). Согласно некоторым вариантам "скорость образования", или "скорость ассоциации", или " k_{on} " (" k_{on} ") и "скорость диссоциации", или " k_{off} " (" k_{off} ") также определяют методом поверхностного плазмонного резонанса с использованием биосенсора VIAcore™-2000 или VIAcore™-3000 (VIAcore, Inc., Piscataway, N.J.). Согласно другим вариантам " K_d ", " k_{on} " и " k_{off} " количественно определяют, используя системы Octet® Systems (Pall Life Sciences).

В настоящем изобретении описываются однодоменные белки, связывающие сывороточный альбумин, фармацевтические композиции, а также нуклеиновые кислоты, рекомбинантные экспрессионные векторы и клетки-хозяева для получения таких однодоменных белков, связывающих сывороточный альбумин. Также предусматриваются способы применения раскрываемых однодоменных белков, связывающих сывороточный альбумин, для предупреждения и/или лечения заболеваний, патологических состояний и нарушений. Однодоменные белки, связывающие сывороточный альбумин, способны специфически связываться с сывороточным альбумином. Согласно некоторым вариантам однодоменные белки, связывающие сывороточный альбумин, включают дополнительные домены, такие как CD3 связывающий домен, а также связывающие домены для других целевых антигенов.

Однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин В настоящем изобретении рассматриваются однодоменные белки, связывающие сывороточный альбумин. Сывороточный альбумин вырабатывается в печени, встречается растворённым в плазме крови и является наиболее распространённым белком крови у млекопитающих. Альбумин имеет важное значение для поддержания онкотического давления, необходимого для адекватного распределения жидкостей в организме между кровеносными сосудами и тканями тела; без альбумина высокое давление в кровеносных сосудах вытесняло бы больше

жидкостей в ткани. Альбумин также ведёт себя в плазме как носитель посредством неспецифического связывания некоторых гидрофобных стероидных гормонов, и как транспортный белок для гемина и жирных кислот. Человеческий сывороточный альбумин (HSA) (молекулярная масса ~67 кДа) является преобладающим белком в плазме, присутствует в концентрации около 50 мг/мл (600 мкМ) и имеет период полувыведения (время полужизни) в организме человека около 20 дней. HSA служит для поддержания рН плазмы крови, вносит вклад в коллоидно-осмотическое давление крови, функционирует как носитель многих метаболитов и жирных кислот и служит в качестве основного транспортного белка для лекарственных веществ в плазме крови. Согласно некоторым вариантам однодоменные белки, связывающие сывороточный альбумин, связываются с HSA. Согласно некоторым вариантам однодоменные белки, связывающие сывороточный альбумин, связываются с сывороточным белком-сывороточным альбумином яванского макака. Согласно некоторым вариантам однодоменные белки, связывающие сывороточный альбумин, связываются с белком HSA и с сывороточным альбумином яванского макака. Согласно некоторым вариантам однодоменные белки, связывающие сывороточный альбумин, также связываются с мышинным сывороточным белком альбумином. Согласно некоторым вариантам аффинность связывания в отношении мышинного сывороточного альбумина от около 1,5 раз до около 20 раз слабее, чем в отношении сывороточного альбумина человека или яванского макака.

Нековалентная ассоциация с альбумином продлевает период полувыведения короткоживущих белков. Например, рекомбинантное слияние альбуминсвязывающего домена с Fab фрагментом приводило в результате к снижению *in vivo* клиренса в 25- и в 58 раз, а продления полужизни в 26- и в 37 раз при внутривенном введении мышам и кроликам, соответственно, по сравнению с введением одного Fab фрагмента. В другом примере, когда инсулин ацилировали жирными кислотами с целью инициировать ассоциацию с альбумином, то наблюдали эффект пролонгирования при введении кроликам или свиньям с помощью подкожной инъекции. Все вместе эти исследования демонстрируют взаимосвязь между связыванием альбумина и пролонгированным действием /временем полужизни в сыворотке крови.

Согласно некоторым вариантам однодоменные белки, связывающие сывороточный альбумин, по настоящему изобретению представляют собой однодоменное антитело, например, такое как вариабельный домен тяжёлой цепи (VH), вариабельный домен (VHH) sdAb (одAb) камелидов, лиганд или низкомолекулярная частица, специфическая к сывороточному альбумину. Согласно некоторым вариантам однодоменные белки, связывающие сывороточный альбумин, по настоящему изобретению представляют собой однодоменное антитело, например, такое как вариабельный домен тяжёлой цепи (VH), вариабельный домен (VHH) sdAb (одAb) камелидов, лиганд или низкомолекулярная частица, специфическая к HSA. Согласно некоторым вариантам домен, связывающий сывороточный альбумин, связывающего сывороточный альбумин однодоменного белка по настоящему описанию представляет собой любой домен, который связывается с сывороточным альбумином, включая, но без ограничения, домены из моноклонального антитела, поликлонального антитела, рекомбинантного антитела, человеческого антитела, гуманизированного антитела. Согласно некоторым вариантам домен, связывающий сывороточный альбумин, представляет собой однодоменное антитело. Согласно другим вариантам домен, связывающий сывороточный альбумин, представляет собой пептид. Согласно другим вариантам домен, связывающий сывороточный альбумин, представляет собой а малую молекулу (низкомолекулярное соединение). Предполагается, что однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, является весьма малым и имеет протяжённость не более 25 кДа, не более 20 кДа, не более 15 кДа или не более 10 кДа в некоторых вариантах. В некоторых случаях однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, имеет протяжённость 5 кДа или менее, если это пептид или низкомолекулярная частица.

Согласно некоторым вариантам связывающий сывороточный альбумин однодоменный белок по настоящему описанию представляет собой домен с пролонгированным временем полужизни, который обеспечивает изменённую фармакодинамику и фармакокинетику самого однодоменного белка, связывающего сывороточный альбумин. Как указано выше, домен, продлевающий время полужизни, продлевает период полувыведения. Домен, продлевающий время полужизни, также изменяет фармакодинамические свойства, включая изменение распределения в тканях, проникновения в ткани и диффузии в тканях связывающего сывороточный альбумин однодоменного белка. Согласно некоторым вариантам пролонгирование времени полужизни обеспечивает улучшенное целенаправленное воздействие на ткани (включая опухоль), улучшенное распределение в тканях, проникновение в ткани, диффузию внутри ткани и повышенную эффективность по сравнению с белком без домена, пролонгирующего время полужизни. Согласно одному варианту в терапевтических методах рационально и эффективно используется пониженное количество однодоменного белка, связывающего сывороточный альбумин, что в результате приводит к снижению побочных эффектов, например, к снижению цитотоксичности в отношении неопухолевых клеток.

Далее, аффинность связывания однодоменного белка, связывающего сывороточный альбумин, в отношении его связывающей мишени можно выбрать таким образом, чтобы воздействовать на конкретное время полувыведения в конкретном однодоменном белке, связывающем сывороточный альбумин. Так, согласно некоторым вариантам однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, имеет высокую аффинность связывания (средство к связыванию) в отношении связывающей его мишени. Со-

гласно другим вариантам однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин имеет среднюю аффинность связывания в отношении связывающей его мишени. Согласно другим вариантам однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, имеет низкую или предельно низкую аффинность связывания в отношении связывающей его мишени. Представленные в качестве примера значения аффинности связывания включают K_D 10 нМ или менее (высокая), между 10 нМ и 100 нМ (средняя) и выше 100 нМ (низкая). Как указано выше, аффинность связывания однодоменных белков, связывающих сывороточный альбумин, в отношении связывающих мишеней определяют известными методами, например, такими как поверхностный плазмонный резонанс (SPR).

Согласно некоторым вариантам связывающий сывороточный альбумин однодоменный белок, раскрываемый в настоящем изобретении, связывается с HSA с величиной K_d для человеческого SA (hKd). Согласно некоторым вариантам связывающий сывороточный альбумин однодоменный белок, раскрываемый в настоящем изобретении, связывается с сывороточным альбумином яванского макака с K_d для SA яванского макака (сKd). Согласно некоторым вариантам связывающий сывороточный альбумин однодоменный белок, раскрываемый в настоящем изобретении, связывается с сывороточным альбумином яванского макака с K_d для SA яванского макака (сKd), а с HSA с K_d для HSA (hKd). Согласно некоторым вариантам значения hKd находятся в пределах между 1 нМ и 100 нМ. Согласно некоторым вариантам значения hKd находятся в пределах между 1 нМ и 10 нМ. Согласно некоторым вариантам значения сKd находятся в пределах между 1 нМ и 100 нМ. Согласно некоторым вариантам значения сKd находятся в пределах между 1 нМ и 10 нМ. Согласно некоторым вариантам значения hKd и сKd находятся в пределах между около 1 нМ и около 5 нМ или между около 5 нМ и 10 нМ. Согласно некоторым вариантам однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, связывается с сывороточным альбумином, выбранным из человеческого сывороточного альбумина, сывороточного альбумина яванского макака и мышинового сывороточного альбумина. Согласно некоторым вариантам однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, связывается с человеческим сывороточным альбумином, сывороточным альбумином яванского макака и мышинным сывороточным альбумином со сравнимой аффинностью связывания (K_d). Согласно некоторым вариантам однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, связывается с человеческим сывороточным альбумином с величиной K_d для человеческого SA (hKd) между, примерно, 1 нМ и около 10 нМ, а с сывороточным альбумином яванского макака с K_d для SA яванского макака (сKd) между 1 нМ и 10 нМ. Согласно некоторым вариантам однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, связывается с мышинным сывороточным альбумином с K_d для мышинового SA (mKd) между около 10 нМ и около 50 нМ.

Согласно некоторым вариантам величина hKd составляет около 1.5 нМ, около 1.6 нМ, около 1.7 нМ, около 1.8 нМ, около 1.9 нМ, около 2 нМ, около 2.1 нМ, около 2.2 нМ, около 2.3 нМ, около 2.4 нМ, около 2.5 нМ, около 2.6 нМ, около 2.7 нМ, около 2.8 нМ, около 2.9 нМ, около 3 нМ, около 3.1 нМ, около 3.2 нМ, около 3.3 нМ, около 3.4 нМ, около 3.5 нМ, около 3.6 нМ, около 3.7 нМ, около 3.8 нМ, около 3.9 нМ, около 4 нМ, около 4.5 нМ, около 5 нМ, около 6, около 6.5 нМ, около 7 нМ, около 7.5 нМ, около 8 нМ, около 8.5 нМ, около 9.0 нМ, около 9.5 нМ или около 10 нМ.

Согласно некоторым вариантам величина сKd составляет около 1.5 нМ, около 1.6 нМ, около 1.7 нМ, около 1.8 нМ, около 1.9 нМ, около 2 нМ, около 2.1 нМ, около 2.2 нМ, около 2.3 нМ, около 2.4 нМ, около 2.5 нМ, около 2.6 нМ, около 2.7 нМ, около 2.8 нМ, около 2.9 нМ, около 3 нМ, 3.1 нМ, около 3.2 нМ, около 3.3 нМ, около 3.4 нМ, около 3.5 нМ, около 3.6 нМ, около 3.7 нМ, около 3.8 нМ, около 3.9 нМ, около 4 нМ, около 4.5 нМ, около 5 нМ, около 6, около 6.5 нМ, около 7 нМ, около 7.5 нМ, около 8 нМ, около 8.5 нМ, около 9.0 нМ, около 9.5 нМ или около 10 нМ.

Согласно некоторым вариантам величина mKd составляет около 10 нМ, около 11 нМ, около 12 нМ, около 13 нМ, около 14 нМ, около 15 нМ, около 16 нМ, около 17 нМ, около 18 нМ, около 19 нМ, около 20 нМ, около 21 нМ, около 22 нМ, около 23 нМ, около 24 нМ, около 25 нМ, около 26 нМ, около 27 нМ, около 28 нМ, около 29 нМ, около 30 нМ, около 31 нМ, около 32 нМ, около 33 нМ, около 34 нМ, около 35 нМ, около 36 нМ, около 37 нМ, около 38 нМ, около 39 нМ, около 40 нМ, около 41 нМ, около 42 нМ, около 43 нМ, около 44 нМ, около 45 нМ, около 46 нМ, около 47 нМ, около 48 нМ или около 50 нМ.

Согласно некоторым вариантам однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27.

Согласно некоторым вариантам однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, имеет аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 4, и значения hKd и сKd между около 1 нМ и около 5 нМ. Согласно некоторым вариантам однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, имеет аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 4, и значение hKd около 2.3 нМ и значение сKd около 2.4 нМ. Согласно некоторым вариантам однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, имеет аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 25, и значения hKd и сKd между около 1 нМ и около 5 нМ. Согласно некоторым вариантам однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, имеет аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 25, а значение hKd около 2.1 нМ и значение сKd около 2.2 нМ. Согласно некоторым вариантам однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин,

включает CD3 γ (гамма) цепь, CD3 δ (дельта) цепь и две CD3 ϵ (эпсилон) цепи, которые находятся на поверхности клетки. CD3 ассоциируется с α (альфа) и β (бета) цепями Т-клеточного рецептора (TCR), равно как и CD3 ζ , (дзета), в целом составляя Т-клеточный рецепторный комплекс. Кластеризация CD3 на Т клетках, например, с использованием анти-CD3 антител, приводит к активации Т клеток, аналогичной включению Т-клеточного рецептора, но независимой от свойственной клону специфичности.

Согласно одному аспекту в данной заявке описывается мультиспецифичный белок, содержащий связывающий сывороточный альбумин однодоменный белок по настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам мультиспецифичный белок содержит также домен, который специфически связывается с CD3. Согласно некоторым вариантам мультиспецифичный белок содержит также домен, который специфически связывается с человеческим CD3. Согласно некоторым вариантам мультиспецифичный белок содержит также домен, который специфически связывается с CD3 γ . Согласно некоторым вариантам мультиспецифичный белок содержит также домен, который специфически связывается с CD3 δ . Согласно некоторым вариантам мультиспецифичный белок содержит также домен, который специфически связывается с CD3 ϵ .

Согласно дополнительным вариантам мультиспецифичный белок содержит также домен, который специфически связывается с Т-клеточным рецептором (TCR). Согласно некоторым вариантам мультиспецифичный белок содержит также домен, который специфически связывает α цепь TCR. Согласно некоторым вариантам мультиспецифичный белок содержит также домен, который специфически связывает β цепь TCR.

Согласно некоторым вариантам CD3-связывающий домен мультиспецифичного белка, содержащего связывающий сывороточный альбумин однодоменный белок по настоящему изобретению, проявляет не только высокую CD3-связывающую аффинность в отношении человеческого CD3, но также прекрасную перекрёстную реактивность в отношении соответствующих CD3 белков яванского макака. В некоторых случаях CD3-связывающий домен мультиспецифичных белков проявляет перекрёстную реактивность в отношении CD3 яванского макака. В некоторых случаях соотношения K_D человека: яванского макака (hKd:cKd) для CD3-связывания находятся в интервале между 20:1 и 1:2.

Согласно некоторым вариантам CD3-связывающий домен мультиспецифичного белка, содержащего однодоменный белок, по настоящему описанию может представлять собой любой домен, который связывается с CD3, включая, но без ограничения, домены из моноклонального антитела, поликлонального антитела, рекомбинантного антитела, человеческого антитела, гуманизированного антитела, или антигенсвязывающие фрагменты CD3-связывающих антител, таких как однодоменные антитела (sdAb), Fab, Fab', F(ab) $_2$ и Fv фрагменты, состоящие из одной или более областей CDRs, одноцепочечные антитела (например, одноцепочечные Fv фрагменты (scFv)), стабилизированные дисульфидным мостиком (дисульфидной связью) (dsFv) Fv фрагменты, антитела-гетероконъюгаты (например, биспецифичные антитела), pFv фрагменты, мономеры или димеры тяжёлых цепей, мономеры или димеры лёгких цепей, и димеры, состоящие из одной тяжёлой и одной лёгкой цепи. В некоторых случаях предпочтительно, чтобы CD3-связывающий домен был получен из того же вида, в котором в конечном счёте будет использоваться мультиспецифичный белок, содержащий связывающий сывороточный альбумин однодоменный белок. Например, для применения на людях может быть предпочтительно, чтобы CD3-связывающий домен мультиспецифичного белка, содержащего однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, по настоящему изобретению, содержал остатки антигенсвязывающего домена человеческого или гуманизированного антитела или фрагмента антитела.

Так, в одном аспекте антигенсвязывающий домен содержит гуманизированное или человеческое антитело или фрагмент гуманизированного или человеческого антитела, или мышинное антитело или фрагмент мышинного антитела. Согласно одному варианту гуманизированный или человеческий анти-CD3 связывающий домен (CD3-связывающий домен антитела к CD3) содержит одну или более (например, все три) области лёгкой цепи, определяющие комплементарность: определяющую комплементарность область лёгкой цепи 1 (LC CDR1), определяющую комплементарность область лёгкой цепи 2 (LC CDR2) и определяющую комплементарность область лёгкой цепи 3 (LC CDR3) гуманизированного или человеческого анти-CD3-связывающего домена по настоящему описанию, и/или одну или более (например, все три) области тяжёлой цепи, определяющие комплементарность: определяющую комплементарность область тяжёлой цепи 1 (HC CDR1), определяющую комплементарность область тяжёлой цепи 2 (HC CDR2), и определяющую комплементарность область тяжёлой цепи 3 (HC CDR3) гуманизированного или человеческого анти-CD3-связывающего домена по настоящему описанию, например, гуманизированного или человеческого анти-CD3-связывающего домена, содержащего одну или более, например, все три области LC CDRs и одну или более, например, все три области HC CDRs.

Согласно некоторым вариантам гуманизированный анти-CD3-связывающий домен содержит варируемую область гуманизированной или человеческой лёгкой цепи, специфическую к CD3, при этом варируемая область лёгкой цепи, специфическая к CD3, содержит CDRs человеческой или нечеловеческой лёгкой цепи в каркасной области лёгкой цепи. В некоторых случаях каркасная область лёгкой цепи

представляет собой каркасную область лёгкой цепи λ (лямбда). В других случаях каркасная область лёгкой цепи представляет собой каркасную область лёгкой цепи κ (каппа).

Согласно некоторым вариантам гуманизованный или человеческий анти-CD3-связывающий домен содержит вариабельную область гуманизованной или человеческой тяжёлой цепи, специфичную к CD3, причём вариабельная область тяжёлой цепи, специфичная к CD3, содержит человеческие или нечеловеческие CDRs в каркасной области тяжёлой цепи.

В некоторых случаях определяющие комплементарность области (участки) тяжёлой цепи и/или лёгкой цепи получены из известных анти-CD3 антител, например, таких как муромонаб-CD3 (ОКТ3), отеликсизумаб (TRX4), теплизумаб (MGA031), висилизумаб (Nuvion), SP34, TR-66 или X35-3, VIT3, BMA030 (BW264/56), CLB-T3/3, CRIS7, YTH12.5, F111-409, CLB-T3.4.2, TR-66, WT32, SPv-T3b, 11D8, XIII-141, XIII-46, XIII-87, 12F6, T3/RW2-8C8, T3/RW2-4B6, ОКТ3D, M-T301, SMC2, F101.01, UCHT-1 HWT-31.

Аффинность связывания (сродство к связыванию) с CD3 можно определять, например, способностью мультиспецифичного белка, содержащего сам однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, или его CD3-связывающий домен, связываться с CD3, нанесённым на аналитический планшет; экспонированным на поверхности микробной клетки; в растворе; и т.д. Связывающую активность мультиспецифичного белка, содержащего сам однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, или его CD3-связывающий домен, согласно настоящему изобретению, с CD3, можно анализировать посредством иммобилизации лиганда (например, CD3), или самого указанного мультиспецифичного белка, или его CD3-связывающего домена на (в) грануле (бусах), субстрате, клетке и т.д. Агенты можно добавлять в соответствующем буфере, а партнёры по связыванию инкубировать в течение некоторого периода времени при данной температуре. После отмывок для удаления несвязанного материала связанный белок можно высвободить с использованием, например, SDS, буферов с высоким pH и т.п. и анализировать, например, методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

Домен, связывающий целевой антиген.

Помимо описанных связывающих сывороточный альбумин и CD3 доменов мультиспецифичный связывающий белок, содержащий связывающие сывороточный альбумин однодоменные белки по настоящему описанию, в некоторых вариантах содержит также домен, который связывается с целевым антигеном. Целевой антиген играет активную роль в заболевании, нарушении или патологическом состоянии и/или связан с ними. В частности, целевой антиген связан с (обусловлен) пролиферативным заболеванием, опухолевым заболеванием, воспалительным заболеванием, иммунологическим нарушением, аутоиммунным заболеванием, инфекционным заболеванием, вирусным заболеванием, аллергической реакцией, паразитарной (инвазионной) реакцией, болезнью трансплантат-против-хозяина и болезнью хозяин-против-трансплантата. Согласно некоторым вариантам целевой антиген представляет собой опухолевый антиген, экспрессируемый на опухолевой клетке. Или же, согласно некоторым вариантам целевой антиген ассоциирован с патогеном, таким как вирус или бактерия.

Согласно некоторым вариантам целевой антиген представляет собой молекулу клеточной поверхности, например, такую как белок, липид или полисахарид. Согласно некоторым вариантам целевой антиген находится на опухолевой клетке; клетке, инфицированной вирусом; клетке, инфицированной бактерией; поражённом эритроците; клетке атеросклеротической бляшки; или клетке фиброзной ткани.

Дизайн мультиспецифичных связывающих белков, содержащих однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, по настоящему изобретению, способствует тому, чтобы домен, связывающий с целевым антигеном, был гибким в том смысле, что домен, связывающий с целевым антигеном, может быть связывающим доменом любого типа, включая, но без ограничения, домены из моноклонального антитела, поликлонального антитела, рекомбинантного антитела, человеческого антитела, гуманизованного антитела. Согласно некоторым вариантам домен, связывающий с целевым антигеном, представляет собой одноцепочечные фрагменты вариабельного домена (scFv), однодоменное антитело, например, вариабельный домен тяжёлой цепи (VH), вариабельный домен лёгкой цепи (VL) и вариабельный домен (VHH) sdAb (одAb) камелидов. Согласно другим вариантам домен, связывающий с целевым антигеном, представляет собой не-Ig связывающий домен, а именно, миметик антитела, например, такой как антикалина, аффилины, молекулы аффител (Affibody®, аффибоди), аффимеры, аффитины, "альфатела", авимеры, дарпины, финомеры, пептиды домена Куница и монотела. Согласно другим вариантам домен, связывающий с целевым антигеном, представляет собой лиганд или пептид, который связывается или ассоциируется с целевым антигеном. Согласно другим вариантам домен, связывающий с целевым антигеном, представляет собой ноттин. Согласно другим вариантам домен, связывающий с целевым антигеном, представляет собой низкомолекулярную частицу.

Модификации однодоменного белка, связывающего сывороточный альбумин.

Однодоменные белки, связывающие сывороточный альбумин, по настоящему изобретению, охватывают производные или аналоги, в которых (i) аминокислота заменена на аминокислотный остаток, который не является аминокислотным остатком, кодируемым генетическим кодом, (ii) зрелый полипептид слит с другим соединением, таким как полиэтиленгликоль, или (iii) дополнительные кислоты слиты с

белком, таким как лидерная или секреторная последовательность или последовательность для блокады иммуногенного домена и/или для очистки белка.

Типичные модификации включают, но без ограничения, ацетилирование, ацилирование, ADP-рибозилирование, амидирование, ковалентное связывание флавина, ковалентное связывание частицы гема, ковалентное связывание нуклеотида или производного нуклеотида, ковалентное связывание липида или производного липида, ковалентное присоединение фосфатидилинозитола, перекрёстное связывание (сшивание), циклизацию, образование дисульфидной связи (дисульфидного мостика), деметилирование, образование ковалентных перекрёстных связей, образование цистина, образование пироглутамата, формилирование, гамма-карбоксилирование, гликозилирование, образование GPI (ГФИ)-якоря, гидрокселирование, иодирование, метилирование, миристилирование, окисление, протеолитический процессинг, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, селеноилирование, сульфатирование, опосредованное ТРНК присоединение аминокислот к белкам, например, аргинилирование и убиквитинирование.

Модификации делают в любом месте в связывающих сывороточный альбумин однодоменных белках по настоящему описанию, включая пептидный скелет, боковые цепи аминокислот и amino- или карбокси-концы. Некоторые общие модификации пептидов, применимые для модификации однодоменных белков, связывающих сывороточный альбумин, включают гликозилирование, присоединение липидов, сульфатирование, гамма-карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты, гидрокселирование, блокировку (защиту) amino- или карбоксильной группы, или и той, и другой, в полипептиде с помощью ковалентной модификации, и ADP-рибозилирование.

Полинуклеотиды, кодирующие однодоменные белки, связывающие сывороточный альбумин.

Согласно некоторым вариантам в изобретении предусматриваются молекулы полинуклеотидов, кодирующие связывающий сывороточный альбумин однодоменный белок по настоящему описанию. Согласно некоторым вариантам молекулы полинуклеотидов предусматриваются в виде конструкции ДНК. Согласно другим вариантам молекулы полинуклеотидов предусматриваются в виде транскрипта мРНК (иРНК).

Молекулы полинуклеотидов конструируют известными методами, например, соединяя гены, кодирующие три связывающих домена, либо разделённые пептидными линкерами, либо, согласно другим вариантам, непосредственно связанные пептидной связью в единую генетическую конструкцию, функционально связанную с подходящим промотором и, необязательно, с подходящим терминатором транскрипции, и экспрессируя её в бактериях или в другой подходящей экспрессионной системе, например, такой как СНО клетки.

Согласно некоторым вариантам в изобретении также предусматриваются молекулы полинуклеотидов, кодирующие мультиспецифичный связывающий белок, содержащий однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, по настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам полинуклеотид, кодирующий указанный мультиспецифичный связывающий белок, также включает последовательность, кодирующую CD3-связывающий домен. Согласно некоторым вариантам полинуклеотид, кодирующий указанный мультиспецифичный связывающий белок, также включает последовательности, кодирующие домен, связывающий целевой антиген. Согласно некоторым вариантам полинуклеотид, кодирующий указанный мультиспецифичный связывающий белок, также включает последовательности, кодирующие CD3-связывающий домен и домен, связывающий целевой антиген. Согласно некоторым вариантам молекулы полинуклеотидов предусматриваются в виде конструкции ДНК. Согласно другим вариантам молекулы полинуклеотидов в виде транскрипта мРНК. Согласно другим вариантам, в которых домен, связывающий целевой антиген, представляет собой малую молекулу, полинуклеотиды содержат гены, кодирующие домен, связывающий сывороточный альбумин, и CD3-связывающий домен. Согласно другим вариантам, в которых домен, пролонгирующий период полувыведения, представляет собой малую молекулу, полинуклеотиды содержат гены, кодирующие домены, которые связываются с CD3 и с целевым антигеном. В зависимости от используемых векторной системы и хозяина можно применять любое число подходящих элементов транскрипции и трансляции, включая конститутивные и индуцируемые промоторы. Промотор выбирают таким образом, чтобы он обуславливал экспрессию полинуклеотида в соответствующей клетке-хозяине.

Согласно некоторым вариантам полинуклеотид включают в вектор, предпочтительно, в экспрессионный вектор, который представляет собой другой вариант изобретения. Этот рекомбинантный вектор может быть сконструирован известными методами. Векторы, представляющие особый интерес, включают плазмиды, фагмиды, производные фагов, вирусы (например, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, герпесвирусы, лентивирусы и т.п.) и космиды.

Для включения и экспрессии полинуклеотида, кодирующего полипептид описанного однодоменного белка, связывающего сывороточный альбумин, могут быть использованы различные системы хозяин/вектор. Примером экспрессионных векторов для экспрессии в *E.coli* являются pSKK (Le Gall et al., *J Immunol Methods*. (2004) 285(1): 111-27), pcDNA5 (Invitrogen) для экспрессии в клетках млекопитающих, дрожжевые системы экспрессии PICHAPINK™ (Invitrogen), бакуловирусные системы экспрессии BACUVANCE™ Baculovims Expression System (GenScript).

Так, однодоменные белки, связывающие сывороточный альбумин, описанные в данной заявке, согласно некоторым вариантам получают путём включения вектора, кодирующего белок, как описано выше, в хозяйскую клетку, культивирования указанной хозяйской клетки в условиях, когда экспрессируются белковые домены, и выделения и необязательной последующей очистки.

Получение однодоменных белков, связывающих сывороточный альбумин.

Согласно некоторым вариантам в данной заявке описан способ получения однодоменного белка, связывающего сывороточный альбумин. Согласно некоторым вариантам этот способ включает культивирование клетки-хозяина, трансформированной или трансфицированной вектором, включающим последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин в условиях, позволяющих экспрессировать белок, связывающий сывороточный альбумин, и выделение и очистку полученного белка из культуры.

Согласно дополнительному варианту предусмотрен способ, направленный на улучшение одного или более свойств, например, аффинности, стабильности, переносимости высокой температуры, перекрёстной реактивности и т. д., однодоменных белков, связывающих сывороточный альбумин и/или мультиспецифичных связывающих белков, включающих однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, описанный в данной заявке, по сравнению с референсным связывающим соединением. Согласно некоторым вариантам предусмотрена совокупность библиотек с одной заменой, каждая из которых соответствует другому домену или аминокислотному сегменту однодоменного белка, связывающего сывороточный альбумин, или референсному связывающему соединению, для того, чтобы каждый член библиотеки одной замены кодировал только одно аминокислотное изменение в соответствующем домене или аминокислотном сегменте. (Это даёт возможность зондировать с помощью нескольких небольших библиотек все потенциальные замены в белке большого размера или в сайте связывания белка.) Согласно некоторым вариантам множество доменов образует или покрывает непрерывную последовательность аминокислот однодоменного белка, связывающего сывороточный альбумин, или референсного связывающего соединения. Нуклеотидные последовательности разных библиотек с одной заменой перекрываются с нуклеотидными последовательностями по меньшей мере одной другой библиотеки с одной заменой. Согласно некоторым вариантам совокупность библиотек с одной заменой конструируют таким образом, что каждый член перекрывает каждый член каждой библиотеки с одной заменой, кодирующий прилегающий домен.

Связывающие соединения, экспрессированные из таких библиотек с одной заменой выбираются отдельно для получения ряда вариантов в каждой библиотеке, которые имеют свойства, по меньшей мере такие же хорошие, как свойства референсного связывающего соединения и чья полученная библиотека уменьшена по размеру (то есть, количество нуклеиновых кислот, кодирующих выбранный ряд связывающих соединений, меньше, чем количество нуклеиновых кислот, кодирующих члены исходной библиотеки с одной заменой). Такие свойства включают, но без ограничения, аффинность к соединению-мишени, стабильность по отношению к различным условиям, таким как нагрев, высокое или низкое значение pH, ферментное расщепление, перекрёстная реактивность в отношении других белков и т. д. Выбранные соединения из каждой библиотеки с одной заменой в данной заявке называются взаимозаменяемыми терминами "прекандидатное соединение" или "прекандидатный белок." Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующих прекандидатные соединения из отдельных библиотек с одной заменой, затем подвергаются шаффлингу методом ПЦР для генерирования библиотеки, подвергнутой шаффлингу, используя технику шаффлинга генов с использованием ПЦР (полимеразной цепной реакции).

Пример осуществления процесса скрининга описан в данной заявке. Библиотеки "прекандидатных" соединений генерируются из библиотек с одной заменой и выбираются для связывания с белком-мишенью (белками-мишенями), после чего проводят шаффлинг библиотек прекандидатов для получения библиотеки нуклеиновых кислот, кодирующих соединения-кандидаты, которые в свою очередь, клонируются в обычный экспрессионный вектор, например, в систему фагмидной экспрессии. Соединения-кандидаты, экспрессирующие фаги, затем подвергаются одному или более раундам селекции для улучшения желательных свойств, таких как сродство к связыванию молекулы-мишени. Молекулы-мишени могут быть адсорбированы или прикреплены другим образом к поверхности лунки или другого реакционного контейнера, или молекулы-мишени могут быть дериватизированы с помощью фрагмента связывания, такого как биотин, который после инкубации со связывающими соединениями-кандидатами может быть захвачен комплементарным фрагментом, таким как стрептавидин, связанным с гранулами, такими как магнитные гранулы, для промывки. Например, при проведении метода селекции связывающие соединения-кандидаты подвергаются продолжительной стадии промывки для того, чтобы были выбраны только соединения-кандидаты с очень низкими скоростями диссоциации из молекулы-мишени. Согласно таким вариантам время промывки, составляет, например, по меньшей мере 8 ч или согласно другим вариантам оно равно по меньшей мере 24 ч; или в соответствии с другими вариантами равно по меньшей мере 48 ч; или согласно другим вариантам равно по меньшей мере 72 ч. Выделенные клоны после селекции амплифицируют и подвергают дополнительному циклу селекции или анализируют, например, путём секвенирования и проведения сравнительных измерений аффинности связывания, например, методом ELISA, связывания, основанного на явлении поверхностного плазмонного резонанса, интерферометрии

биослоя (например, с применением системы Octet, ForteBio, Menlo Park, CA) или т. п. Согласно некоторым вариантам осуществляется процесс для идентификации одного или более однодоменных белков, связывающих сывороточный альбумин, и/или мультиспецифичного связывающего белка, включающего однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, с повышенной термостабильностью, улучшенной перекрёстной реактивностью по отношению к выбранному ряду связывающих мишеней по сравнению с показателями для референсного белка, связывающего сывороточный альбумин, такого как белок, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. Библиотеки с одной заменой получают, варьируя кодоны в VH области референсного белка, связывающего сывороточный альбумин, включая оба кодона в каркасных областях и в CDRs; согласно другому варианту локализации, где варьируются кодоны, включают CDRs тяжёлой цепи референсного белка, связывающего сывороточный альбумин, или ряд таких CDRs, например, только CDR1, только CDR2, только CDR3, их пары. Согласно другому варианту локализации, где варьируются кодоны, возникают только в каркасных областях. Согласно некоторым вариантам библиотека содержит единственные изменения кодонов из референсного белка, связывающего сывороточный альбумин, только в каркасных областях VH в количестве от 10 до 250. Согласно другому варианту локализации, где варьируются кодоны, включают CDR3s тяжёлой цепи референсного белка, связывающего сывороточный альбумин, или ряд таких CDR3s. Согласно другому варианту количество локаций, где варьируются кодоны кодирующих областей VH, находится в пределах от 10 до 250, например, до 100 локаций находятся в каркасной области. После получения библиотеки однократного действия, как описано выше, проводятся следующие стадии: (а) экспрессия отдельно каждого члена библиотеки с одной заменой как белка-прекандидата; (б) выбор членов каждой библиотеки с одной заменой, которые кодируют белки-прекандидаты, которые связываются с партнёром по связыванию, который может или не может отличаться от исходной связывающей мишени [например, желательной (ых) мишени (ей) перекрёстной реакции]; (с) проведение шаффлинга членов выбранных библиотек в ПЦР для получения комбинаторной библиотеки, подвергнутой шаффлингу; (d) экспрессия членов библиотеки, подвергнутой шаффлингу, как кандидатных белков, связывающих сывороточный альбумин; и (е) выбор членов библиотеки, подвергнутой шаффлингу, один или два раза для кандидатных белков, связывающих сывороточный альбумин, которые связываются с исходным партнёром по связыванию, и обязательно (f) последующий выбор белков-кандидатов для связывания с желательной(ых) мишенью (ями) перекрёстной реакции, тем самым обеспечивается белок, связывающий сывороточный альбумин, кодированный нуклеиновой кислотой с повышенной способностью к перекрёстной реакции для одного или более веществ в сравнении с референсным белком, связывающим сывороточный альбумин без потери аффинности у исходного лиганда. Согласно дополнительным вариантам можно осуществлять способ получения белка, связывающего сывороточный альбумин, с пониженной реактивностью к выбранному перекрёстно-реагирующему веществу(ам) или соединению(ям), или эпиптопу(ам) путём проведения стадии замены (f) с последующей стадией: извлечения связывающих соединений-кандидатов один или два раза из ряда кандидатов-белков, связывающих сывороточный альбумин, которые связываются с нежелательным перекрёстно-реагирующим соединением.

В появившихся в последнее время исследованиях сообщается, что во время получения, хранения и *in vivo* использования терапевтические антитела подвергаются опасности разложения через посредство ряда сигнальных путей. Среди наиболее часто возникающих реакций химического разложения белков находятся деамидирование остатков аспарагина (N) и изомеризация остатков аспартовой кислоты (D). В частности, появилась гипотеза, что, если остатки N и остатки D участвуют в распознавании антигена, их химическое изменение может привести к значительной потере активности. Известно, что остатки аспарагина и аспартовой кислоты имеют общий путь биодеградации, который проходит через образование циклического сукцинимидного интермедиата. Образование сукцинимидных интермедиатов и продукты их гидролиза (аспартат и изоаспартат), в сайтах аспартовой кислоты антитела представляют серьёзную проблему стабилизации. Когда происходит изомеризация, химическая структура антитела изменяется, что может привести к низкой стабильности, проявляющейся, например, в агрегации, в меньшем сроке годности. Соответственно, согласно некоторым вариантам настоящего изобретения предусмотрены однодоменные белки, связывающие сывороточный альбумин, в которых один или более остатков аспартовой кислоты является мутированным, при этом снижается возможность изомеризации однодоменного белка, связывающего сывороточный альбумин. Согласно некоторым вариантам остаток аспартовой кислоты находится в области CDR2 однодоменного белка, связывающего сывороточный альбумин, и остаток аспартовой кислоты мутирован с образованием глутаминовой кислоты. Согласно некоторым вариантам остаток аспартовой кислоты в положении 62 белка, представленного последовательностью SEQ ID NO: 10, мутирован в глутаминовую кислоту (D62E). Согласно некоторым вариантам аффинность связывания сывороточного альбумина однодоменного белка, связывающего сывороточный альбумин, содержащего мутацию D62E, не затронута мутацией. Согласно некоторым вариантам, однодоменные белки, связывающие сывороточный альбумин, с мутацией или без мутации D62E обладают сравнимой аффинностью связывания с сывороточным альбумином.

Фармацевтические композиции.

Согласно некоторым вариантам предусмотрены также фармацевтические композиции, содержащие

однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, описанный в данной заявке, вектор, включающий полинуклеотид, кодирующий полипептид однодоменных белков, связывающих сывороточный альбумин, или клетку-хозяин, трансформированную этим вектором, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель. Термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает, но без ограничения, любой носитель, который не влияет на эффективность биологической активности ингредиентов и который не является токсичным для пациента, которому он вводится. Примеры подходящих фармацевтических носителей хорошо известны из предшествующего уровня техники и включают физиологические растворы с фосфатным буфером, воду, эмульсии, такие как эмульсии масло-в-воде, различные виды смачивающих агентов, стерильные растворы и т. д. Такие носители могут быть введены обычными методами и могут быть применены для субъекта в подходящей дозе. Предпочтительно, чтобы композиции были стерильными. Эти композиции могут также содержать вспомогательные средства (адъюванты), такие как консерванты, эмульгирующие агенты и диспергирующие агенты. Предотвращение действия микроорганизмов может быть достигнуто за счёт включения различных антибактериальных и противогрибковых агентов.

В соответствии с некоторыми вариантами фармацевтических композиций однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, описанный в данной заявке, инкапсулируется в наночастицы. Согласно некоторым вариантам наночастицы представляют собой фуллерены, жидкие кристаллы, липосомы, квантовые точки, супер магнитные наночастицы, дендримеры или наностержни. Согласно другим вариантам фармацевтических композиций однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, прикреплен к липосомам. В некоторых случаях однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, является связанным с поверхностью липосомы. В некоторых случаях однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, инкапсулирован в оболочку липосомы. В некоторых случаях липосома представляет собой катионную липосому.

Однодоменные белки, связывающие сывороточный альбумин, описанные в данной заявке, предназначены для использования в качестве лекарственного средства. Введение осуществляется различными путями, например, путём внутривенного, внутрибрюшинного, подкожного, внутримышечного, топического или интратрансдермального введения. Согласно некоторым вариантам путь введения зависит от вида терапии и вида соединения, содержащегося в фармацевтической композиции. Режим дозирования будет определяться практикующим врачом и зависит от других клинических факторов. Дозирование для любого одного пациента зависит от многих факторов, включая массу пациента, площадь поверхности тела, возраст, пол, конкретное соединение, которое должно быть введено, время и путь введения, вид терапии, общее состояние здоровья и другие лекарства, которые вводятся совместно. Термин "эффективная доза" относится к количествам активного ингредиента, которые достаточны для влияния на ход течения и степень серьёзности заболевания, приводящие к уменьшению или ремиссии такой патологии, и эта доза может быть определена с использованием известных методов.

Способы лечения.

Согласно некоторым вариантам в данной заявке предусмотрены также способы и применение для стимуляции иммунной системы индивидуума, нуждающегося в этом, включающие введение однодоменного белка, связывающего сывороточный альбумин, или мультиспецифичного связывающего белка, включающего однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, описанный в данной заявке. В некоторых случаях введение однодоменного белка, связывающего сывороточный альбумин, описанного в данной заявке, индуцирует и/или поддерживает цитотоксичность в отношении клетки, экспрессирующей антиген-мишень. В некоторых случаях клетка, экспрессирующая антиген-мишень, является раковой или опухолевой клеткой, клеткой, заражённой вирусом, клеткой, заражённой фагом бактерии, аутореактивной Т- или В-клеткой, повреждёнными эритроцитами, артериальными бляшками или клетками фибротической ткани.

В данной заявке предусмотрены также способы и применение для лечения заболевания, расстройства или состояния, ассоциированных с антигеном-мишенью, включающие введение индивидууму, нуждающемуся в этом, однодоменного белка, связывающего сывороточный альбумин, или мультиспецифичного связывающего белка, включающего однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, описанный в данной заявке. Заболевания, расстройства или состояния, ассоциированные с антигеном-мишенью, включают, но без ограничения, вирусные инфекции, бактериальные инфекции, аутоиммунные заболевания, отторжение трансплантатов, атеросклероз или фиброз. Согласно другим вариантам заболевание, расстройство или состояние, ассоциированные с антигеном-мишенью, представляет собой пролиферативное заболевание, опухолевое заболевание, воспалительное заболевание, иммунологическое расстройство, аутоиммунное заболевание, инфекционное заболевание, вирусное заболевание, аллергическую реакцию, паразитарное (инвазивное) заболевание, реакцию трансплантат против хозяина или реакцию хозяин против трансплантата. Согласно одному из вариантов заболевание, расстройство или состояние, ассоциированные с антигеном-мишенью, представляет собой раковое заболевание. В одном случае рак является гематологическим раковым заболеванием. В другом случае рак представляет собой солидный рак.

Согласно некоторым вариантам используемые в данной заявке термины "лечение" или "терапия",

или "проведённое лечение" относятся к терапевтическому лечению, когда цель заключается в замедлении развития (уменьшении) нежелательного физиологического состояния, расстройства или заболевания, или в получении благоприятных или желательных клинических результатов. Для целей, описанных в данной заявке, благоприятные или желательные клинические результаты включают, но без ограничения, ослабление симптомов, уменьшение степени развития состояния, расстройства или заболевания; стабилизацию (то есть, не ухудшение) состояния, расстройства или заболевания; задержку начала или замедление прогрессирования состояния, расстройства или заболевания; улучшение состояния, степени расстройства или заболевания; и ремиссию (или частичную, или полную), выявляемые или не выявляемые, или улучшение болезненного состояния при наличии расстройства или заболевания. Лечение включает получение клинически значимого ответа без чрезмерного проявления побочных эффектов. Лечение включает также пролонгирование продолжительности жизни по сравнению с продолжительностью жизни без проведения лечения. Согласно некоторым вариантам используемые в данной заявке термины "лечение" или "терапия", или "проведённое лечение" относятся к профилактическим мерам, когда целью лечения являются задержка начала или уменьшение степени развития нежелательного физиологического состояния, расстройства или заболевания, например, когда субъект предрасположен к возникновению заболевания (например, индивидуум, у которого содержится генетический маркер заболевания, например, рака молочной железы).

Согласно некоторым вариантам способов, описанных в данной заявке, однодоменные белки, связывающие сывороточный альбумин, мультиспецифичный связывающий белок, включающий однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, описанный в данной заявке, вводятся в комбинации с агентом для лечения конкретных заболевания, расстройства или состояния. Такие агенты включают, но без ограничения, терапевтические антитела, малые молекулы (например, химиотерапевтические препараты), гормоны (стероидные, пептидные и т. п.), радиотерапевтические средства (γ -лучи, X-лучи и/или направленная доставка радиоизотопов, микроволны, УФ-облучение и т. п.), препараты генной терапии (например, антисмысловые, антиретровирусные препараты и т. п.) и другие иммунотерапевтические средства. Согласно некоторым вариантам однодоменные белки, связывающие сывороточный альбумин, мультиспецифичный связывающий белок, включающий однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, описанные в данной заявке, вводятся в комбинации с антидиарейными средствами, противорвотными средствами, анальгетиками, опиоидами и/или нестероидными противовоспалительными средствами. Согласно некоторым вариантам однодоменные белки, связывающие сывороточный альбумин (анти-HSA антитела), мультиспецифичный связывающий белок, включающий однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, описанные в данной заявке, вводятся до, во время или после хирургического вмешательства.

Примеры

Пример 1: Получение вариантов анти-HSA однодоменного антитела с эквивалентными связывающими свойствами по отношению к родительскому анти-HSA однодоменному антителу.

Характеристика родительского анти-HSA фага.

Специфичное связывание фага, несущего родительские антитела к HSA ("анти-HSA фага"), с HSA определяли, используя CD3 в качестве отрицательного контроля (фиг. 1) и перекрёстную реактивность "анти-HSA фага" в отношении сывороточного альбумина человека, сывороточного альбумина яванского макака и сывороточного альбумина мыши (фиг. 2).

Библиотеки HSA sdAb фагов с одной заменой.

Библиотека с одной заменой была создана для каждого из трёх доменов CDR. Библиотеки однократно были связаны с HSA и затем промыты буфером, содержащим различные уровни HSA. Фаги собирали через 0 и 24 ч и подсчитывали. Фаги, выбранные с использованием отмывки в течение 24 ч с помощью 2.5 мг/мл HSA в буфере, использовали для создания двух независимых комбинаторных фаговых библиотек.

Комбинаторные библиотеки фагов, несущих антитела к HSA.

MSA использовали как мишень селекции в первом раунде. Лунки промывали в течение 24 ч после связывания комбинаторного фага из двух независимых библиотек. HSA использовали как выбранную мишень во втором раунде. Лунки отмывали при помощи 1 мг/мл HSA в течение 24 ч после связывания обеих библиотек. Вставки, полученные методом ПЦР во втором раунде селекции, субклонировали в экспрессионный вектор ME10 His6 (6XHis, последовательность представлена как SEQ ID NO: 38). 96 клонов собирали, ДНК очищали, секвенировали и трансфицировали в клетки Expi293.

Определение аффинности связывания.

Для расчёта K_d к HSA и CSA с использованием платформы Octet применяли супернатанты. Девять клонов выбирали для дальнейшей характеристики (фиг. 3), основанной на величинах аффинности связывания по сравнению с родительским sdAb, а также получения, агрегации и профилей стабильности.

Пример 2: Фармакокинетика триспецифичного антитела, включающего однодоменное антитело к HSA (анти-HSA антитело).

Однодоменное антитело анти-HSA по примеру 1 использовали для получения триспецифичного антитела, которое оценивали для определения периода полувыведения при исследованиях на животных.

Триспецифичное антитело вводилось яванским макакам путём внутримышечной инъекции болюса 0.5 мг/кг. Другая группа яванских макак получала белок с размером, сравнимым с размером доменов, связывающих CD3 и CD20, но не проявляющий связывания с HSA. Третья и четвёртая группы получали антитело с CD3- и HSA-связывающими доменами и белок с CD20- и HSA-связывающими доменами, соответственно, при этом оба антитела были сравнимы по размеру с триспецифичным антителом. Каждая испытуемая группа состояла из 5 обезьян. Образцы сыворотки отбирали в указанные моменты времени, серийно разводили и определяли концентрацию белков с использованием связывания с CD3 и/или CD20 с использованием метода ELISA.

Фармакокинетический анализ осуществляли, используя концентрации испытуемого объекта в плазме крови. Усреднённые плазменные концентрации для групп при применении каждого объекта подтверждал мультиэкспоненциальный профиль в зависимости от времени после дозирования. Эти данные использовали в стандартной модели с двумя компартментами при введении болюса и при скоростях первого порядка для фаз распределения и выведения (элиминации). Общее уравнение для лучшего подбора данных в случае внутривенного введения имеет вид: $c(t) = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$, где $c(t)$ обозначает концентрацию в плазме в момент времени t , A и B обозначают отрезки на оси Y и α и β обозначают скорости первого порядка для фаз распределения и выведения, соответственно. α -Фаза представляет собой начальную фазу клиренса и отражает распределение белка во всех внеклеточных жидкостях животного, в то время как вторая или β -фаза кривой распада представляет отражение подлинного клиренса из плазмы. Методы подбора таких уравнений хорошо известны из предшествующего уровня техники. Например, $A = D/V(\alpha - k_{21})/(\alpha - \beta)$, $B = D/V(\beta - k_{21})/(\alpha - \beta)$, и α и β (для $\alpha > \beta$) являются корнями квадратного уравнения: $t^2 + (k_{12} + k_{21} + k_{10})t + k_{21}k_{10} = 0$ с использованием рассчитанных параметров: V = объём распределения, k_{10} = скорость выведения (элиминации), k_{12} = скорость перехода из компартмента 1 в компартмент 2 и k_{21} = скорость перехода из компартмента 2 в компартмент 1, и D = введённая доза.

Анализ данных: графики зависимости концентрации от временных профилей строят, используя программу KaleidaGraph (KaleidaGraph™ V. 3.09 Copyright 1986-1997. Synergy Software. Reading, Pa.). Величины, которые были меньше сообщаемых (LTR), не включены в анализ ПК (фармакокинетики) и не представлены графически. Фармакокинетические параметры определяли методом компартментального анализа с использованием компьютерной программы WinNonlin (WinNonlin® Professional V. 3.1 WinNonlin™ Copyright 1998-1999. Pharsight Corporation. Mountain View, Calif). Фармакокинетические параметры вычисляли, как описано в публикации Ritschel W A and Kearns G L, 1999, IN: Handbook Of Basic Pharmacokinetics Including Clinical Applications, 5th edition, American Pharmaceutical Assoc, Washington, D.C.

Ожидается, что триспецифичное антитело, включающее однодоменное антитело против HSA по примеру 1, обладает улучшенными фармакокинетическими параметрами, такими как увеличение периода элиминации по сравнению с белками, не содержащими HSA-связывающий домен.

Пример 3: Термостабильность вариантов однодоменного антитела против HSA (анти-HSA антитела).

Температура экспозиции белка в гидрофобных условиях (T_h) соответствует производной величине переломной точки кривой флуоресценции красителя и, как известно, коррелирует с температурой плавления (T_m), которая является мерой температурной стабильности белка. Цель этого исследования заключается в определении T_h для нескольких вариантов однодоменного антитела к HSA.

Получение белков.

Последовательности однодоменных антител к huALB клонировали в pcDNA3.4 (Invitrogen) после лидерной последовательности и затем вводили метку 6x гистидином (SEQ ID NO: 38). Клетки Expi293F (Life Technologies A14527) выдерживали в суспензии в Optimum Growth (Thomson) с плотностью между 0.2 и 8×10^6 клеток/мл в среде для клеток Expi. Очищенную плазмидную ДНК трансфицировали в клетки Expi293F с использованием протоколов набора Expi293 Expression System Kit (Life Technologies, A14635) и выдерживали в течение 4-6 дней после трансфекции. Кондиционированную среду частично очищали методом аффинной хроматографии с обессоливающей колонкой. Белковые антитела анти-huCD3e scFv концентрировали с помощью центрифугирования на центрифугах Amicon Ultra (EMD Millipore), помещали в среду для эксклюзионной хроматографии Superdex 200 (GE Healthcare) и разделяли в нейтральном буфере, содержащем эксципиенты. Пул фракций и конечную степень чистоты оценивали методами SDS-PAGE (электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия) и аналитической эксклюзионной хроматографии (SEC). Абсорбцию очищенных растворов белков определяли при длине волны 280 нм с использованием 96-луночных планшетов SpectraMax M2 (Molecular Devices) и УФ-прозрачных 96-луночных планшетов (Corning 3635) и концентрацию рассчитывали по коэффициентам молярной экстинкции (поглощения).

Дифференциальная сканирующая флуометрия.

Очищенные однодоменные белковые антитела к HSA разводили от 0.2 до 0.25 мг/мл вместе с оранжевым красителем 5x SYPRO (Life Technologies S6651) до 0.15% концентрации равной 0.15% в DMSO, в ней-

тральном буферном растворе, содержащем эксципенты, в оптических микропланшетах MicroAmp EnduraPlate и биосистемах с адгезивной плёнкой (Applied Biosystems 4483485 и 4311971). Планшет, содержащий разбавленный белок и смеси красителей, загружали в прибор ABI 7500 для ПЦР в реальном времени (Applied Biosystems) и применяли многостадийный температурный градиент от 25°C до 95°C. Температурный градиент включал выдержку в течение двух минут при каждом повышении на один градус Цельсия с возбуждением при длине волны 500 нм и эмиссию улавливали с помощью фильтра ROX. Величины T_h в градусах Цельсия для однодоменных белковых антител к HSA показана на фиг. 4.

Пример 4: Относительная способность к димеризации вариантов однодоменных антител анти-HSA при действии низкого pH.

Анти-HSA однодоменные белковые антитела экспрессировали в клетках Expi293-F, как описано выше. Кондиционированную среду для каждого варианта наносили на агарозу с белком А (GE Healthcare, 17519901), помещённую в колонку, тщательно промывали физиологическим раствором, содержащим TRIS буфер, элюировали с помощью 0.05% (об./об.) уксусной кислоты при pH 3, выдерживали при комнатной температуре до десяти минут перед частичной нейтрализацией до pH 5, и затем проводили обессоливание в нейтральном буфере, содержащем эксципенты, используя колонки Sephadex G25 (GE Healthcare 17058401).

Концентрации вариантов очищенных однодоменных антител к HSA определяли по абсорбции при длине волны 280 нм, как описано в примере 3. Очищенные белки оценивали, используя SDS-PAGE и аналитическую SEC (эксклюзивную хроматографию) на колонке Yarra 2000 SEC (Phenomenex 00H-4512-E0) с применением фосфатного буфера, содержащего растворитель, в аппарате 1200 LC при помощи компьютерной программы Chemstation (Agilent). Пики, соответствующие димеру и мономеру, интегрировали вручную, полученные величины показаны на фиг. 5.

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность AA
1	CDR1 с вариантами положений	GFX ₁ X ₂ X ₃ X ₄ FGMS
2	CDR2 с вариантами положений	SISGSX ₅ X ₆ TLYAX ₇ SX ₈ K
3	CDR3 с вариантами положений	GGSLX ₉ X ₁₀
4	Клон 6C анти-HSA sdAb	EVQLVESGGGLVQP _{GN} SLR _L SCAASGFTFSRFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMN SLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSS
5	Клон 7A анти-HSA sdAb	EVQLVESGGGLVQP _{GN} SLR _L SCAASGFTFSKFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGADTLYADSLKGRFTISRDNAKTTLYLQMN SLRPEDTAVYYCTIGGSLSKSSQGLTVTVSS
6	Клон 7G анти-HSA sdAb	EVQLVESGGGLVQP _{GN} SLR _L SCAASGFTYSSFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMN SLRPEDTAVYYCTIGGSLSKSSQGLTVTVSS
7	Клон 8H анти-HSA sdAb	EVQLVESGGGLVQP _{GN} SLR _L SCAASGFTFSKFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMN SLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSS
8	Клон 9A анти-HSA sdAb	EVQLVESGGGLVQP _{GN} SLR _L SCAASGFTFSRFGMSWVRQAPG

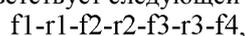
		KGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNACTTLYLQMN SLRPEDTAVYYCTIGGSLSKSSQGTLVTVSS
9	Клон 10G анти-HSA sdAb	EVQLVESGGGLVQPNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDNACTTLYLQMN SLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSS
10	wt анти-HSA	EVQLVESGGGLVQPNSLRLSCAASGFTFSFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNACTTLYLQMN SLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
11	CDR1 wt анти-HSA	GFTFSSFGMS
12	CDR2 wt анти-HSA	SISGSGSDTLYADSVK
13	CDR3 wt анти-HSA	GGSLSR
14	CDR1 вариант 1	GFTFSRFGMS
15	CDR1 вариант 2	GFTFSKFGMS
16	CDR1 вариант 3	GFTYSSFGMS
17	CDR2 вариант 1	SISGSGADTLYADSLK
18	CDR2 вариант 2	SISGSGTDTLYADSVK
19	CDR2 вариант 3	SISGSGRDTLYADSVK
20	CDR2 вариант 4	SISGSGSDTLYAESVK
21	CDR2 вариант 5	SISGSGTDTLYAESVK
22	CDR2 вариант 6	SISGSGRDTLYAESVK
23	CDR3 вариант 1	GGSLSK
24	CDR3 вариант 2	GGSLSV
25	Клон 6CE анти-HSA sdAb	EVQLVESGGGLVQPNSLRLSCAASGFTFSRFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGSDTLYAESVKGRFTISRDNACTTLYLQMN LRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
26	Клон 8HE анти-HSA sdAb	EVQLVESGGGLVQPNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGTDTLYAESVKGRFTISRDNACTTLYLQMN SLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
27	Клон 10GE анти-HSA sdAb	EVQLVESGGGLVQPNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNACTTLYLQMN SLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSS
28	Примерная линкерная последовательность	(GS)n
29	Примерная линкерная последовательность	(GGS)n
30	Примерная линкерная последовательность	(GGGS)n
31	Примерная линкерная последовательность	(GGSG)n
32	Примерная линкерная последовательность	(GGSGG)n
33	Примерная линкерная последовательность	(GGGGS)n
34	Примерная линкерная последовательность	(GGGGG)n
35	Примерная линкерная последовательность	(GGG)n
36	Примерная линкерная последовательность	(GGGGS)3
37	Примерная линкерная последовательность	(GGGGS)4
38	6X гистидин	HHHHHH

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, содержащий определяющие комплементарности участки CDR1, CDR2 и CDR3, где

- (a) CDR1 включает SEQ ID NO: 14, CDR2 включает SEQ ID NO: 12, и CDR3 включает SEQ ID NO: 13;
- (b) CDR1 включает SEQ ID NO: 15, CDR2 включает SEQ ID NO: 17, и CDR3 включает SEQ ID NO: 23;
- (c) CDR1 включает SEQ ID NO: 16, CDR2 включает SEQ ID NO: 12, и CDR3 включает SEQ ID NO: 23;
- (d) CDR1 включает SEQ ID NO: 15, CDR2 включает SEQ ID NO: 18, и CDR3 включает SEQ ID NO: 13;
- (e) CDR1 включает SEQ ID NO: 14, CDR2 включает SEQ ID NO: 12, и CDR3 включает SEQ ID NO: 23;
- (f) CDR1 включает SEQ ID NO: 15, CDR2 включает SEQ ID NO: 19, и CDR3 включает SEQ ID NO: 24;
- (g) CDR1 включает SEQ ID NO: 14, CDR2 включает SEQ ID NO: 20, и CDR3 включает SEQ ID NO: 13;
- (h) CDR1 включает SEQ ID NO: 15, CDR2 включает SEQ ID NO: 21, и CDR3 включает SEQ ID NO: 13; или
- (i) CDR1 включает SEQ ID NO: 15, CDR2 включает SEQ ID NO: 22, и CDR3 включает SEQ ID NO: 24.

2. Однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, по п.1, в котором указанный белок соответствует следующей формуле:



где r1 обозначает CDR1; r2 обозначает CDR2; r3 обозначает CDR3; и f₁, f₂, f₃ и f₄ обозначают остатки каркасной области, выбранные таким образом, чтобы указанный белок был по меньшей мере на семьдесят процентов идентичен аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 10.

3. Однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, по п.1, в котором CDR1 включает SEQ ID NO: 15, CDR2 включает SEQ ID NO: 19, и CDR3 включает SEQ ID NO: 24.

4. Однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, по п.1, в котором CDR1 включает SEQ ID NO: 14, CDR2 включает SEQ ID NO: 12, и CDR3 включает SEQ ID NO: 13.

5. Однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, по п.1, в котором CDR1 включает SEQ ID NO: 15, CDR2 включает SEQ ID NO: 18, и CDR3 включает SEQ ID NO: 13.

6. Однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, по п.1, в котором CDR1 включает SEQ ID NO: 15, CDR2 включает SEQ ID NO: 21, и CDR3 включает SEQ ID NO: 13.

7. Однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, по п.1, в котором CDR1 включает SEQ ID NO: 15, CDR2 включает SEQ ID NO: 22, и CDR3 включает SEQ ID NO: 24.

8. Однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, по п.1, где указанный белок имеет аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ IN NO. 25, SEQ ID NO: 26 или SEQ ID NO: 27.

9. Однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, по п.8, который включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4.

10. Однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, по п.8, который включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7.

11. Однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, по п.8, который включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9.

12. Однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, по п.8, который включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26.

13. Однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, по п.8, который включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27.

14. Однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, по п.1, где указанный белок связывается с мышинным сывороточным альбумином с аффинностью связывания (K_d), которая от около 1,5 до около 20 раз слабее аффинности связывания (K_d) указанного белка по отношению к сывороточному альбумину человека и яванского макака.

15. Однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, по п.14, где соотношение между hK_d и cK_d (hK_d:cK_d) однодоменного белка, связывающего сывороточный альбумин, находится в пределах от около 20:1 до около 1:2.

16. Однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, по п.1, где указанный белок имеет период полувыведения, составляющий по меньшей мере 12 часов, по меньшей мере 20 часов, по меньшей мере 25 часов, по меньшей мере 30 часов, по меньшей мере 35 часов, по меньшей мере 40 часов, по меньшей мере 45 часов, по меньшей мере 50 часов или по меньшей мере 100 часов.

17. Способ лечения или уменьшения интенсивности пролиферативного заболевания, включающий введение однодоменного белка, связывающего сывороточный альбумин, по п.1 субъекту, нуждающемуся в этом.

18. Мультиспецифичный связывающий белок, содержащий однодоменный белок, связывающий сывороточный альбумин, по п.1.

19. Способ лечения или уменьшения интенсивности опухолевого заболевания, включающий введение однодоменного белка, связывающего сывороточный альбумин, по п.1 субъекту, нуждающемуся в этом.

20. Способ лечения или уменьшения интенсивности иммунологического нарушения, включающий введение однодоменного белка, связывающего сывороточный альбумин, по п.1 субъекту, нуждающемуся в этом.

21. Способ лечения или уменьшения интенсивности аутоиммунного заболевания, включающий введение однодоменного белка, связывающего сывороточный альбумин, по п.1 субъекту, нуждающемуся в этом.

22. Способ лечения или уменьшения интенсивности инфекционного заболевания, включающий введение однодоменного белка, связывающего сывороточный альбумин, по п.1 субъекту, нуждающемуся в этом.

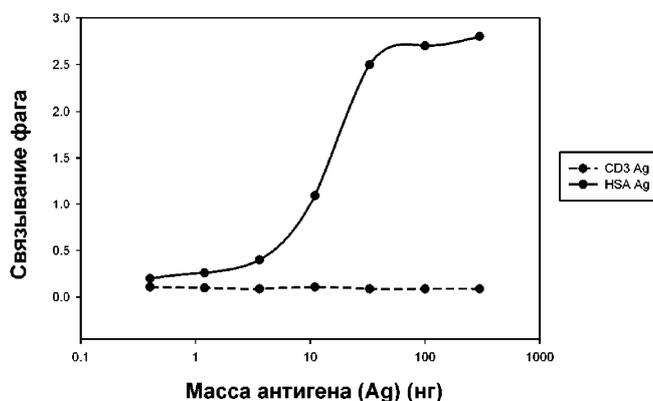
23. Способ лечения или уменьшения интенсивности вирусного заболевания, включающий введение однодоменного белка, связывающего сывороточный альбумин, по п.1 субъекту, нуждающемуся в этом.

24. Способ лечения или уменьшения интенсивности аллергической реакции, включающий введение однодоменного белка, связывающего сывороточный альбумин, по п.1 субъекту, нуждающемуся в этом.

25. Способ лечения или уменьшения интенсивности паразитарной реакции, включающий введение однодоменного белка, связывающего сывороточный альбумин, по п.1 субъекту, нуждающемуся в этом.

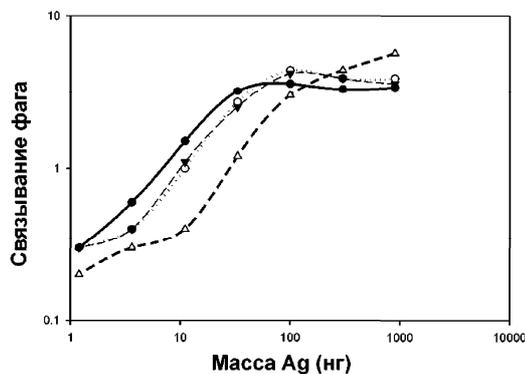
26. Способ лечения или уменьшения интенсивности болезни "трансплантат-против-хозяина", включающий введение однодоменного белка, связывающего сывороточный альбумин, по п.1 субъекту, нуждающемуся в этом.

27. Способ лечения или уменьшения интенсивности болезни "хозяин-против-трансплантата", включающий введение однодоменного белка, связывающего сывороточный альбумин, по п.1 субъекту, нуждающемуся в этом.



Фиг. 1

Перекрёстная реактивность HSA фага



Фиг. 2

<u>Клон</u>	<u>hK_d</u>	<u>сK_d</u>	<u>mK_d</u>
WT	4 нМ	4.1 нМ	42.5 нМ
6C	2.3 нМ	2.4 нМ	17.3 нМ
7A	1.9 нМ	1.7 нМ	12.3 нМ
7G	3.2 нМ	3.6 нМ	32.9 нМ
8H	2.7 нМ	2.6 нМ	14.5 нМ
9A	6.0 нМ	7.5 нМ	
10G	2.2 нМ	2.3 нМ	15.7 нМ
6CE	2.1 нМ	2.2 нМ	16.8 нМ
8HE	2.1 нМ	2.0 нМ	16.7 нМ
10GE	1.6 нМ	1.6 нМ	16.1 нМ

Фиг. 3

<u>Варианты однодоменного анти-HSA</u>	<u>T_m (°C)</u>
WT	63
6C	64.9
7A	59.1
7G	57.3
8H	66.2
10G	70.7
6CE	64
8HE	65.9
10GE	71.1

Фиг. 4

<u>Варианты однодоменного анти-HSA</u>	<u>% димера</u>	<u>% мономера</u>
WT	3.9	96.1
6C	6.1	93.9
7A	35.1	64.9
7G	22	78
8H	5.5	94.5
10G	1.3	98.7

Фиг. 5

