

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390644** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.07.26

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

(22) Дата подачи заявки
2021.10.01

(54) **УЛУЧШЕННЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ охMIF С Пониженным потенциалом агрегации и пониженной гидрофобностью**

(31) 20199829.1

(72) Изобретатель:

(32) 2020.10.02

Шинагль Александр, Миркина

(33) EP

Ирина, Кершбаумер Рандольф, Тиле

(86) PCT/EP2021/077106

Роберт Михаэль (AT)

(87) WO 2022/069712 2022.04.07

(74) Представитель:

(71) Заявитель:

Нилова М.И. (RU)

**ОНКОУАН РЕСЁРЧ ЭНД
ДЕВЕЛОПМЕНТ ГМБХ (AT)**

(57) Настоящее изобретение относится к антителам против охMIF с улучшенными свойствами, такими как пониженный потенциал агрегации и пониженная гидрофобность, за счет выбранных замен аминокислот в переменных доменах легких и тяжелых цепей, и необязательно с повышенными эффекторными функциями за счет дополнительных замен в константных областях тяжелых цепей, а также к их применению в лечении связанных с охMIF состояний.

A1

202390644

202390644

A1

УЛУЧШЕННЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ охMIF С ПОНИЖЕННЫМ ПОТЕНЦИАЛОМ
АГРЕГАЦИИ И ПОНИЖЕННОЙ ГИДРОФОБНОСТЬЮ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к антителам против охMIF с улучшенными
5 свойствами, такими как пониженный потенциал агрегации и пониженная гидрофобность,
за счет выбранных замен аминокислот в переменных доменах легких и тяжелых цепей,
и необязательно с усиленными эффекторными функциями за счет дополнительных замен
в константных областях тяжелых цепей, а также к их применению в лечении связанных с
охMIF состояний.

10

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Цитокин – фактор ингибирования миграции макрофагов (MIF) был описан уже в
1966 (David, J.R., 1966; Bloom B.R. and Bennet, B., 1966). При этом MIF заметно отличается
от других цитокинов и хемокинов, поскольку экспрессируется конститутивно,
15 сохраняется в цитоплазме и присутствует в кровотоке у здоровых субъектов. можно
предположить, что ввиду широкой распространенности MIF указанный белок является
неподходящей мишенью для терапевтического вмешательства. Однако MIF встречается в
двух иммунологически различных конформационных изоформах, называемых
восстановленным MIF (redMIF) и окисленным MIF (охMIF) (Thiele M. et al., 2015).
20 Обнаружено, что RedMIF представляет собой экспрессируемую в большом количестве
изоформу MIF, которая может присутствовать в цитоплазме и в кровотоке у любого
субъекта. Предположительно, RedMIF представляет собой латентную неактивную
запасаемую форму (Schinagl. A. et al., 2018).

25

Напротив, охMIF предположительно является физиологически релевантной и
связанной с заболеванием изоформой, которая может быть детектирована в опухолевой
ткани, в частности, в опухолевой ткани от пациентов с раком ободочной и прямой кишки,
раком поджелудочной железы, раком яичника и раком легкого, что подчеркивает высокую
опухолевую специфичность охMIF (Schinagl. A. et al., 2016), но также и в кровотоке у
пациентов с воспалительными заболеваниями (Thiele et al., 2015).

30

Число успешных мишеней лекарственных средств для лечения рака, например,
вышеупомянутых положительных по охMIF типов рака, ограничено. Так, описано более
300 потенциальных иммуноонкологических мишеней, однако многие клинические

исследования сосредоточены на антителах против PD1 и PDL1 (Tang J., et al. 2018).
Научное и медицинское сообщество, соответственно, с нетерпением ожидает
потенциальных лекарственных средств, нацеленных на опухолеспецифические антигены,
чтобы расширить терапевтические возможности для пациентов с раком при
5 неудовлетворительном прогнозе.

Моноклональные антитела против MIF описаны в WO2009/086920A1.

Антитела, нацеленные на oxMIF, показали эффективность в *in vitro*- и *in vivo*
моделях воспаления и рака (Hussain F. et al., 2013; Schinagl. A. et al., 2016; Thiele et al.,
10 2015). oxMIF-специфическое антитело (ималумаб) демонстрировало приемлемый
профиль безопасности, удовлетворительное проникновение в ткани и показатели
противоопухолевой активности в клиническом испытании фазы 1 (Mahalingam D. et al.,
2015; Mahalingam D. et al. 2020).

Биспецифические антитела против oxMIF/ против CD3 раскрыты в
15 WO2019/234241A1.

Агрегация белков, в частности, агрегация антител часто наблюдается на нескольких
стадиях биопроцессинга, в том числе на стадиях экспрессии белков, очищения и хранения.
Агрегация антител может влиять на общий выход процессов получения терапевтического
белка и может вносить вклад в стабильность и иммуногенность терапевтических антител.

20 Агрегация белков антител, соответственно, продолжает оставаться значимой
проблемой, влияющей на возможность их разработки, и остается одним из основных
объектов внимания при получении антител. Агрегацию антител может запускать
частичное разворачивание их доменов, что приводит к образованию связей между
мономерами с последующими нуклеацией и ростом агрегатов. Хотя на
25 предрасположенность антител и белков на основе антител к агрегации могут влиять
внешние экспериментальные условия, она сильно зависит от внутренних свойств антител,
определяемых их последовательностями и структурой.

Например, устойчивость к агрегации может быть достигнута путем стабилизации
природного состояния (т.е. устойчивости к разворачиванию) или путем снижения
30 склонности развернутых или частично развернутых состояний белка к агрегации.
Недостатком стабилизации в природном состоянии является то, что белки, вероятно, будут
подвергаться воздействию окружающей среды, в которой они будут разворачиваться.
Обычно, когда белок денатурирует или разворачивается, обнажаются остатки
аминокислот, которые в норме опосредуют внутримолекулярные контакты внутри белка.

Такое обнажение остатков часто обуславливает склонность белков к формированию межмолекулярных контактов и агрегации. В отличие от белков, устойчивых к разворачиванию, белок, имеющий пониженную предрасположенность к агрегации в развернутом состоянии, просто повторно свернется в биоактивное неагрегированное состояние после воздействия такой окружающей среды.

Устойчивость к агрегации или предрасположенность к агрегации антител и белков, содержащих их антигенсвязывающие домены, обычно ограничены наиболее склонным(и) к агрегации доменом (доменами) в составе этих антител и белков, и силой его (их) взаимодействия с окружающими доменами (при их наличии).

Это происходит по причине того, что после разворачивания домена, если он не способен к повторной укладке, он может взаимодействовать с другими доменами в том же белке или в других белках и формировать агрегаты. Константные домены антител обычно не образуют агрегатов и существенно не различаются. Соответственно, наиболее слабыми доменами антитела в отношении потенциала агрегации и стабильности обычно считаются переменные домены (например, переменный домен тяжелой цепи (V_H) и/или переменный домен легкой цепи (V_L), Ewert S. et al., 2003). В связи с этим, включение предрасположенных к агрегации V_H - или V_L -доменов в стабильные в иных отношениях продукты рекомбинантных антител часто приносит указанные обычно нежелательные признаки в новый рекомбинантный дизайн. Соответственно, конструирование переменного домена таким образом, чтобы он был устойчивым к агрегации, скорее всего, сделает весь белок, который может содержать этот переменный домен, устойчивым к агрегации. Были предложены различные стратегии для снижения агрегации переменных доменов, например, рациональный дизайн устойчивых к агрегации белков, привнесение определяющих комплементарность областей (CDR) или введение дисульфидных связей в переменный домен. Рациональный дизайн устойчивых к агрегации белков обычно включает применение анализа *in silico* для предсказания эффекта точечной мутации на предрасположенность белка к агрегации. Однако с указанным подходом сопряжен ряд трудностей. Например, недостаточно просто идентифицировать мутацию, которая, вероятно, снижает агрегацию белка без укладки. Помимо этого, мутация также не должна усиливать агрегацию белка в укладке или влиять на функцию белка в укладке, в частности, на связывающие свойства, такие как аффинность или специфичность в случае антител. Кроме того, рациональный дизайн требует проведения подробного структурного анализа конкретного белка, который предполагается усовершенствовать, и, соответственно, его трудно использовать для белка, который не был

полностью охарактеризован и его невозможно легко применить к множеству разных белков. Прививка CDR включает перенос CDR-областей из одного переменного домена на каркасные области (FR) другого переменного домена. Указанная стратегия, как было показано, подходит для применения при стабилизации scFv против EGP-2 (Willuda J. et al., 5 1999). Недостатки указанного подхода включают снижение аффинности, которое может происходить после прививки CDR. Указанную утрату аффинности можно преодолеть путем введения мутаций в FR, однако такие мутации могут продуцировать иммуногенные эпитопы в белке, что делает белок нежелательным с терапевтической точки зрения. Кроме того, прививка CDR обычно требует анализа кристаллической структуры или 10 моделирования гомологии донорных и акцепторных переменных доменов для оценки пригодности для прививки. Такой подход является трудоемким и требует специализированных познаний. Кроме того, поскольку все переменные домены имеют разную структуру, указанный способ невозможно легко применить для разных молекул. Что касается способов, задействующих введение дисульфидных связей в переменный 15 домен, хотя указанная связь способна содействовать правильной повторной укладке белка, она также придает жесткость переменному домену. Такая жесткость может уменьшать аффинность антитела в отношении антигена. Кроме того, не все переменные домены могут позволять введение требуемых остатков цистеина для образования дисульфидных связей без потери аффинности или без введения иммуногенного эпитопа. Кроме того, 20 образование дисульфидных связей при высокой концентрации белков может приводить к агрегации белков, что сводит на нет любые потенциальные положительные эффекты указанной связи.

При этом снижение предрасположенности к агрегации, как было показано, сопровождается увеличением титров при экспрессии, демонстрирующим, что снижение 25 агрегации белков является благоприятным на протяжении всего процесса разработки и может обеспечивать более эффективный путь к клиническим исследованиям. В случае терапевтических белков агрегаты представляют собой значимый фактор риска в отношении пагубных иммунных ответов у пациентов и могут формироваться под действием различных механизмов. Контроль агрегации может улучшить стабильность 30 белков, реализуемость производства, коэффициенты потерь, безопасность, состав, титры, иммуногенность и растворимость (Wei Li et al., 2016; Van der Kant R. et al., 2017).

Другие внутренние свойства, такие как гидрофобность, также играют важную роль в растворимости антител. Малая растворимость указанных терапевтических белков из-за поверхностной гидрофобности, как было показано, усложняет разработку составов и

может приводить к неудовлетворительному биораспределению, нежелательным фармакокинетическим характеристикам и иммуногенности *in vivo*. Уменьшение общей поверхностной гидрофобности кандидатных моноклональных антител может, соответственно, обеспечивать преимущества и снижать расходы применительно к
5 очищению и режимам дозирования.

Считается, что в противораковые эффекты вовлечено множество механизмов. В частности, зависимые от рецептора Fc-гамма (Fc γ R) IIIA и Fc γ RIIA эффекторные функции могут представлять собой два важнейших механизма, отвечающих за клиническую эффективность терапевтических антител. Известно, что Fc γ RIIA является важным
10 рецептором для запуска антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ) в естественных киллерных клетках (НК-клетках), а Fc γ RIIA является важным рецептором для запуска антителозависимого клеточного фагоцитоза (АЗКФ) в макрофагах. Комплементзависимая цитотоксичность (КЗЦ), другая эффекторная функция антитела, также считается возможным противоопухолевым механизмом. Большинство
15 терапевтических антител, лицензированных и разработанных в качестве медицинских средств, относятся к изотипу IgG1 человека, который может индуцировать АЗКЦ и КЗЦ. Указанные эффекторные функции активируются при взаимодействиях Fc либо с рецепторами Fc γ R, либо с комплементом, и на указанные взаимодействия влияют N-связанные биантенные олигосахаридные комплексы, присоединенные к Fc-области антитела (Natsume et al., 2009). В ряде исследований *in vitro* и *in vivo* продемонстрировано, что антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (АЗКЦ) является преобладающим типом действия против раковых клеток. Была продемонстрирована необходимость прямого взаимодействия между антителом (АТ) и рецепторами Fc-области антител (FcR) для противоопухолевых эффектов указанных антител. Следовательно,
20 несущие FcR иммунные эффекторные клетки играют важную роль в опосредовании их эффектов (Ianello A. and Ahmad A., 2005). Однако антитела MIF, известные в данной области техники, не индуцируют ни комплемент-зависимый клеточный лизис вступающих в реакции с MIF клеток, ни антителозависимую клеточную цитотоксичность (Hussain et al., 2013).

30 В US2011/236375A1 описаны варианты Fc с усиленной эффекторной функцией.

Комбинация пониженного потенциала агрегации и пониженной гидрофобности обеспечила бы очень благоприятные свойства антителам. В данной области техники имеется потребность в устойчивых к агрегации антителах против oxMIF с пониженной

гидрофобностью, однако также и в антителах против охМIF с усиленными эффекторными функциями, которую не удовлетворяют существующие модификации антител.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

5 Задачей настоящего изобретения является обеспечение улучшенных антител или их антигенсвязывающих фрагментов, нацеленных на охМIF и имеющих пониженные предрасположенность к агрегации и гидрофобность.

Указанная цель достигается с помощью предмета настоящего изобретения.

10 Согласно настоящему изобретению предложено рекомбинантное антитело против охМIF или его антигенсвязывающий фрагмент с пониженным потенциалом агрегации и пониженной гидрофобностью, содержащее(ий) следующие переменные домены:

(a1) переменный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:9 и по меньшей мере одну из замен аминокислот M30L, F49Y, A51G, P80S, W93F, или

15 (a2) переменный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:9 с 1, 2, 3, 4 или 5 заменами аминокислот, дополнительно содержащий консервативный тирозин в положении 36, и по меньшей мере одну из замен аминокислот M30L, F49Y, A51G, P80S, W93F; и один из

(b1) переменный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:6; или

(b2) переменный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:6 и замены аминокислот L5Q и/или W97Y, или

20 (b3) переменный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:6 с 1, 2, 3, 4 или 5 заменами аминокислот, и с заменами аминокислот L5Q и/или W97Y; при этом положения аминокислот пронумерованы в соответствии с Kabat, а потенциал агрегации и гидрофобность снижены по сравнению с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим SEQ ID NO:6 и SEQ ID NO:9 без указанных замен аминокислот, при этом положения аминокислот пронумерованы в соответствии с Kabat, а потенциал агрегации и гидрофобность снижены по сравнению с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим SEQ ID NO:6 и SEQ ID NO:9 без указанных замен аминокислот.

30 В настоящем описании раскрыто также рекомбинантное антитело против охМIF или его антигенсвязывающий фрагмент с пониженным потенциалом агрегации и пониженной гидрофобностью, содержащее(ий) следующие переменные домены

(a) переменный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:9, или переменный домен легкой цепи, характеризующийся по меньшей мере 95%

идентичностью последовательности с SEQ ID NO:9, содержащий тирозин в положении 36; и

5 (b) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:6 и замены аминокислот W97Y и/или L5Q, или вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:6 с 1, 2, 3, 4 или 5 заменами аминокислот и дополнительно содержащий замены аминокислот W97Y и/или L5Q, при этом положения аминокислот пронумерованы в соответствии с Kabat, и отличающее(ий)ся тем, что потенциал агрегации и гидрофобность снижены по сравнению с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим SEQ ID NO:6 и SEQ ID NO:9 без
10 указанных замен аминокислот.

В частности, рекомбинантное антитело против охMIF содержит замену аминокислоты W93F относительно SEQ ID 9.

В частности, рекомбинантное антитело против охMIF содержит замену аминокислоты W97Y относительно SEQ ID NO:6.

15 В соответствии с дополнительным конкретным вариантом реализации рекомбинантное антитело против охMIF содержит замены аминокислот W93F и W97Y.

Неожиданно, было показано, что выбранные положения даже в CDR-доменах могут быть заменены для снижения потенциала агрегации и/или гидрофобности без какого-либо отрицательного эффекта на аффинность связывания охMIF.

20 В частности, вариабельный домен легкой цепи содержит 1, 2, 3, 4 или все из замен аминокислот M30L, F49Y, A51G, P80S, W93F.

В частности, рекомбинантное антитело против охMIF содержит константный легкий (CL) домен SEQ ID NO: 38.

25 В соответствии с конкретным вариантом реализации рекомбинантное антитело против охMIF, описанное в настоящем документе, также имеет усиленные эффекторные функции и содержит константную область тяжелой цепи, содержащую

(a) SEQ ID NO:2 или константную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO:2 и содержащую аминокислоты 239D и 332E; или

30 (b) SEQ ID NO:3, или константную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO:3 и содержащую аминокислоты 239D, 268F, 324T и 332E; или

(c) SEQ ID NO:4, или константную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO:4 и содержащую аминокислоты 239D и 332E; или

5 (d) SEQ ID NO:5, или константную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO:5 и содержащую аминокислоты 235V, 243L, 292P, 300L и 396L,
при этом положения аминокислот пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU.

10 В частности, антитело против охMIF, описанное в настоящем документе, содержит VH- или VL-домен, содержащий последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO:7, 8, 10, 11, 12 и 13.

В соответствии с альтернативным вариантом реализации указанное антитело против охMIF содержит последовательности SEQ ID NO:6, 11 и любую из последовательностей SEQ ID NO:1, 2, 3, 4 или 5.

15 Согласно дополнительному варианту реализации указанное антитело против охMIF содержит последовательности SEQ ID NO:7, 10 и любую из последовательностей SEQ ID NO:1, 2, 3, 4 или 5.

20 Согласно дополнительному варианту реализации указанное антитело против охMIF содержит последовательности SEQ ID NO:7, 11 и любую из последовательностей SEQ ID NO:1, 2, 3, 4 или 5.

Согласно дополнительному варианту реализации указанное антитело против охMIF содержит последовательности SEQ ID NO:8, 10 и любую из последовательностей SEQ ID NO:1, 2, 3, 4 или 5.

25 Согласно дополнительному варианту реализации указанное антитело против охMIF содержит последовательности SEQ ID NO:8, 11 и любую из последовательностей SEQ ID NO:1, 2, 3, 4 или 5, или SEQ ID No:39, или SEQ ID NO:40.

Согласно дополнительному варианту реализации указанное антитело против охMIF содержит последовательности SEQ ID NO:8, 13 и любую из последовательностей SEQ ID NO:1, 2, 3, 4 или 5, или SEQ ID No:41, или SEQ ID NO:42.

30 Также согласно настоящему изобретению предложено антитело против охMIF по любому из пп. 1–3, содержащее последовательности SEQ ID NO:39, 40, 41 или 42, или антитело против охMIF, содержащее последовательности SEQ ID NO: 39, 44, 41 или 45.

Более конкретно, рекомбинантное антитело против охMIF или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой биспецифическое антитело.

Согласно конкретному варианту реализации антитело против оxMIF, описанное в настоящем документе, выбрано из группы, состоящей из моноспецифических и биспецифических антител, scFv, (scFv)₂, scFv-Fc, Fab, Fab' и F(ab')₂, Fab'-SH, слитых Fab-scFv, слитых Fab-(scFv)₂, Fab-scFv-Fc, Fab-(scFv)₂-Fc, слитых белков из двух одноцепочечных переменных фрагментов (scFv) разных антител (например, ViTE), минитела, TandAb®, DutaMab™, DART и CrossMab®.

В частности, антитело согласно описанию в настоящем документе предназначено для применения при получении медикамента.

В частности, согласно настоящему изобретению предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело согласно настоящему изобретению, необязательно совместно с фармацевтическим носителем или адъювантом.

В частности, указанная композиция содержит приблизительно 10–250 мг/мл антитела, описанного в настоящем документе, в частности, содержит ≥ 50 мг/мл.

В частности, указанная фармацевтическая композиция выполнена с возможностью подкожного введения.

Более конкретно, указанная фармацевтическая композиция может применяться для лечения связанных с оxMIF состояний.

В частности, указанная композиция предназначена для введения в качестве единственного вещества, или в комбинации с дополнительной фармацевтической композицией, содержащей одно или более активных веществ, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из противовирусных, противовоспалительных, противораковых, антиангиогенных и антибиотических веществ.

Согласно дополнительному варианту реализации указанная фармацевтическая композиция предназначена для применения в лечении пациента, страдающего воспалительным заболеванием, гиперпролиферативным нарушением, инфекционным заболеванием или раком, в частности, в лечении астмы, васкулита, артрита, сепсиса, септического шока, эндотоксического шока, синдрома токсического шока, приобретенного респираторного дистресс-синдрома, гломерулонефрита, воспалительного заболевания кишечника, болезни Крона, язвенного колита, перитонита, нефрита и псориаза, рака ободочной и прямой кишки, рака яичников, рака молочной железы, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы и рака легкого.

Также согласно настоящему изобретению предложена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело согласно настоящему изобретению.

Также согласно настоящему изобретению предложен экспрессионный вектор, содержащий молекулу (молекулы) нуклеиновой кислоты согласно описанию в настоящем документе.

5 Согласно дополнительному варианту реализации предложена клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту или экспрессионный вектор, описанные в настоящем документе.

Также предложен способ получения антитела согласно настоящему изобретению, включающий культивирование клетки-хозяина и выделение указанного антитела из культуры клеток.

10 Также согласно настоящему изобретению предложен способ получения антитела согласно настоящему изобретению, включающий экспрессию нуклеиновой кислоты, кодирующей указанное антитело, в клетке-хозяине.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фиг. 1: Последовательности аминокислот

15 Фиг. 2: Улучшенные профили ЭХ (А, В) и ГХ (С) новых разработанных антител против охMIF.

Фиг. 3: Связывание новых разработанных антител против охMIF с иммобилизованным MIF (определение KD).

20 Фиг. 4: Неодинаковое связывание новых разработанных антител против охMIF с охMIF и с redMIF.

Фиг. 5: Усиленные эффекторные функции новых разработанных антител против охMIF в модифицированном репортерном биологическом анализе АЗКЦ.

25 Фиг. 6: Проникновение в опухоль нового разработанного антитела против охMIF C0083. А: Биораспределение C0008 (5мг/кг/день); В: Биораспределение C0083 (5мг/кг/день); С: не получавшие лечения контрольные мыши.

Фиг. 7: Улучшенное получение нового разработанного антитела против охMIF C0083.

30 Фиг. 8: Улучшенное получение новых разработанных антител против охMIF с усиленными эффекторными функциями и пониженными гидрофобностью и предрасположенностью к агрегации, со сравнением с соответствующими им эквивалентами с усиленными эффекторными функциями, но содержащими VH- и VL-домены C0008 (сравнение C0097 с C0064, C0098 с C0065, и C0100 с C0067).

Фиг. 9: Хроматографические профили, демонстрирующие пониженные агрегацию и гидрофобность новых разработанных антител против охMIF. (А) Сравнение профилей элюции С0008 (контрольное антитело, область серого цвета) и новых разработанных антител С0108 и С0109 с усиленными эффекторными функциями на гель-фильтрационной колонке Enrich 650 с применением 1×ФСБ в качестве подвижной фазы; (В) Сравнение профилей элюции С0008 (контрольное антитело, область серого цвета) и новых разработанных антител С0083, С0090, С0108 и С0109 на колонке HiTrap Butyl HP ГХ.

Фиг. 10: Пониженное неспецифическое связывание новых разработанных антител против охMIF на клетках A2780 MIF^{-/-}, определенное с использованием FACS. Клетки A2780 MIF^{-/-} окрашивали новыми разработанными антителами против охMIF С0090, С0109 (А); С0083, С0108 (В) или контрольным антителом С0008, а также изотипическим IgG в качестве отрицательного контроля. Строили график зависимости геометрического среднего (GeoMean, средняя интенсивность флуоресценции для AF488) жизнеспособных клеток от концентрации антитела.

Фиг. 11: Кривые связывания новых разработанных антител против охMIF с усиленными эффекторными функциями с иммобилизованным охMIF (расчет К_D); антитело против охMIF С0008 использовали в качестве референсного антитела.

Фиг. 12: Неодинаковое связывание новых разработанных антител с охMIF и с redMIF. С0008 использовали в качестве референсного антитела и изотипический IgG в качестве отрицательного контроля.

Фиг. 13: Фармакокинетика новых разработанных антител против охMIF С0083 и С0090 по сравнению с контрольным антителом против охMIF С0008 у мышей BALB/c nude. Концентрацию антител в плазме определяли с использованием количественного ИФА ELISA против охMIF через 4, 10, 24, 48 и 96 ч после однократного внутривенного введения 10 мг/кг антител против охMIF, и вычисляли значения продолжительности полужизни, используя модель однофазного затухания в GraphPad Prism.

Фиг. 14 Усиленные эффекторные функции новых разработанных антител С0108 и С0109, определенные с использованием репортерных анализов. (А-В) Репортерный биологический анализ АЗКЦ с новыми разработанными антителами С0108 и С0109 с усиленными эффекторными функциями, с применением сконструированных эффекторных клеток Jurkat, стабильно экспрессирующих FcγRIIIa (аллотип V с выраженной реакцией, аллотип F со слабой реакцией), и целевых клеток НСТ116-pMIF (А) или A2780-pMIF (В), со сравнением с контрольным антителом против охMIF С0008 с Fc дикого типа; (С) Репортерный биологический анализ АЗКФ с новыми разработанными

антителами С0108 и С0109 с усиленными эффекторными функциями с применением сконструированных эффекторных клеток Jurkat, стабильно экспрессирующих FcγRIIa, и целевых клеток НСТ116-рMIF, со сравнением с контрольным антителом против оxMIF С0008 с Fc дикого типа. Показаны среднее и SEM (n=2-4).

5 Фиг. 15: Усиленная АЗКЦ-активность новых разработанных антител против оxMIF С0108 и С0109, несущих усиливающие АЗКЦ/АЗКФ мутации в Fc-части, определенная в опосредованном МКПК анализе цитотоксичности. Биологический анализ АЗКЦ с новыми разработанными антителами против оxMIF С0108 и С0109 и МКПК в качестве эффекторных клеток (А: 22% НК-клеток, В: 7% НК-клеток) и НСТ116-рMIF в качестве
10 целевых клеток, со сравнением с контрольным антителом против оxMIF С0008 с Fc дикого типа. Среднее и SEM для двух или трех повторностей с применением МКПК от двух здоровых доноров показаны.

Фиг. 16: Новые разработанные антитела против оxMIF демонстрируют выражено пониженное неспецифическое высвобождение цитокинов из МКПК человека. Новые
15 разработанные антитела против оxMIF С0108 и С0109, несущие усиливающие АЗКЦ/АЗКФ мутации в Fc-части (70 нМ), и контрольное антитело против оxMIF С0008 (70 нМ) инкубировали с МКПК человека в течение ночи, и супернатанты анализировали в цитометрических анализах на основе гранул LegendPlex (BioLegend) на ИЛ-6 человека (А) и МСР-1 человека (В). Показаны значения среднего +/- SEM для концентраций цитокинов
20 от трех разных доноров МКПК.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Если не указано или не определено иное, все термины в настоящем документе имеют обычное значение в данной области техники, известное специалисту в данной области техники. Например, см. информацию в стандартных справочниках, таких как
25 Sambrook et al, «Molecular Cloning: A Laboratory Manual» (4th Ed.), Vols. 1 -3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2012); Krebs et al., «Lewin's Genes XI», Jones & Bartlett Learning, (2017), и Murphy & Weaver, «Janeway's Immunobiology» (9-е или более новые издания), Taylor & Francis Inc, 2017.

Объектом изобретения, в частности, являются искусственные продукты или
30 способы, действующие или обеспечивающие получение таких искусственных продуктов, которые могут представлять собой варианты природных (дикого типа) продуктов. Хотя последовательности могут иметь определенную степень идентичности природной структуре, ясно, что материалы, способы и варианты применения согласно

настоящему изобретению, в частности, *например*, относящиеся к выделенным последовательностям нуклеиновых кислот, последовательностям аминокислот, слитым конструкциям, экспрессионным конструкциям, трансформированным клеткам-хозяевам и модифицированным белкам, являются «рукотворными» или синтетическими, и
5 соответственно, не могут быть сочтены результатом действия «законов природы».

Термины «содержать(ся)», «иметь» и «включать» в настоящем документе могут применяться в качестве синонимов и должны пониматься как имеющие открытое определение, допускающее включение дополнительных членов, частей или элементов. «Состоящий» считается наиболее близким определением к определению, не
10 включающему дополнительных элементов. Соответственно, «содержащий» является более широким термином и включает в себя определение термина «состоящий».

Термин «приблизительно» («примерно») в настоящем документе относится к такому же значению или к значению, отличающемуся на +/-5 % от заданного значения.

В настоящем описании и в формуле изобретения термины в единственном числе
15 включают и их формы множественного числа, если иное явным образом не следует из контекста.

В настоящем документе «аминокислоты» относятся к двадцати природным аминокислотам, кодируемым 61 триплетным кодоном. Указанные 20 аминокислот могут
20 быть разделены на имеющие нейтральный заряд, положительный заряд и отрицательный заряд:

«Нейтральные» аминокислоты приведены ниже вместе с соответствующими трехбуквенными и однобуквенными обозначениями и полярностью: аланин (Ala, A; неполярная, нейтральная), аспарагин (Asn, N; полярная, нейтральная), цистеин (Cys, C; неполярная, нейтральная), глутамин (Gln, Q; полярная, нейтральная), глицин (Gly, G;
25 неполярная, нейтральная), изолейцин (Ile, I; неполярная, нейтральная), лейцин (Leu, L; неполярная, нейтральная), метионин (Met, M; неполярная, нейтральная), фенилаланин (Phe, F; неполярная, нейтральная), пролин (Pro, P; неполярная, нейтральная), серин (Ser, S; полярная, нейтральная), треонин (Thr, T; полярная, нейтральная), триптофан (Trp, W; неполярная, нейтральная), тирозин (Tyr, Y; полярная, нейтральная), валин (Val, V;
30 неполярная, нейтральная) и гистидин (His, H; полярная, положительно заряженная (10%)/нейтральная (90%)).

«Положительно» заряженные аминокислоты: аргинин (Arg, R; полярная, положительно заряженная) и лизин (Lys, K; полярная, положительно заряженная).

«Отрицательно» заряженные аминокислоты: аспарагиновая кислота (Asp, D; полярная, отрицательно заряженная) и глутаминовая кислота (Glu, E; полярная, отрицательно заряженная).

5 Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению включает по меньшей мере один сайт связывания, специфически распознающий охMIF и демонстрирующий пониженную предрасположенность к агрегации и пониженную гидрофобность за счет направленных замен аминокислот в переменных доменах тяжелых и легких цепей по сравнению с немодифицированным антителом без указанных замен аминокислот.

10 Снижение потенциала агрегации обусловлено заменами аминокислот в выбранных положениях в переменных доменах антитела, описанного в настоящем документе.

Уровень агрегации антитела может быть измерен с применением различных известных методик, включая методики масс-спектрометрии, эксклюзионной хроматографии (ЭХ), хроматографии гидрофобного взаимодействия (ГХ), динамического светорассеяния (ДСР), светоблокировки (LO), анализа частиц путем динамической визуализации (DIP A), например, визуализации микропотока (MFI), а также счетчика Кюльтера (CC), дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF).

20 Пониженная гидрофобность и пониженный потенциал агрегации в настоящем документе относится к снижению поверхностной гидрофобности и пониженному потенциалу агрегации нового разработанного антитела по сравнению с референсным антителом, таким как антитело C0008, которое содержит SEQ ID No 1, 6, 38 и 9, согласно описанию в настоящем документе. Последовательность C0008 содержит последовательность ималумаба, опубликованную в перечне предлагаемых МНН (международных непатентованных наименований) 111 (источник: «Лекарственный вестник ВОЗ» (WHO Drug Information), том 28, №2, 2014), однако без C-концевого лизина. Измерение может быть выполнено с применением различных известных методик, в том числе, но не ограничиваясь перечисленным, хроматографии гидрофобного взаимодействия (ГХ) или спектроскопии самовзаимодействия наночастиц с аффинным захватом (AC-SINS, Estep P. et al., 2015).

30 Согласно варианту реализации антитело к охMIF согласно настоящему изобретению с пониженным потенциалом агрегации и пониженной гидрофобностью, в частности, содержит переменный домен легкой цепи, имеющий по меньшей мере одну из замен аминокислот M30L, F49Y, A51G, P80S, W93F в соответствии с нумерацией по Kabat, или переменный домен легкой цепи с по меньшей мере 95, в частности, по

меньшей мере с 96, 97, 98 или 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO:9, содержащий естественный тирозин в положении 36, а также по меньшей мере одну из замен аминокислот M30L, F49Y, A51G, P80S, W93F, либо в комбинации с переменным доменом тяжелой цепи, содержащим SEQ ID NO:6, либо в комбинации с переменным доменом тяжелой цепи, содержащим SEQ ID NO:6 с заменами аминокислот L5Q и/или W97Y в соответствии с нумерацией по Kabat, или переменный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:6 с 1, 2, 3, 4 или 5 заменами аминокислот и дополнительно содержащий по меньшей мере одну из замен аминокислот L5Q или W97Y.

Согласно альтернативному варианту реализации указанный переменный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:9, имеет 1, 2, 3, 4, 5 замен аминокислот при условии, что сохраняется естественный тирозин в положении 36, а также заменена по меньшей мере одна из аминокислот в положениях M30, F49, A51, P80, W93.

В частности, замены аминокислот в положениях W93 и W97 являются предпочтительными.

Кроме того, замена аминокислоты в положении F49 является предпочтительными.

Также в настоящем документе описано антитело против oxMIF с пониженным потенциалом агрегации и пониженной гидрофобностью, которое, в частности, содержит переменный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:9, или переменный домен легкой цепи, характеризующийся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO:9, содержащий тирозин в положении 36, и переменный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:6 и замену аминокислоты W97Y или замены аминокислот L5Q и W97Y, или переменный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:6 с 1, 2, 3, 4 или 5 заменами аминокислот и дополнительно содержащий замену аминокислоты W97Y, необязательно в комбинации с L5Q.

Естественный тирозин в положении 36 легкой цепи оставляют немодифицированным, чтобы сохранить связывающие свойства антитела, описанного в настоящем документе. Любые модификации в указанном положении аминокислоты могут приводить к нежелательным ухудшениям связывающих свойств.

В частности, переменный домен легкой цепи содержит SEQ ID NO:10, и переменный домен тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:7.

В частности, переменный домен легкой цепи содержит SEQ ID NO:10, и переменный домен тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:8.

В частности, переменный домен легкой цепи содержит SEQ ID NO:11, и переменный домен тяжелой цепи взят из SEQ ID NO:6.

В частности, переменный домен легкой цепи содержит SEQ ID NO:11, и переменный домен тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:7.

В частности, переменный домен легкой цепи содержит SEQ ID NO:11, и переменный домен тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:8.

5 В частности, переменный домен легкой цепи содержит SEQ ID NO:12, и переменный домен тяжелой цепи взят из SEQ ID NO:6.

В частности, переменный домен легкой цепи содержит SEQ ID NO:12, и переменный домен тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:8.

10 В частности, переменный домен легкой цепи содержит SEQ ID NO:13, и переменный домен тяжелой цепи взят из SEQ ID NO:6.

В частности, переменный домен легкой цепи содержит SEQ ID NO:13, и переменный домен тяжелой цепи содержит SEQ ID NO:8.

15 Под «**эффекторной функцией**» в настоящем документе понимается биохимическое событие, которое является результатом взаимодействия Fc-области антитела с Fc-рецептором или лигандом. Эффекторные функции включают, но не ограничены АЗКЦ, АЗКФ и КЗЦ.

20 Под «**эффекторной клеткой**» в настоящем документе подразумевается клетка иммунной системы, которая экспрессирует один или более Fc-рецепторов и опосредует одну или более эффекторных функций. Эффекторные клетки включают, не ограничиваясь перечисленными, моноциты, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, эозинофилы, тучные клетки, тромбоциты, В-клетки, большие гранулярные лимфоциты, клетки Лангерганса, естественные киллерные (NK) клетки и Т-клетки, и могут происходить из
25 любого организма, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, организма человека, мыши, крысы, кролика и обезьяны. Согласно конкретному варианту реализации антитела против охMIF, описанные в настоящем документе, дополнительно имеют усиленные эффекторные функции за счет замен аминокислот в выбранных положениях в константной области тяжелой цепи. Повышенные эффекторные функции указанных антител за счет усиленной опосредованной комплементом и FcγR активности могут
30 включать усиленную комплемент-зависимую цитотоксичность (КЗЦ), антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (АЗКЦ) и/или антителозависимый клеточный фагоцитоз (АЗКФ). Опосредованная Fc-рецептором АЗКЦ представляет собой важный механизм действия, за счет которого антитела нацеливаются на пораженные заболеванием клетки для их элиминации. Когда эффекторная Fc-часть связанных с мишенью антител также связывается с рецепторами FcγRIIIA на поверхности

эффекторных клеток, происходит множественное перекрестное связывание клеток двух типов, что приводит к активации пути АЗКЦ.

Антитела с усиленной опосредованной комплементом активностью могут быть определены путем проведения клеточных анализов КЗЦ, а улучшенное связывание с С1q
5 может быть определено, например, с применением ППР или ИФА ELISA.

Улучшенную или повышенную КЗЦ-активность определяют как активность, повышенную по меньшей мере 1,5-кратно, в частности, по меньшей мере 1,6-кратно, 1,7-кратно, 1,8-кратно, 1,9-кратно, 2-кратно, 3-кратно, 4-кратно, более конкретно по меньшей мере 5-кратно, более конкретно по меньшей мере 6-кратно по сравнению с референсным,
10 т.е. немодифицированным антителом дикого типа, например, С0008.

Повышенную АЗКЦ-активность определяют как мощность (эффективность), повышенную по меньшей мере 1,5-кратно, в частности, по меньшей мере 1,6-кратно, 1,7-кратно, 1,8-кратно, 1,9-кратно, 2-кратно, 3-кратно, 4-кратно, более конкретно по меньшей мере 5-кратно, более конкретно по меньшей мере 6-кратно по сравнению с референсным
15 антителом, т.е. немодифицированным антителом дикого типа, например, С0008.

Наряду с вариабельными доменами легких и тяжелых цепей, описанными выше, антитело к охMIF может дополнительно содержать константную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:1 по меньшей мере с заменами аминокислот S239D и I332E в соответствии с системой нумерации EU, или функциональный вариант, имеющий по
20 меньшей мере 95%, в частности, по меньшей мере 96, 97, 98 или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO:1 и содержащий по меньшей мере замены аминокислот S239D, I332E, и необязательно дополнительные замены аминокислот H268F и/или S324T.

В частности, антитело к охMIF содержит константную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:2, или константную область тяжелой цепи, имеющую по
25 меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO:2 и содержащую аминокислоты 239D и 332E.

В альтернативном варианте антитело к охMIF содержит константную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:3, или константную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO:3 и
30 содержащую аминокислоты 239D, 268F, 324T и 332E.

Как вариант, антитело к охMIF может дополнительно содержать константную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO:4, или константную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO:4 и содержащую аминокислоты 239D и 332E.

Согласно другому альтернативному варианту реализации антитело против оxMIF может дополнительно содержать константную область тяжелой цепи из SEQ ID NO:5, или константную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO:5 и содержащую аминокислоты 235V, 243L, 292P, 300L и 396L.

Согласно дополнительному варианту реализации указанное антитело против оxMIF содержит последовательности SEQ ID NO:1, 7, 10 и 38. Согласно дополнительному варианту реализации указанное антитело против оxMIF содержит последовательности SEQ ID NO:2, 7, 10 и 38. Согласно дополнительному варианту реализации указанное антитело против оxMIF содержит последовательности SEQ ID NO:3, 7, 10 и 38. Согласно дополнительному варианту реализации указанное антитело против оxMIF содержит последовательности SEQ ID NO:4, 7, 10 и 38. Согласно дополнительному варианту реализации указанное антитело против оxMIF содержит последовательности SEQ ID NO:5, 7, 10 и 38. Согласно дополнительному варианту реализации указанное антитело против оxMIF содержит последовательности SEQ ID NO:1, 8, 10 и 38. Согласно дополнительному варианту реализации указанное антитело против оxMIF содержит последовательности SEQ ID NO:2, 8, 10 и 38. Согласно дополнительному варианту реализации указанное антитело против оxMIF содержит последовательности SEQ ID NO:3, 8, 10 и 38. Согласно дополнительному варианту реализации указанное антитело против оxMIF содержит последовательности SEQ ID NO:4, 8, 10 и 38. Согласно дополнительному варианту реализации указанное антитело против оxMIF содержит последовательности SEQ ID NO:5, 8, 10 и 38. Согласно дополнительному варианту реализации указанное антитело против оxMIF содержит последовательности SEQ ID NO:1, 6, 11 и 38. Согласно дополнительному варианту реализации указанное антитело против оxMIF содержит последовательности SEQ ID NO:2, 6, 11 и 38.

Согласно дополнительному варианту реализации указанное антитело против оxMIF содержит последовательности SEQ ID NO:3, 6, 11 и 38. Согласно дополнительному варианту реализации указанное антитело против оxMIF содержит последовательности SEQ ID NO:4, 6, 11 и 38. Согласно дополнительному варианту реализации указанное антитело против оxMIF содержит последовательности SEQ ID NO:5, 6, 11 и 38. Согласно дополнительному варианту реализации указанное антитело против оxMIF содержит последовательности SEQ ID NO:1, 7, 11 и 38. Согласно дополнительному варианту реализации указанное антитело против оxMIF содержит последовательности SEQ ID NO:2, 7, 11 и 38. Согласно дополнительному варианту реализации указанное антитело

NO:3, 8, 12 и 38. Согласно дополнительному варианту реализации указанное антителио против охMIF содержит последовательности SEQ ID NO:4, 8, 12 и 38. Согласно дополнительному варианту реализации указанное антителио против охMIF содержит последовательности SEQ ID NO:5, 8, 12 и 38. Согласно дополнительному варианту реализации указанное антителио против охMIF содержит последовательности SEQ ID NO:1, 6, 13 и 38. Согласно дополнительному варианту реализации указанное антителио против охMIF содержит последовательности SEQ ID NO: 2, 6, 13 и 38. Согласно дополнительному варианту реализации указанное антителио против охMIF содержит последовательности SEQ ID NO:3, 6, 13 и 38. Согласно дополнительному варианту реализации указанное антителио против охMIF содержит последовательности SEQ ID NO:4, 6, 13 и 150. Согласно дополнительному варианту реализации указанное антителио против охMIF содержит последовательности SEQ ID NO:5, 6, 13 и 38. Согласно дополнительному варианту реализации указанное антителио против охMIF содержит последовательности SEQ ID NO:1, 7, 13 и 38. Согласно дополнительному варианту реализации указанное антителио против охMIF содержит последовательности SEQ ID NO:2, 7, 13 и 38. Согласно дополнительному варианту реализации указанное антителио против охMIF содержит последовательности SEQ ID NO:3, 7, 13 и 38. Согласно дополнительному варианту реализации указанное антителио против охMIF содержит последовательности SEQ ID NO:4, 7, 13 и 38. Согласно дополнительному варианту реализации указанное антителио против охMIF содержит последовательности SEQ ID NO:5, 7, 13 и 38. Согласно дополнительному варианту реализации указанное антителио против охMIF содержит последовательности SEQ ID NO:1, 8, 13 и 38. Согласно дополнительному варианту реализации указанное антителио против охMIF содержит последовательности SEQ ID NO:2, 8, 13 и 38. Согласно дополнительному варианту реализации указанное антителио против охMIF содержит последовательности SEQ ID NO:3, 8, 13 и 38. Согласно дополнительному варианту реализации указанное антителио против охMIF содержит последовательности SEQ ID NO:4, 8, 13 и 38. Согласно дополнительному варианту реализации указанное антителио против охMIF содержит последовательности SEQ ID NO:5, 8, 13 и 38.

30 Сайт связывания охMIF антителя, описанного в настоящем документе, является специфическим в отношении окисленной формы MIF, т.е. в отношении охMIF животного, в частности, охMIF млекопитающих, например, не ограничиваясь перечисленными, мыши, крысы, обезьяны и человека, в частности, в отношении охMIF человека, однако не демонстрирует существенной перекрестной реактивности в отношении восстановленного

MIF. охMIF представляет собой связанную с заболеваниями структурную изоформу MIF, которая может быть специфически и преимущественно детектирована в кровотоке субъектов с воспалительными заболеваниями и в опухолевой ткани пациентов с раком. Согласно одному варианту реализации указанный сайт связывания гуманизованного или человеческого антитела против охMIF содержит одну или более (например, все три) из определяющих комплементарность областей легких цепей связывающего домена гуманизованного или человеческого антитела против охMIF, описанного в настоящем документе, таких как CDR, которые содержатся, например, в SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12 или 13, и/или одну или более (например, все три) из тяжелых цепей определяющих комплементарность областей связывающего домена гуманизованного или человеческого антитела против охMIF, описанного в настоящем документе, например, SEQ ID NO: 6, 7 или 8.

Специфичность связывания охMIF может быть определена с помощью любого анализа, подходящего для определения избирательного связывания с охMIF, такого как конкурентный анализ с контрольным антителом, таким как ималумаб, применительно к связыванию с охMIF, или различных анализов, известных в данной области техники и раскрытых в настоящем документе.

Термин «**антитело**» в настоящем документе применяется в самом широком смысле и охватывает полипептиды или белки, которые состоят из доменов антител или содержат домены антител, под которыми понимают константные и/или переменные домены тяжелых и/или легких цепей иммуноглобулинов, с линкерной последовательностью или без нее. Термин охватывает различные антитела структуры, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифические антитела, такие как биспецифические антитела, триспецифические антитела, и фрагменты антител, при условии, что они демонстрируют требуемую антигенсвязывающую активность, т.е. связывание с охMIF. Термин также охватывает слитые белки, такие как слитые конъюгаты с иммунотоксинами или антителами, такие как конъюгаты антител с лекарственными средствами, связывающиеся с охMIF.

Домены антител могут иметь природную структуру или быть модифицированы путем мутагенеза или дериватизации, например, для модификации антигенсвязывающих свойств или любого другого свойства, такого как стабильность, или функциональных свойств, таких как связывание с Fc-рецепторами, такими как FcRn и/или рецептор Fc-гамма. Последовательности полипептидов считают доменами антител, если они содержат

структуру бета-бочки, состоящую из по меньшей мере двух бета-цепей в структуре домена антитела, соединенных последовательностью петли.

5 Следует понимать, что термин «антитело» включает антигенсвязывающие производные и их фрагменты. Производное представляет собой комбинацию одного или более доменов антител или антител согласно настоящему изобретению и/или слитый белок, в котором любой домен антитела согласно настоящему изобретению может быть слит в любом положении с одним или более другими белками, такими как другие антитела или форматы антител, например, связывающая структура, содержащая петли CDR, рецепторный полипептид, однако также лиганды, скаффолд-белки, ферменты, метки, 10 токсины и т.п.

Термин «антитело» относится, в частности, к полипептидам или белкам, которые демонстрируют связывающие свойства в отношении целевого антигена oхMIF.

15 «**Фрагмент антитела**» относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит антигенсвязывающую часть интактного антитела, связывающую антиген, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антитела включают, не ограничиваясь перечисленным, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, одноцепочечные молекулы антител (например, scFv), слитые Fab-scFv, Fab-(scFv)₂, Fab-scFv-Fc, Fab-(scFv)₂-Fc, F(ab')₂, ScFv-Fc, диатела, кросс-Fab-фрагменты; линейные антитела; и мультиспецифические антитела, образованные фрагментами антитела. Кроме того, 20 фрагменты антитела содержат одноцепочечные полипептиды, имеющие характеристики VH-домена, а именно, способные к сборке совместно с VL-доменом, или VL-домена, а именно, способные к сборке совместно с VH-доменом в функциональный сайт связывания антигена, и таким образом обеспечивающие антигенсвязывающие свойства полноразмерных антител. Фрагменты антител в настоящем документе также включают Fc- 25 домены, содержащие одну или более областей структурных петель, содержащих антигенсвязывающие области, такие как FcabTM или полноразмерные форматы антител со структурами IgG, в которых Fc-область была заменена на FcabTM, содержащий второй отдельный сайт связывания антигена.

30 Термин «**функциональный вариант**» или «функционально активный вариант» также включает встречающиеся в природе аллельные варианты, а также мутанты или любые другие не встречающиеся в природе варианты. Как известно в данной области техники, аллельный вариант, также называемый гомологом, представляет собой альтернативную форму нуклеиновой кислоты или пептида, которая характеризуется наличием замены, делеции или добавления одного или более нуклеотидов или

аминокислот, которые по существу не изменяют биологическую функцию указанной нуклеиновой кислоты или указанного полипептида. В частности, функциональный вариант может содержать замену, делецию и/или добавление 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 остатков аминокислот, или комбинацию
5 перечисленного, причем указанные замены, делеции и/или добавления представляют собой консервативные модификации и не изменяют антигенсвязывающих свойств. В частности, функциональный вариант согласно описанию в настоящем документе содержит не более чем или до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 замен аминокислот, делеций и/или добавлений, которые представляют собой
10 консервативные модификации и не изменяют функцию антитела. В частности, функционально активный вариант согласно описанию в настоящем документе содержит до 15, предпочтительно до 10 или 5 замен аминокислот, делеций и/или добавлений, которые представляют собой консервативные модификации и не изменяют функцию антитела.

15 Функциональные варианты могут быть получены путем изменения последовательности полипептида или последовательности нуклеотидов, например, путем введения одной или более точечных мутаций, при этом при указанных изменениях последовательности сохраняется или улучшается функция неизменной последовательности полипептида или нуклеотидов, при применении в комбинации
20 согласно настоящему изобретению. Такие изменения последовательностей могут включать, не ограничиваясь перечисленными, (консервативные) замены, добавления, делеции, мутации и инсерции. Консервативные замены представляют собой замены внутри семейства аминокислот, родственных в отношении боковых цепей и химических свойств. Примерами таких семейств являются аминокислоты с основными боковыми
25 цепями, с кислотными боковыми цепями, с неполярными алифатическими боковыми цепями, с неполярными ароматическими боковыми цепями, с незаряженными полярными боковыми цепями, с боковыми цепями малого размера, с боковыми цепями большого размера и т.п.

30 Под точечной мутацией, в частности, понимается конструирование полинуклеотида, который обеспечивает экспрессию последовательности аминокислот, которая отличается от неконструированной последовательности аминокислот делецией или инсерцией, заменой или обменом на другие аминокислоты одной или более одиночных (непоследовательных) или парных аминокислот.

В настоящем документе «**Fab-фрагмент или Fab**» относится к фрагменту антитела, содержащему фрагмент легкой цепи, содержащий VL-домен и константный домен легкой цепи (CL), и VH-домен и первый константный домен (CH1) тяжелой цепи. Антитела согласно настоящему изобретению могут содержать по меньшей мере один Fab-фрагмент, отличающийся обменом либо переменных областей, либо константных областей тяжелой и легкой цепей. Из-за обмена либо переменных областей, либо константных областей, указанный Fab-фрагмент также называют «кросс-Fab-фрагментом» или «кроссоверным Fab-фрагментом». Возможны и содержатся в антителах согласно настоящему изобретению два разных состава цепей молекулы кроссоверного Fab: может быть проведен обмен переменных областей тяжелой и легкой цепи Fab, т.е. молекула кроссоверного Fab содержит пептидную цепь, состоящую из переменной области легкой цепи (VL) и константной области тяжелой цепи (CH1), и пептидную цепь, состоящую из переменной области тяжелой цепи (VH) и константной области легкой цепи (CL). Указанную молекулу кроссоверного Fab также называют CrossFab(VLVH). При обмене константных областей тяжелой и легкой цепи Fab молекула кроссоверного Fab может содержать пептидную цепь, состоящую из переменной области тяжелой цепи (VH) и константной области легкой цепи (CL), и пептидную цепь, состоящую из переменной области легкой цепи (VL) и константной области тяжелой цепи (CH1). Указанную молекулу кроссоверного Fab также называют CrossFab(CLCH1).

20 «**(scFv)₂**» относится к искусственному моноклональному антителу, которое представляет собой слитый белок, состоящий из двух одноцепочечных переменных фрагментов (scFv) либо разных антител, либо одного антитела, или последовательностей аминокислот из четырех или двух разных генов, на одной пептидной цепи размером приблизительно 50 килодальтон.

25 «**bs(scFv)₂**» относится к искусственному моноклональному антителу, которое представляет собой слитый белок, состоящий из двух одноцепочечных переменных фрагментов (scFv) антител с разными целевыми антигенами, или последовательностей аминокислот из четырех разных генов, на одной пептидной цепи размером приблизительно 50 килодальтон.

30 «**Одноцепочечный Fab-фрагмент**» или «**scFab**» представляет собой полипептид, состоящий из переменной домена тяжелой цепи (VH) антитела, константного домена 1 (CH1) антитела, переменной домена легкой цепи (VL) антитела, константного домена легкой цепи (CL) антитела и линкера, отличающийся тем, что указанные домены антитела и указанный линкер могут быть расположены в следующем порядке в направлении от N-

конца к С-концу: VH-CH1-линкер-VL-CL, VL-CL-линкер-VH-CH1, VH-CL-линкер-VL-CH1 или VL-CH1-линкер-VH-CL; и тем, что указанный линкер представляет собой полипептид длиной по меньшей мере 20 аминокислот, по меньшей мере 30 аминокислот, в частности, от 32 до 50 аминокислот. Указанные одноцепочечные Fab-фрагменты VH-CH1-линкер-VL-CL, VL-CL-линкер-VH-CH1, VH-CL-линкер-VL-CH1 и VL-CH1-линкер-VH-CL, могут быть стабилизированы за счет естественной дисульфидной связи между CL-доменом и CH1-доменом. Кроме того, указанные одноцепочечные молекулы Fab могут быть дополнительно стабилизированы за счет образования межцепочечных дисульфидных связей посредством инсерции остатков цистеина.

10 Термин «N-конец» обозначает последнюю аминокислоту N-конца.

Термин «С-конец» обозначает последнюю аминокислоту С-конца.

«ViTE», или «биспецифический активатор Т-клеток» относится к искусственному моноклональному антителу, который представляет собой слитый белок, состоящий из двух одноцепочечных переменных фрагментов (scFv) разных антител, или последовательностей аминокислот из четырех разных генов, на одной пептидной цепи размером приблизительно 50 килодальтон. Один из scFv может, например, но без ограничений, связываться с Т-клеткой, например, через CD3, а другой – с опухолевой клеткой через oхMIF. В частности, размер ViTE составляет приблизительно 50 кДа.

Термин «минитело» относится к антителу, которое состоит из пары одноцепочечных Fv-фрагментов, соединенных посредством CH3-доменов (одноцепочечных Fv-CH3), и Fv с другой специфичностью, который спарен с первой частью посредством процесса гетеродимеризации (Hu S.Z. et al., 1996, Cancer Research, 56, 3055-3061). Чтобы способствовать эффективности гетеродимеризации, мутации одного остатка могут быть введены в каждый из CH3-доменов для реализации способа «выступы-во-впадинах». Более того, дополнительные остатки цистеина также могут быть введены в CH3-домены для стабилизации структуры биспецифического минитела. Вариант минитела, минитело TriVi, содержит цепь, которая разработана для распознавания антигенов за счет двух Fv-фрагментов, тогда как другая цепь, содержащая Fv-фрагмент, отвечает за привлечение эффекторных клеток, таких как цитотоксические Т-клетки или НК-клетки. За счет добавления указанного дополнительного связывающего домена, avidность минитела TriVi выше чем у биспецифического минитела. В частности, размер указанного минитела составляет приблизительно 75 кДа.

Термин «DART®» относится к перенаправляемым антителам с двойной аффинностью, которые представляют собой простейшую форму биспецифических

антител (BsAb). Молекула DART состоит из двух сконструированных Fv-фрагментов, в которых проведен обмен собственного VH на другой VH. Fv1 состоит из VH из антитела А и VL из антитела В, а Fv2 состоит из VH из Ab-B и VL из Ab-A. Указанный обмен между антителами в Fv-доменах снимает конформационные ограничения во вариантах
5 фрагментов, обусловленные коротким соединяющим пептидом.

Термин «**DutaMab™**» относится к формату BsAb, образованному путем соединения двух независимых паратопов в одной иммуноглобулиновой цепи.

Термин «**TandAb®**» или «тандемное антитело» относится к антителам, содержащим в тандеме две пары VL/VH из двух отдельных Fv, что также означает, что
10 тандемные антитела не несут Fc-доменов. TandAb имеют меньший размер, чем целые IgG или происходящие из IgG биспецифические антитела, но больший размер, чем однодоменные биспецифические антитела. Средний размер также обеспечивает повышенную способность TandAb к проникновению в ткани и более продолжительное время полужизни в сыворотке. Кроме того, свойство тетравалентности, то есть
15 бивалентность в отношении каждого из антигенов, может повышать эффективность связывания и последующий терапевтический исход. В частности, размер TandAb составляет приблизительно 100 кДа.

Термин «**диатело**» относится к нековалентному димеру одноцепочечного Fv-фрагмента (scFv), который состоит из вариабельной области тяжелой цепи (V_H) и
20 вариабельной области легкой цепи (V_L), соединенных пептидным линкером малого размера. Другая форма диатела представлена одноцепочечным (Fv)₂, в котором два scFv-фрагмента ковалентно связаны между собой. Кроме того, при тандемном соединении генов в каждой цепи внутренним линкером четыре VH- и VL-домена могут быть экспрессированы в тандеме и уложены в виде одноцепочечного диатела (scDb), что также
25 является эффективной стратегией получения биспецифического антитела. Кроме того, слияние рекомбинантных вариабельных доменов с Fc-областью или CH3-доменом (scDb-Fc и scDb-CH3, диатело-CH3) может удваивать валентность конечного продукта. Увеличенный размер может также продлевать время полужизни диатела в сыворотке. В частности, размер диатела-CH3 составляет приблизительно 125 кДа.

Термин «**crossMab®**» (где «mab» относится к моноклональному антителу) представляет собой формат биспецифических антител, происходящих из независимых исходных антител. Ошибочного спаривания тяжелых цепей избегают, применяя метод «выступов во впадинах» («knobs-into-holes», КИН). Ошибочного спаривания легких цепей избегают за счет того, что биспецифическое антитело продуцируют, используя обмен в

доменах антитела, когда внутри одного Fab-плеча переменные домены или константные домены (CL и CH1) легких и тяжелых цепей меняют местами. Указанный «кроссовер» обеспечивает сохранение аффинности связывания антигена, а также сохранение двух разных плеч для исключения ошибочного спаривания легких цепей. Примерами CrossMab

5 могут быть, не ограничиваясь перечисленными, Fab, VH-VL и CH1-CL, прошедшие обмен в разных областях. В антителах Fab CrossMab проведен обмен полных областей VH-CH1 и VL-CL; в формате VH-VL CrossMab проведен обмен только VH- и VL-областей; в формате CH1-CL1 CrossMab проведен обмен CH1- и CL-областей биспецифического антитела. В частности, размер CrossMab составляет приблизительно 150 кДа.

10 Термин «IgG-scFv» относится к виду биспецифических антител, биспецифичность которых конструируют путем слияния двух scFv, соответствующим образом, с моноспецифическим IgG. Специфичность может быть одинаковой у всех scFv или разной. Кроме того, аминоконец или C-конец каждой из легких или тяжелых цепей может быть дополнен спаренными переменными доменами антитела, что приводит к получению

15 разнообразных типов IgG-scFv BsAb: IgG(H)-scFv или scFv-(H)IgG: IgG(H)-scFv, два scFv с одинаковой специфичностью, соединенных с C-концом полноразмерного IgG HC; scFv-(H)IgG, который идентичен IgG(H)-scFv, за исключением того, что scFv-фрагменты соединены с N-концом HC. IgG(L)-scFv или scFv-(L)IgG: два одинаковых scFv соединены с C- или N-концом легкой цепи IgG, с образованием IgG(L)-scFv или scFv-(L)IgG, соответственно. 2scFv-IgG или IgG-2scFv: получают путем слияния двух спаренных scFv с разной специфичностью с N-концом (2scFv-IgG) или C-концом (IgG-2scFv). В частности, размер IgG(H)-scFv составляет приблизительно 200 кДа.

20

В соответствии с конкретным вариантом реализации антитела, описанные в настоящем документе, могут содержать одну или более меток для очищения и/или

25 детекции, таких как, не ограничиваясь перечисленными, аффинные метки, усиливающие растворимость метки и метки для мониторинга.

В частности, аффинную метку выбирают из группы, состоящей из полигистидиновой метки, полиаргининовой метки, пептидного субстрата для антител, хитин-связывающего домена, S-пептид РНКазы, белка А, β-галактозидазы, метки FLAG, метки Strep-tag II, стрептавидин-связывающей пептидной метки (SBP), кальмодулин-связывающего пептида (CBP), глутатион-S-трансферазы (GST), мальтоза-связывающего белка (MBP), S-метку, HA-метку и метку с-Мус, в частности, указанная метка представляет собой His-метку, содержащую один или более остаток гистидина, такую как гексагистидиновая метка.

30

Под «**слитым**» или «**соединенным**» подразумевается, что компоненты (например, молекула Fab и субъединица Fc-домена) соединены пептидными связями, прямо либо посредством одного или более пептидных линкеров.

5 Термин «**линкер**» в настоящем документе относится к пептидному линкеру и предпочтительно представляет собой пептид с последовательностью аминокислот, имеющей длину 2, 3, 4, 5, 6, 7 или более аминокислот, предпочтительно имеющей длину 2–10, более предпочтительно 3–5 аминокислот.

10 Термин «**иммуноглобулин**» относится к белку, имеющему структуру встречающегося в природе антитела. Например, иммуноглобулины класса IgG представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины размером приблизительно 150 000 дальтон, состоящие из двух легких цепей и двух тяжелых цепей, связанных дисульфидными связями. В направлении от N-конца к C-концу в каждой тяжелой цепи расположена переменная область (VH), также называемая переменным тяжелым доменом или переменным доменом тяжелой цепи, за которым следуют три константных домена (CH1, CH2 и CH3), также называемых константной областью тяжелой цепи. Аналогичным образом, в направлении от N-конца к C-концу в каждой легкой цепи расположена переменная область (VL), также называемая переменным легким доменом или переменным доменом легкой цепи, за которым следует константный легкий (CL) домен, также называемый константную область легкой цепи.

20 Иммуноглобулин класса IgG по существу состоит из двух молекул Fab и Fc-домена, соединенных шарнирной областью иммуноглобулина. Тяжелая цепь иммуноглобулина может быть отнесена к одному из пяти типов, называемых α (IgA), δ (IgD), ϵ (IgE), γ (IgG) или μ (IgM), некоторые из которых могут быть дополнительно подразделены на подтипы, например, γ_1 (IgG₁), γ_2 (IgG₂), γ_3 (IgG₃), γ_4 (IgG₄), α_1 (IgA₁) и α_2 (IgA₂). Легкая цепь иммуноглобулина может быть отнесена к одному из двух типов, называемых каппа (κ) и лямбда (λ).

30 Термин «**химерное антитело**» относится к антителу, в котором часть тяжелой и/или легкой цепей происходит из конкретного источника или вида, а остальные части тяжелой и/или легкой цепей происходят из другого источника или вида, как правило, получаемому с применением методик рекомбинантной ДНК. Химерные антитела могут содержать переменную область от кролика или мыши и константную область от человека. Химерные антитела являются продуктом экспрессированных генов иммуноглобулинов, содержащих сегменты ДНК, кодирующие переменные области иммуноглобулинов, и сегменты ДНК, кодирующие константные области

иммуноглобулинов. Способы получения химерных антител включают стандартные методики рекомбинантной ДНК и генной трансфекции, хорошо известны в данной области техники (Morrison, S.L., et al., 1984).

5 «**Антитело человека**» (человеческое антитело) обладает последовательностью аминокислот, которая соответствует последовательности, продуцируемой человеком или клеткой человека, или последовательности, происходящей не из человеческого источника, использующего репертуары антител человека или другие последовательности, кодирующие антитела человека. Указанное определение антитела человека, в частности, исключает гуманизированное антитело, содержащее не человеческие
10 антигенсвязывающие остатки. Как упоминалось также для химерных и гуманизированных антител, термин «антитело человека» в настоящем документе также охватывает такие антитела, которые модифицированы в константной области, например, путем «переключения классов», т.е. изменения или мутаций Fc-частей (например, с IgG1 на IgG4, и/или путем мутации IgG1/IgG4).

15 Подразумевается, что термин «**рекомбинантное антитело человека**» в настоящем документе включает все антитела человека, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными способами, например, антитела, выделенные из клетки-хозяина, такой как клетка НЕК, NS0 или CHO, или из животного (например, мыши), трансгенной по генам иммуноглобулинов человека, или антитела, экспрессированные с
20 применением рекомбинантного экспрессионного вектора, которым трансфицировали клетку-хозяина. Последовательности аминокислот VH- и VL-областей рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя и происходят из последовательностей зародышевой линии человека и родственны им, могут не существовать в природе в репертуаре антител человека *in vivo*.

25 «**Консенсусный каркас человека**» представляет собой каркас, который представляет наиболее часто встречающиеся остатки аминокислот в выборке каркасных последовательностей VL или VH иммуноглобулина человека. Как правило, выборка последовательностей VL или VH иммуноглобулина человека взята из подгруппы последовательностей переменных доменов. Как правило, подгруппа
30 последовательностей представляет собой подгруппу согласно описанию в источнике Kabat et al., 1991.

«**Гуманизированное**» антитело относится к химерному антителу, содержащему остатки аминокислот из ГВО не от человека и остатки аминокислот из каркасных областей человека (FR), которые прошли гуманизацию. Согласно некоторым вариантам реализации

гуманизированное антитело содержит по существу все из по меньшей мере одного, и, как правило, двух переменных доменов, где все или по существу все из ГВО (например, CDR) соответствуют ГВО из антитела не от человека, и все или по существу все из FR соответствуют FR из человеческого антитела. Гуманизированное антитело необязательно
5 может содержать по меньшей мере часть константной области антитела, происходящей из человеческого антитела. Другие формы гуманизированных антител, охваченные настоящим изобретением, представлены такими гуманизированными антителами, где константная область была дополнительно модифицирована или изменена относительно константной области исходного антитела с получением новых свойств, например,
10 относящихся к связыванию C1q и/или связыванию Fc-рецептора (FcR).

Термин «**биспецифические**» в настоящем документе относится к реакции связывания по меньшей мере с антигеном оxMIF и дополнительным антигеном, таким как, не ограничиваясь указанным, например, антиген CD3. Биспецифическое антитело, в частности, может содержать по меньшей мере два сайта со специфическими
15 связывающими свойствами, отличающиеся тем, что указанное антитело распознает два разных целевых антигена, оxMIF и дополнительный антиген. Пример формата биспецифического антитела может включать два сайта связывания, причем каждый из указанных сайтов связывания способен специфически связывать другой антиген, например, CD3 и оxMIF. Дополнительный пример биспецифического формата может
20 содержать более чем два сайта связывания, причем один или более сайтов связывания связываются с оxMIF, и один или более сайтов связывания способны специфически связывать один или более других антигенов, например, CD3.

«**Биспецифические антитела**» в соответствии с настоящим изобретением представляют собой антитела, которые имеют две разных специфичности связывания.
25 Биспецифические антитела могут быть получены в виде полноразмерных антител или фрагментов антител согласно описанию в настоящем документе. Гетеродимеры Fc иммуноглобулинов могут быть сконструированы путем внесения модификаций в интерфейс СНЗ-домена, с разными мутациями в каждом домене, таким образом, что сконструированные Fc-фрагменты, несущие вариант пары СНЗ, преимущественно образуют гетеродимеры, а не гомодимеры (Ha J-H. et al., 2016). Примеры форматов
30 биспецифического антитела могут представлять собой, не ограничиваясь перечисленными, биспецифические IgG (BsIgG), IgG с добавленным дополнительным антигенсвязывающим фрагментом, фрагменты BsAb, биспецифические слитые белки, конъюгаты BsAb, гибридные bsIgG, содержащие только переменный домен молекулы

биспецифических антител, слитые белки CH1/CL, слитые Fab-белки, модифицированные слитые Fc- и CH3-белки с добавленными слитыми IgG-НС, с добавленными слитыми IgG-LC, с добавленными слитыми IgG-НС и слитыми LC, слитые Fc, слитые CH3, слитые IgE/IgM CH2, слитые F(ab')₂, CH1/CL, модифицированные IgG, слитые
5 неиммуноглобулиновые белки, Fc-модифицированные IgG, диатела и т.п., согласно описанию в Spiess C. et al., 2015, и Brinkmann U. and Kontermann R.E., 2017.

Антитело к охMIF согласно настоящему изобретению может дополнительно содержать по меньшей мере один сайт связывания, в частности, распознающий дополнительный эпитоп, например, эпитоп CD3, в частности, эпитоп CD3 человека,
10 включающего цепь CD3 γ (гамма), цепь CD3 δ (дельта) и две цепи CD3 ϵ (эпсилон), которые присутствуют на поверхности клеток. Кластеризация CD3 на Т-клетках, например, как иммобилизованными антителами против CD3, приводит к активации Т-клеток, аналогичной активации, задействующей Т-клеточный рецептор, но независимо от клонотипической специфичности. Согласно некоторым вариантам реализации указанный
15 связывающий CD3 домен антитела, описанного в настоящем документе, проявляет не только высокую аффинность связывания в отношении CD3 человека, но и демонстрирует превосходную перекрестную реактивность в отношении соответствующих белков CD3 яванского макака. В некоторых случаях связывающий CD3 домен антитела вступает в перекрестные реакции с CD3 яванского макака. Согласно одному варианту реализации
20 указанный сайт связывания антитела против CD3 содержит одну или более (например, все три) определяющих комплементарность областей легких цепей связывающего домена антитела против CD3, описанного в настоящем документе, и/или одну или более (например, все три) определяющих комплементарность областей тяжелых цепей связывающего домена антитела против CD3, описанного в настоящем документе,
25 например, связывающего домена антитела против CD3, содержащего одну или более, например, все три LC CDR и одну или более, например, все три HC CDR.

В частности, указанное антитело против охMIF обладает второй или дальнейшей специфичностью связывания, которая направлена на CD3 согласно описанию в WO2019234241A1. Такое биспецифическое антитело против охMIF может содержать сайт
30 связывания, специфично распознающий CD3, который содержит

- (a) переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDR1-H2, которая содержит или имеет по меньшей мере 70%, в частности, 80%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательностей с любой из

последовательностей, выбранных из группы, состоящей из RYTMH (SEQ ID NO:14), GYGMH (SEQ ID NO:15) и SFPMA (SEQ ID NO:16), и

5 CDR2-H2, которая содержит или имеет по меньшей мере 70%, в частности, 80%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательностей с любой из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из YINPSRGYTNYNQKFKD (SEQ ID NO:17), VIWYDGSKKYYVDSVKG (SEQ ID NO:18) и TISTSGGRYYRDSVKG (SEQ ID NO:19), и

10 CDR3-H2, которая имеет по меньшей мере 70%, в частности, 80%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательностей с любой из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из YYDDHYCLDY (SEQ ID NO:20), QMGYWHFDL (SEQ ID NO:21), FRQYSGGFDY (SEQ ID NO:22) и YYDDHYSLDY (SEQ ID NO:23), и

(b) вариабельную область легкой цепи, содержащую

15 CDR1-L2, которая содержит или имеет по меньшей мере 70%, в частности, 80%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательностей с любой из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из RASSSVSYMN (SEQ ID NO:24), SASSSVSYMN (SEQ ID NO:25), RASQSVSSYLA (SEQ ID NO:26) и TLSSGNIENNYVH (SEQ ID NO:27), и

20 CDR2-L2, которая содержит или имеет по меньшей мере 70%, в частности, 80%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательностей с любой из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из DTSKVAS (SEQ ID N: 28), DTSKLAS (SEQ ID:NO 29), DASNRAT (SEQ ID NO:30) и DDDKRPD (SEQ ID NO:31), и

25 CDR3-L2, которая содержит или имеет по меньшей мере 70%, в частности, 80%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательностей с любой из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из QQWSSNPLT (SEQ ID NO:32), QQWSSNPFT (SEQ ID NO:33), QQRSNWPPLT (SEQ ID NO:34), SQWLYGMDV (SEQ ID NO:35) и QQWSSNP (SEQ ID NO:36).

Более конкретно, биспецифическое антитело против охMIF/ против CD3 содержит 0, 1 или 2 точечные мутации в каждой из последовательностей CDR, перечисленных выше.

30 Дополнительный конкретный вариант относится к bs(scFv)₂ против охMIF/ против CD3, отличающемуся тем, что соответствующие вариабельные области тяжелых цепей (VH) и соответствующие вариабельные области легких цепей (VL) располагаются, в направлении от N-конца к C-концу, в порядке: VH(охMIF)-V_L(охMIF)-VH(CD3)-VL(CD3), VH(CD3)-VL(CD3)-VH(охMIF)-VL(охMIF) или VH(CD3)-VL(CD3)-VL(охMIF)-VH(охMIF).

Согласно дополнительному варианту реализации указанное антитело представляет собой биспецифическое антитело, в частности, выбранное из группы, состоящей из биспецифического IgG, IgG, дополненного сайтом связывания CD3, фрагментами BsAb, биспецифическими слитыми белками, конъюгатами BsAb.

5 Термин «**антиген**» в настоящем документе, взаимозаменяемо с терминами «**мишень**» или «**целевой антиген**», относится к целой целевой молекуле или фрагменту такой молекулы, распознаваемой (распознаваемому) сайтом связывания антитела. В частности, такой сайт связывания может распознавать субструктуры антигена, такие как, например, полипептидная или углеводная структура, обычно называемые «эпитопами»,
10 например, В-клеточные эпитопы или Т-клеточный эпитоп, который иммунологически релевантны.

Термин «**эпитоп**» в настоящем документе, в частности, относится к молекулярной структуре, из которой может полностью состоять партнер для специфического связывания, или которая может входить в состав партнера для специфического связывания
15 с сайтом связывания антитела в формате согласно настоящему изобретению. Эпитоп может состоять из углевода, либо из пептидной структуры, жирной кислоты, органического, биохимического или неорганического вещества или его производных, и любых комбинаций перечисленного. Если эпитоп входит в состав пептидной структуры, такой как пептид, полипептид или белок, он обычно включает по меньшей мере 3
20 аминокислоты, в частности, 5–40 аминокислот, и в частности, менее чем 10 аминокислот, в частности, от 4 до 10 аминокислот. Эпитопы могут представлять собой линейные или конформационные эпитопы. Линейный эпитоп состоит из единственного сегмента первичной последовательности полипептидной или углеводной цепи. Линейные эпитопы могут быть непрерывными или перекрывающимися. Конформационные эпитопы состоят
25 из аминокислот или углеводов, сближающихся при укладке полипептида с образованием третичной структуры, и аминокислоты не обязательно являются смежными в линейной последовательности. Такой эпитоп оxMIF может представлять собой последовательность EPCALCS (SEQ ID NO:43), локализованную в центральной области оxMIF.

Термин «**антигенсвязывающий домен**» или «связывающий домен» или «сайт
30 связывания» относится к части антигенсвязывающего фрагмента, которая содержит область, которая специфически связывает и комплементарна части антигена или всему антигену. Если антиген имеет значительный размер, антигенсвязывающая молекула может связываться только с конкретной частью антигена, и эта часть называется эпитопом. Антигенсвязывающий домен может быть обеспечен, например, одним или более

вариабельными доменами антитела (также называемыми вариабельными областями антитела). Предпочтительно, антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область легкой цепи (VL) антитела и вариабельную область тяжелой цепи (VH) антитела.

5 Термин «**сайт связывания**» в настоящем документе применительно к антителу согласно настоящему изобретению относится к молекулярной структуре, способной к связывающему взаимодействию с антигеном. Как правило, сайт связывания локализован в определяющей комплементарности области (CDR) антитела, в настоящем документе также называемой «сайт связывания CDR», представляющей собой конкретную область с различающимися структурами, обеспечивающими функцию связывания с различными антигенами. Указанные различающиеся структуры могут происходить из естественных репертуаров антител, например, репертуаров мыши или человека, или могут быть получены рекомбинантным или синтетическим способом, например, посредством мутагенеза и, в частности, с применением методик рандомизации. Указанные методики включают подвергнутый мутагенезу CDR-области, области петель вариабельных доменов антител, в частности, петли CDR антител, такие как петли CDR1, CDR2 и CDR3 любых VL- и/или VH-доменов антитела. Формат антитела в соответствии с настоящим изобретением, как правило, содержит один или более сайтов связывания в CDR, каждый из которых специфичен в отношении некоторого антигена.

20 Термин «**специфический**» («специфичный») в настоящем документе относится к реакции связывания, определяющей представляющий интерес когнатный лиганд в гетерогенной популяции молекул. В данном случае имеется в виду реакция связывания по меньшей мере с антигеном oхMIF. Соответственно, в заданных условиях, например, в условиях иммунологического анализа, антитело, которое специфически связывается с конкретной мишенью, не связывается в значительном количестве с другими молекулами, присутствующими в образце, в частности, не демонстрирует существенной перекрестной реактивности в отношении восстановленного MIF.

30 Сайт специфического связывания, как правило, не обладает перекрестной реактивностью в отношении других мишеней. Тем не менее, сайт специфического связывания может специфически связываться с одним или более эпитопами, изоформами или вариантами мишени, или обладать перекрестной реактивностью в отношении других родственных целевых антигенов, например, гомологов или аналогов.

Специфическое связывание означает, что связывание является избирательным в отношении идентичности мишени, высокой, средней или низкой аффинности связывания или avidности связывания, по выбору. Избирательное связывание, как правило,

достигается, если константа связывания или динамика связывания с целевым антигеном, таким как охМIF, отличается по меньшей мере в 10 раз, предпочтительно отличается по меньшей мере в 100 раз, и более предпочтительно по меньшей мере в 1000 раз от константы связывания или динамики связывания с антигеном, который не является

5 целевым антигеном.

Термин «**валентный**» в настоящем документе означает присутствие определенного числа сайтов связывания в молекуле антитела. Соответственно, термины «бивалентный», «тетравалентный» и «гексавалентный» означают присутствие двух сайтов связывания, четырех сайтов связывания и шести сайтов связывания, соответственно, в

10 молекуле антитела.

Термин «**моновалентный**» в настоящем документе применительно к сайту связывания антитела относится к молекуле, содержащей только один сайт связывания, направленный против целевого антигена. Термин «валентность», соответственно, понимается как число сайтов связывания, направленных против одного и того же целевого

15 антигена, специфически связывающие одни и те же или разные эпитопы антигена.

Предполагается, что антитело согласно настоящему изобретению содержит моновалентный, бивалентный, тетравалентный или мультивалентный сайт связывания, специфически связывающий охМIF.

В соответствии с дополнительным вариантом реализации указанное антитело

20 может содержать один или более дополнительных сайтов связывания, в частности, распознающих один или более антигенов, экспрессируемых на эффекторных Т-клетках, НК-клетках или макрофагах, в частности, один или более из CD3, ADAM17, CD2, CD4, CD5, CD6, CD8, CD11a, CD11b, CD14, CD16, CD16b, CD25, CD28, CD30, CD32a, CD40, CD 40L, CD44, CD45, CD56, CD57, CD64, CD69, CD74, CD89, CD90, CD137, CD177,

25 CEACAM6, CEACAM8, цепи HLA-DRA, KIR, лектина LSEC или SLC44A2.

В соответствии с альтернативным вариантом реализации антитело согласно настоящему изобретению представляет собой биспецифическое антитело, дополнительно содержащее один или более переменных связывающих CD3 доменов мосунетуумаба, пазотуксизумаба, цибисатаумаба, отеликсизумаба, теплизумаба, визилизумаба или

30 форалумаба.

В соответствии с конкретным вариантом реализации сайт связывания антитела против CD3 содержит определяющие комплементарность области (CDR), выбранные из группы, состоящей из муромонаба-CD3 (ОКТ3), отеликсизумаба (TRX4), теплизумаба (MGA031), визилизумаба (Nuvion), солитоумаба, блинатумумаба, пазотуксизумаба,

цибисатамаба, мосунетузумаба, SP34, X35, 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, OKT3D, M-T301, SMC2, F101.01, UCHT-1 и WT-31 и любых их гуманизированных производных, если это применимо.

5 В частности, одна или более CDR переменных областей антитела против CD3 или CDR, содержащих или имеющих по меньшей мере 70%, в частности, 80%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательностей с любыми из последовательностей CDR муромонаба, отеликсизумаба, теплизумаба, визилизумаба, солиномаба, блинатумомаба, пазотуксизумаба, цибисатамаба, мосунетузумаба, могут применяться в качестве
10 связывающих CD3 доменов в соответствии с настоящим изобретением.

Термин «гипервариабельная область» или «ГВО» в настоящем документе относится к каждой из областей переменного домена антитела, последовательность которых является гипервариабельной и/или которые образуют структурно определенные петли («гипервариабельные петли»). Как правило, природные четырехцепочечные
15 антитела содержат шесть ГВО; три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3). ГВО обычно содержат остатки аминокислот из гипервариабельных петель и/или из «определяющих комплементарность областей» (CDR), причем последние имеют наиболее высокую
20 вариабельность последовательностей и/или вовлечены в распознавание антигенов (Kabat et al., 1991) Гипервариабельные области (ГВО) также называют определяющими комплементарность областями (CDR), и эти термины используются в настоящем документе взаимозаменяемо в отношении частей переменной области, образующих
25 антигенсвязывающие области. Точные номера остатков, составляющих конкретную CDR, варьируют в зависимости от последовательности и размера CDR. Специалисты в данной области техники могут обычными способами определить, какие остатки содержатся в конкретной CDR, при известной последовательности аминокислот переменной области антитела.

У Kabat определена система нумерации для последовательностей переменных областей, применимая к любому антителу. Специалист в данной области техники сможет однозначно определить нумерацию в любой последовательности переменной области с
30 применением указанной системы «нумерации по Kabat», не полагаясь на какие-либо экспериментальные данные помимо собственно последовательности. Нумерация остатков по Kabat может быть определена для заданного антитела путем выравнивания в областях гомологии последовательности антитела со «стандартной» последовательностью с нумерацией по Kabat. В настоящем документе «нумерация по Kabat» относится к системе

нумерации, представленной в источнике: Kabat et al., 1983, U.S. Dept. of Health and Human Services, «Sequence of Proteins of Immunological Interest». Если не указано иное, ссылки на нумерацию конкретных положений остатков аминокислот вариабельной области антитела соответствуют системе нумерации Kabat. Нумерация константной области соответствуют системе нумерации EU.

5 CDR также содержат «определяющие специфичность остатки», или «SDR», представляющие собой остатки, которые контактируют с антигеном. SDR содержатся в областях CDR, называемых «сокращенными CDR», или «a-CDR». Если не указано иное, остатки ГВО и другие остатки в вариабельном домене (например, остатки FR) пронумерованы в настоящем документе по Kabat et al., *выше*.

10 Под «точечной мутацией», в частности, понимают конструирование полинуклеотида, который обеспечивает экспрессию последовательности аминокислот, которая отличается от неконструированной последовательности аминокислот делецией или инсерцией, заменой или обменом на другие аминокислоты одной или более
15 одиночных (непоследовательных) аминокислот или парных аминокислот. Предпочтительные точечные мутации относятся к обмену аминокислот на аминокислоты с такой же полярностью и/или зарядом. В данном случае аминокислоты относятся к двадцати встречающимся в природе аминокислотам, кодируемым 61 триплетными кодоном. Указанные 20 аминокислот могут быть разделены на имеющие нейтральный
20 заряд, положительный заряд и отрицательный заряд.

«Процент (%) идентичности последовательностей» применительно к последовательностям полипептидов, идентифицированным в настоящем документе, определен как процент остатков аминокислот в кандидатной последовательности, которые идентичны остаткам аминокислот в конкретной последовательности полипептида после
25 выравнивания указанной последовательности и введения пропусков, при необходимости, для достижения максимального процента идентичности последовательностей, без учета каких-либо консервативных замен, которые считают составляющей частью идентичности последовательностей. Специалисты в данной области техники смогут определить подходящие показатели для измерения выравнивания, в том числе любые алгоритмы,
30 необходимые для достижения максимального выравнивания полноразмерных сравниваемых последовательностей.

В соответствии с настоящим изобретением идентичность последовательностей вариабельных или константных областей соответствующим последовательностям,

описанным в настоящем документе, составляет по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100%.

5 «**Субъект**» представляет собой млекопитающее. Млекопитающие включают, не ограничиваясь перечисленными, одомашненных животных (например, коров, овец, кошек, собак и лошадей), приматов (например, человека и не являющегося человеком примата, например, обезьян), кроликов и грызунов (например, мышей и крыс). Согласно некоторым вариантам реализации индивидуум или субъект представляет собой человека.

10 «**Выделенная нуклеиновая кислота**» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая была отделена от компонента ее естественного окружения. Выделенная нуклеиновая кислота включает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащуюся в клетках, которые в норме содержат указанную молекулу нуклеиновой кислоты, однако указанная молекула нуклеиновой кислоты присутствует в них экстрахромосомно или в хромосомном расположении, отличном от естественного хромосомного расположения.

15 «**Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело против оxMIF**» относится к одной или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелые и легкие цепи антитела (или их фрагменты), в том числе такой молекуле (молекулам) нуклеиновой кислоты в одном векторе или в отдельных векторах, и такой молекуле (молекулам) нуклеиновой кислоты, присутствующей в одном или более местоположении в клетке-хозяине.

20 «**Отсутствие перекрестной реактивности по существу**» означает, что молекула (*например*, антитело) не распознает или специфически не связывает антиген, отличный от фактического целевого антигена указанной молекулы (например, антиген, близкородственный целевому антигену), в частности, восстановленный MIF, в частности, по сравнению с указанным целевым антигеном. Например, антитело может связываться с 25 антигеном, отличным от фактического целевого антигена, на уровне от менее чем приблизительно 10% до менее чем приблизительно 5%, или может связывать указанный антиген, отличный от фактического целевого антигена, на уровне менее чем приблизительно 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,2% или 0,1%, предпочтительно менее чем приблизительно 2%, 1% или 0,5%, и наиболее 30 предпочтительно менее чем приблизительно 0,2% или 0,1%. Связывание может быть определено любым способом, известным в данной области техники, таким как, не ограничиваясь перечисленным, ИФА ELISA или поверхностный плазмонный резонанс.

Рекомбинантное получение антитела согласно настоящему изобретению предпочтительно задействует экспрессионную систему, включая, например,

экспрессионные конструкции или векторы, содержащие последовательность нуклеотидов, кодирующую указанный формат антитела.

Термин «**экспрессионная система**» относится к молекулам нуклеиновой кислоты, содержащим требуемую кодирующую последовательность и контрольные последовательности в функциональной связи, таким образом, чтобы хозяева, трансформированные или трансфицированные указанными последовательностями, способны продуцировать кодируемые белки. Для осуществления трансформации экспрессионная система может быть включена в вектор; тем не менее, релевантная ДНК может затем также быть интегрирована в хромосому хозяина. Как вариант, экспрессионная система может применяться для *in vitro* транскрипции/трансляции.

«**Экспрессионные векторы**», применяемые согласно настоящему изобретению, определены как последовательности ДНК, необходимые для транскрипции клонированных рекомбинантных последовательностей нуклеотидов, т.е. рекомбинантных генов, и трансляции их мРНК в организме подходящего хозяина. Экспрессионные векторы содержат экспрессионную кассету и, кроме того, обычно содержат точку начала автономной репликации в клетках-хозяевах или сайт геномной интеграции, один или более селективируемых маркеров (например, ген синтеза аминокислоты или ген, придающий устойчивость к антибиотикам, таким как зеоцин, канамицин, G418 или гигромицин), несколько сайтов расщепления ферментами рестрикции, последовательность подходящего промотора и терминатора транскрипции; указанные компоненты функционально связаны друг с другом. Термины «плазмида» и «вектор» в настоящем документе включают автономно реплицирующиеся последовательности нуклеотидов, а также последовательности нуклеотидов для геномной интеграции.

В частности, термин относится к основе, с помощью которой последовательность ДНК или РНК (например, чужеродный ген), например, последовательность нуклеотидов, кодирующую формат антитела согласно настоящему изобретению, может быть введена в клетку-хозяина, чтобы трансформировать хозяина и способствовать экспрессии (например, транскрипции и трансляции) введенной последовательности. Плазмиды являются предпочтительными векторами согласно настоящему изобретению.

Векторы, как правило, содержат ДНК трансмиссивного агента, в который инсертируют чужеродную ДНК. Обычный способ инсерции одного сегмента ДНК в другой сегмент ДНК включает применение ферментов, называемых ферментами рестрикции, которые расщепляют ДНК в конкретных сайтах (конкретных группах нуклеотидов), называемых сайтами рестрикции.

«**Кассета**» относится к кодирующей последовательности ДНК или сегменту ДНК, которая(ый) кодирует экспрессионный продукт и может быть встроен(а) в вектор в заданных сайтах рестрикции. Сайты рестрикции в кассетах разработаны для обеспечения инсерции кассеты в нужную рамку считывания. Обычно чужеродную ДНК инсертируют (встраивают, «вставляют») в один или более сайтов рестрикции векторной ДНК, а затем переносят вектор в клетку-хозяина вместе с трансмиссивной векторной ДНК. Сегмент или последовательность ДНК, которая содержит инсертированную или добавленную ДНК, например, экспрессионный вектор, могут также называться «ДНК-конструкцией». Обычный тип вектора представлен «плазмидой», которая, как правило, представляет собой самодостаточную молекулу двуцепочечной ДНК, которая может легко принимать дополнительную (чужеродную) ДНК и которая может легко быть введена в подходящую клетку-хозяина. Вектор согласно настоящему изобретению часто содержит кодирующую ДНК и последовательности контроля экспрессии, например, промоторную ДНК, и имеет один или более сайтов рестрикции, подходящих для инсерции чужеродной ДНК. Кодирующая ДНК представляет собой последовательность ДНК, которая кодирует конкретную последовательность аминокислот конкретного полипептида или белка, такого как формат антитела согласно настоящему изобретению. Промоторная ДНК представляет собой последовательность ДНК, которая инициирует, регулирует, или иным образом опосредует или контролирует экспрессию кодирующей ДНК. Промоторная ДНК и кодирующая ДНК могут происходить из одного гена или из разных генов, и могут происходить из одного или разных организмов. Рекомбинантные клонирующие векторы согласно настоящему изобретению часто включают одну или более систем репликации для клонирования или экспрессии, один или более маркеров для отбора у хозяина, например, по устойчивости к антибиотикам, и одну или более экспрессионных кассет.

Процедуры, применяемые для лигирования последовательностей ДНК, например, обеспечения или кодирования факторов согласно настоящему изобретению и/или представляющего интерес белка, последовательностей промоторов, терминаторов и дополнительных последовательностей, соответственно, и для их инсертирования в подходящие векторы, содержащие информацию, необходимую для интеграции или репликации у хозяина, хорошо известны специалистам в данной области техники, например, описаны в источнике: Sambrook et al, 2012.

Под **клеткой-хозяином**, в частности, понимают клетку, рекомбинантную клетку или линию клеток, трансфицированную экспрессионной конструкцией, такой как вектор в соответствии с настоящим изобретением.

Термин «**линия клеток-хозяев**» в настоящем документе относится к стабильному клону конкретного типа клеток, который приобрел способность к пролиферации на протяжении продленного периода времени. Термин «линия клеток-хозяев» относится к линии клеток, используемой для экспрессии эндогенного или рекомбинантного гена для
5 получения полипептидов, например, формата рекомбинантного антитела согласно настоящему изобретению.

Под «**продуцирующей клеткой-хозяином**» или «продуцирующей клеткой» обычно понимают линию клеток или культуру клеток, готовую к культивированию в биореакторе для получения продукта в результате производственного процесса, формата
10 рекомбинантного антитела согласно настоящему изобретению. Тип клетки-хозяина в соответствии с настоящим изобретением может быть представлен любой прокариотической или эукариотической клеткой.

Термин «**рекомбинантный**» в настоящем документе означает «получаемый с применением генной инженерии/ генетического конструирования» или «результат
15 использования генной инженерии/ генетического конструирования», например, с применением, в частности, гетерологичных последовательностей, встроенных в рекомбинантный вектор или рекомбинантную клетку-хозяина.

Антитело согласно настоящему изобретению может быть получено с применением любой известной и хорошо изученной экспрессионной системы и технологии
20 культивирования рекомбинантных клеток, например, путем экспрессии в хозяевах-бактериях (прокариотические системы) или в эукариотических системах, таких как дрожжи, грибы, клетки насекомых или клетки млекопитающих. Молекула антитела согласно настоящему изобретению может быть продуцировано в трансгенных организмах, таких как коза, растение или трансгенная мышь, сконструированная линия мышей, у
25 которых имеются большие фрагменты локусов иммуноглобулинов человека и дефицит продуцирования антител мыши. Антитело может также быть получено путем химического синтеза.

В соответствии с конкретным вариантом реализации клетка-хозяин представляет собой клетки-продуценты линии клеток, выбранной из группы, состоящей из CHO, PerC6,
30 CAP, HEK, HeLa, NS0, SP2/0, гибридных клеток и Jurkat. Более конкретно, клетку-хозяина получают из клеток CHO.

Клетку-хозяина согласно настоящему изобретению, в частности, культивируют или поддерживают в не содержащей сыворотки культуре, например, содержащие другие

компоненты, такие как белки плазмы, гормоны и факторы роста, в качестве альтернативы сыворотке.

Наиболее предпочтительными являются клетки-хозяева, которые стабилизированы, адаптированы, культивируются полностью в условиях без содержания сыворотки, и необязательно в среде, не содержащей какого-либо белка/пептида животного происхождения.

Антитела против оxMIF согласно настоящему изобретению могут быть выделены из культуральной среды с применением стандартных способов очищения белков.

Термин «**фармацевтический состав**» относится к медикаменту, который представлен в форме, позволяющей обеспечить эффективность биологической активности содержащегося в ней активного ингредиента, и не содержащему дополнительных компонентов, неприемлемо токсичных для субъекта, которому будут вводить указанный состав.

«**Фармацевтически приемлемый носитель**» относится к ингредиенту в фармацевтическом составе, отличному от активного ингредиента, нетоксичному для субъекта. Некоторые примеры фармацевтически приемлемых носителей включают воду, солевой раствор, забуференный фосфатом солевой раствор, аминокислоты, такие как глицин или гистидин, декстрозу, глицерин, этанол и т.п., а также их комбинации. Во многих случаях предпочтительно включение в композицию изотонических агентов, например, сахаров, полиатомных спиртов, таких как маннит, сорбит, или хлорида натрия. Дополнительными примерами фармацевтически приемлемых веществ являются смачивающие агенты или незначительные количества сопутствующих веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, консерванты или буферы, которые увеличивают срок хранения или эффективность антитела.

В настоящем документе «**лечение**» и «лечить» относятся к клиническому вмешательству с целью изменения естественного хода процессов у индивидуума, лечение которого проводят, и могут осуществляться либо для профилактики, либо в ходе процесса клинической патологии. Желательные эффекты лечения включают, не ограничиваясь перечисленными, предотвращение возникновения или рецидива заболевания, облегчение симптомов, уменьшение каких-либо прямых или косвенных патологических последствий заболевания, предотвращение метастазирования, снижение скорости прогрессирования заболевания, облегчение или паллиативное облегчение болезненного состояния, и ремиссию или улучшенный прогноз. Согласно некоторым вариантам реализации антитела

согласно настоящему изобретению применяют для задержки развития заболевания или для замедления прогрессирования заболевания.

5 Антитело против охMIF согласно настоящему изобретению и содержащие его фармацевтические композиции могут вводиться в комбинации с одним или более другими терапевтическими, диагностическими или профилактическими агентами. Дополнительные терапевтические агенты включают другие антинеопластические, противоопухолевые, антиангиогенные, химиотерапевтические агенты, стероиды или ингибиторы контрольных точек, в зависимости от заболевания, подлежащего лечению.

10 Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть представлены различными формами, например, жидкими, полутвердыми и твердыми лекарственными формами, такими как жидкие растворы (например, инъекционные и инфузионные растворы), дисперсии или суспензии, таблетки, пилюли, порошки, липосомы и суппозитории. Предпочтительная форма зависит от предполагаемых способа введения и терапевтического применения. Типичные предпочтительные композиции
15 представлены в форме инъекционных или инфузионных растворов, как, например, композиции, аналогичные используемым для пассивной иммунизации у человека. Предпочтительным способом введения является парентеральное введение (например, внутривенное, подкожное, внутрибрюшинное, внутримышечное). Согласно предпочтительному варианту реализации указанное антитело вводят путем внутривенной
20 инфузии или инъекции. Согласно другому предпочтительному варианту реализации указанное антитело вводят путем внутримышечной или подкожной инъекции. Как будет понятно специалисту в данной области техники, путь и/или способ введения варьируют в зависимости от требуемых результатов.

25 За счет оптимизированных и благоприятных свойств предложенного согласно настоящему изобретению антитела могут вводиться высокие дозы композиции с антителом. В частности, указанная композиция содержит приблизительно 10–250 мг/мл антитела, в частности, 25–100 мг/мл, в частности, ≥ 50 мг/мл.

30 Антитело против охMIF может вводиться однократно, однако более предпочтительно вводить его несколько раз. Например, указанное антитело может вводиться с частотой от трех раз ежедневно до одного раза каждые шесть месяцев или дольше. Введение может осуществляться по схеме, например, три раза ежедневно, два раза ежедневно, один раз ежедневно, один раз каждые два дня, один раз каждые три дня, один раз в неделю, один раз каждые две недели, один раз каждый месяц, один раз каждые два месяца, один раз каждые три месяца и один раз каждые шесть месяцев.

Настоящее изобретение также относится к композициям, содержащим антитело против охМIF или его антигенсвязывающую часть, для лечения субъекта, нуждающегося в лечении связанных с MIF состояний, в частности, иммунологических заболеваний, таких как воспалительные заболевания и гиперпролиферативные нарушения. Согласно некоторым вариантам реализации указанный субъект, нуждающийся в лечении, представляет собой человека.

Термин «**рак**» в настоящем документе относится к пролиферативным заболеваниям, в частности, к солидному раку, такому как рак ободочной и прямой кишки, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак легкого, меланома, плоскоклеточная карцинома (SCC) (например, рак головы и шеи, пищевода и ротовой полости), гепатоцеллюлярная карцинома, аденокарцинома ободочной и прямой кишки, рак почки, медуллярный рак щитовидной железы, папиллярный рак щитовидной железы, астроцитарная опухоль, нейробластома, саркома Юинга, рак шейки матки, карцинома эндометрия, рак молочной железы, рак предстательной железы и злокачественная семинома, в том числе рефрактерные варианты любого из вышеуказанных видов рака, или комбинация одного или более из вышеуказанных видов рака.

Гиперпролиферативные нарушения, такие как раковые заболевания или рак, которые можно лечить антителами против охМIF согласно настоящему изобретению, могут затрагивать любую ткань или орган и включают, не ограничиваясь перечисленным, рак головного мозга, легких, плоских клеток, мочевого пузыря, желудка, поджелудочной железы, молочной железы, головы, шеи, печени, почек, яичников, предстательной железы, ободочной и прямой кишки, пищевода, гинекологический рак, рак носоглотки или щитовидной железы, меланомы, лимфомы, лейкозы или множественные миеломы. В частности, антитела против охМIF согласно настоящему изобретению подходят для лечения карцином яичника, поджелудочной железы, ободочной кишки и легких.

Согласно конкретному варианту реализации антитела, хорошо подходящие для лечения раковых заболеваний, в частности, для лечения солидных опухолей, представляют собой рекомбинантные антитела против охМIF или их антигенсвязывающие фрагменты с пониженным потенциалом агрегации и пониженной гидрофобностью, содержащие

і) следующие вариабельные домены:

(a1) вариабельный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:9 и по меньшей мере одну из замен аминокислот M30L, F49Y, A51G, P80S, W93F, или

(a2) вариабельный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:9 с 1, 2, 3, 4 или 5 заменами аминокислот, дополнительно содержащий консервативный тирозин в

положении 36, и по меньшей мере одну из замен аминокислот M30L, F49Y, A51G, P80S, W93F; и один из

(b1) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:6; или

5 (b2) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:6 и замены аминокислот L5Q и/или W97Y, или

(b3) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:6 с 1, 2, 3, 4 или 5 заменами аминокислот, и с заменами аминокислот L5Q и/или W97Y. при этом положения аминокислот пронумерованы в соответствии с Kabat, и отличающиеся тем, что потенциал агрегации и гидрофобность снижены по сравнению с антителом, содержащим SEQ ID NO:6 и SEQ ID NO:9 без указанных замен аминокислот.

10 Как вариант, лечение солидных опухолей может быть проведено рекомбинантными антителами против охMIF, содержащими вариабельный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:9, или вариабельный домен легкой цепи, характеризующийся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO:9, содержащий тирозин в положении 36, и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:6 и замены аминокислот W97Y и/или L5Q, или вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:6 с 1, 2, 3, 4 или 5 заменами аминокислот, и дополнительно содержащий замены аминокислот W97Y и/или L5Q,

20 Согласно дополнительному конкретному варианту реализации антитела, хорошо подходящие для лечения раковых заболеваний, в частности, для лечения солидных опухолей, представляют собой описанные рекомбинантные антитела против охMIF, имеющие также усиленные эффекторные функции, с константной областью тяжелой цепи, содержащей

25 (a) SEQ ID NO:2 или функциональный вариант, имеющий по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO:2 и содержащий аминокислоты 239D и 332E; или

(b) SEQ ID NO:3, или функциональный вариант, имеющий по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO:3 и содержащий аминокислоты 239D, 268F, 324T и 332E; или

30 (c) SEQ ID NO:4, или функциональный вариант, имеющий по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO:4 и содержащий аминокислоты 239D и 332E; или

(d) SEQ ID NO:5, или функциональный вариант, имеющий по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO:5 и содержащий аминокислоты 235V, 243L, 292P, 300L и 396L.

Настоящим изобретением также охвачены способы лечения воспалительных заболеваний, таких как васкулит, артрит, сепсис, септический шок, эндотоксический шок, синдром токсического шока, приобретенный респираторный дистресс-синдром, гломерулонефрит, воспалительное заболевание кишечника, болезнь Крона, язвенный колит, перитонит, нефрит, атопический дерматит, астма, конъюнктивит, лихорадка, малярия, НАСГ (неалкогольный стеатогепатит), рассеянный склероз, острый и хронический панкреатит, диабет типа 1, IgA-нефропатия, интерстициальный цистит, постковидный синдром, псориаз, гломерулонефрит, воспалительное заболевание кишечника, нефрит и перитонит, системная красная волчанка (СКВ, в том числе волчаночный нефрит), астма, ревматоидный артрит (РА) и воспалительное заболевание кишечника (ВЗК) у субъекта, в том числе человека, включающие этап введения указанному нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества антитела против охMIF или его антигенсвязывающей части.

Согласно конкретному варианту реализации антитела, хорошо подходящие для лечения воспалительных или инфекционных заболеваний, представляют собой рекомбинантные антитела против охMIF или их антигенсвязывающие фрагменты с пониженным потенциалом агрегации и пониженной гидрофобностью, содержащие

i) следующие вариабельные домены:

(a1) вариабельный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:9 и по меньшей мере одну из замен аминокислот M30L, F49Y, A51G, P80S, W93F, или

(a2) вариабельный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:9 с 1, 2, 3, 4 или 5 заменами аминокислот, дополнительно содержащий консервативный тирозин в положении 36, и по меньшей мере одну из замен аминокислот M30L, F49Y, A51G, P80S, W93F; и один из

(b1) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:6; или

(b2) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:6 и замены аминокислот L5Q и/или W97Y, или

(b3) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:6 с 1, 2, 3, 4 или 5 заменами аминокислот, и с заменами аминокислот L5Q и/или W97Y; при этом положения аминокислот пронумерованы в соответствии с Kabat; и отличающиеся тем, что потенциал агрегации и гидрофобность снижены по сравнению

с антителом, содержащим SEQ ID NO:6 и SEQ ID NO:9 без указанных замен аминокислот.

5 Как вариант, лечение воспалительных или инфекционных заболеваний может быть проведено с применением рекомбинантных антител против охMIF, содержащих
5 переменный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:9, или переменный домен легкой цепи, характеризующийся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO:9, содержащий тирозин в положении 36, и
10 переменный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:6 и замены аминокислот W97Y и/или L5Q, или переменный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:6 с 1, 2, 3, 4 или 5 заменами аминокислот и дополнительно содержащий замены аминокислот W97Y и/или L5Q,

15 Согласно дополнительному конкретному варианту реализации антитела, хорошо подходящие для лечения воспалительных или инфекционных заболеваний, представляют собой описанные рекомбинантные антитела против охMIF, также характеризующиеся повышенным преимущественным связыванием с ингибиторным рецептором FcγRIIB, или характеризующиеся α 2,6- N-связанным гиперсигналированием.

Настоящее изобретение также охватывает следующие объекты:

20 1. Рекомбинантное антитело против охMIF или его антигенсвязывающий фрагмент с пониженным потенциалом агрегации и пониженной гидрофобностью, содержащее (содержащий)

i) следующие переменные домены:

25 (a) переменный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:9 и по меньшей мере одну из замен аминокислот M30L, F49Y, A51G, P80S, W93F, или переменный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:9 с 1, 2, 3, 4 или 5 заменами аминокислот, дополнительно содержащий консервативный тирозин в положении 36, и дополнительно содержащий по меньшей мере одну из замен аминокислот M30L, F49Y, A51G, P80S, W93F; и один из

30 (b) переменного домена тяжелой цепи, содержащего SEQ ID NO:6; или

(c) переменного домена тяжелой цепи, содержащего SEQ ID NO:6 и по меньшей мере одну из замен аминокислот L5Q или W97Y, или переменного домена тяжелой цепи, содержащего SEQ ID NO:6 с 1, 2, 3, 4 или 5 заменами аминокислот и дополнительно содержащего по меньшей мере одну из замен аминокислот L5Q или W97Y;

или

ii) следующие переменные домены

(a) переменный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:9, или переменный домен легкой цепи, характеризующийся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с SEQ ID NO:9, содержащий тирозин в положении 36, и

(b) переменный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:6 и замену аминокислоты W97Y, или переменный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:6 с 1, 2, 3, 4 или 5 заменами аминокислот и дополнительно содержащий замену аминокислоты W97Y.

2. Рекомбинантное антитело против охMIF по пункту 1, имеющее усиленные эффекторные функции, содержащее константную область тяжелой цепи, содержащую

(a) SEQ ID NO:2 или константную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO:2 и содержащую аминокислоты 239D и 332E; или

(b) SEQ ID NO:3 или константную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO:3 и содержащую аминокислоты 239D, 268F, 324T и 332E; или

(c) SEQ ID NO:4 или константную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO:4 и содержащую аминокислоты 239D и 332E; или

(d) SEQ ID NO:5 или константную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO:5 и содержащую аминокислоты 235V, 243L, 292P, 300L и 396L.

3. Антитело против охMIF по пункту 1 или 2, содержащее последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:8, 10, 11, 12 и 13.

4. Антитело против охMIF по пункту 1 или 2, содержащее последовательности SEQ ID NO:6, 11 и любую из последовательностей SEQ ID NO:1, 2, 3, 4 или 5.

5. Антитело против охMIF по пункту 1 или 2, содержащее последовательности SEQ ID NO:7, 10 и любую из последовательностей SEQ ID NO:1, 2, 3, 4 или 5.

6. Антитело против охMIF по пункту 1 или 2, содержащее последовательности SEQ ID NO:7, 11 и любую из последовательностей SEQ ID NO:1, 2, 3, 4 или 5.

7. Антитело против охMIF по пункту 1 или 2, содержащее последовательности SEQ ID NO:8, 11 и любую из последовательностей SEQ ID NO:1, 2, 3, 4 или 5, или SEQ ID No:39, или SEQ ID NO:40.
- 5 8. Антитело против охMIF по пункту 1 или 2, содержащее последовательности SEQ ID NO:8, 13 и любую из последовательностей SEQ ID NO:1, 2, 3, 4 или 5, или SEQ ID No:41, или SEQ ID NO:42.
9. Антитело против охMIF по пункту 1 или 2, содержащее последовательности SEQ ID NO:8, 9 и любую из последовательностей SEQ ID NO:1, 2, 3, 4 или 5.
10. Антитело против охMIF по пункту 1 или 2, содержащее последовательности SEQ ID NO:8, 10 и любую из последовательностей SEQ ID NO:1, 2, 3, 4 или 5.
- 10 11. Антитело против охMIF по любому из пунктов 1–10, выбранное из группы, состоящей из биспецифических антител, scFv, (scFv)₂, scFvFc, Fab, Fab' и F(ab')₂, Fab'-SH, слитых Fab-scFv, слитых Fab-(scFv)₂, Fab-scFv-Fc, Fab-(scFv)₂-Fc, слитых белков из двух одноцепочечных переменных фрагментов (scFv) разных антител (например, BiTE), минитела, TandAb®, DutaMab™, DART и CrossMab®.
- 15 12. Антитело по любому из пунктов 1–11 для применения при получении медикамента.
13. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пунктов 1–11, необязательно совместно с фармацевтическим носителем или адьювантом.
14. Фармацевтическая композиция по пункту 13, отличающаяся тем, что указанная композиция содержит приблизительно 10–250 мг/мл антитела по любому из пунктов 1–11, в частности, содержит > 50 мг/мл.
- 20 15. Фармацевтическая композиция по пункту 13 или 14, отличающаяся тем, что указанная фармацевтическая композиция выполнена с возможностью подкожного введения.
16. Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 13–15, отличающаяся тем, что указанную композицию вводят в качестве единственного вещества, или тем, что лечение комбинируют с дополнительной фармацевтической композицией, содержащей одно или более активных веществ, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из противовирусных, противовоспалительных, противораковых, антиангиогенных и антибиотических веществ.
- 25 17. Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 13–16 для применения в лечении пациента, страдающего воспалительным заболеванием, гиперпролиферативным нарушением, инфекционным заболеванием или раком, в частности, в лечении астмы, васкулита, артрита, сепсиса, септического шока, эндотоксического шока, синдрома токсического шока, приобретенного
- 30

респираторного дистресс-синдрома, гломерулонефрита, воспалительного заболевания кишечника, болезни Крона, язвенного колита, перитонита, нефрита и псориаза, рака ободочной и прямой кишки, рака яичников, рака молочной железы, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы и рака легкого.

- 5 18. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по любому из пунктов 1–11.
19. Экспрессионный вектор, содержащий молекулу (молекулы) нуклеиновой кислоты по пункту 18.
20. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по пункту 18 или экспрессионный вектор по пункту 19.
- 10 21. Способ получения антитела по любому из пунктов 1–11, включающий культивирование клетки-хозяина по пункту 20 и выделение указанного антитела из культуры клеток.
22. Способ получения антитела по любому из пунктов 1–11, включающий экспрессию нуклеиновой кислоты, кодирующей указанное антитело в клетке-хозяине.

15 **ПРИМЕРЫ**

Примеры, описанные в настоящем документе, предназначены для иллюстрации настоящего изобретения, а не для его ограничения. В методики, описанные и проиллюстрированные в настоящем документе, может быть внесено множество модификаций и могут быть реализованы многие их варианты без отступления от объема настоящего изобретения. Соответственно, следует понимать, что примеры являются исключительно иллюстративными и не ограничивают объем настоящего изобретения.

20

Пример 1: Пониженная предрасположенность к агрегации и пониженная гидрофобность новых разработанных антител.

25 Таблица 1: ID вариантов новых разработанных антител и комбинации последовательностей для молекул в примерах

ID варианта (Образец)	VH	VL	CH	CL
C0064	Wt (SEQ ID NO:6)	Wt (SEQ ID NO:9)	S239D/I332E (SEQ ID NO:2)	SEQ ID NO:38
C0065	Wt (SEQ ID NO:6)	Wt (SEQ ID NO:9)	S239D/I332E/H268F/S324T (SEQ ID NO:3)	SEQ ID NO:38
C0067	Wt (SEQ ID NO:6)	Wt (SEQ ID NO:9)	L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L/E356D/M358L (SEQ ID NO:5)	SEQ ID NO:38
C0097	Wt (SEQ ID NO:6)	F49Y/A51G/W93F (SEQ ID NO:11)	S239D/I332E (SEQ ID NO:2)	SEQ ID NO:38

C0098	Wt (SEQ ID NO:6)	F49Y/A51G/W93F (SEQ ID NO:11)	S239D/I332E/H268F/S324T (SEQ ID NO:3)	SEQ ID NO:38
C0099	Wt (SEQ ID NO:6)	F49Y/A51G/W93F (SEQ ID NO:11)	R214K/S239D/K274Q/Y296 F/Y300F/L309V/I332E/A339 T/V397M (SEQ ID NO:4)	SEQ ID NO:38
C0100	Wt (SEQ ID NO:6)	F49Y/A51G/W93F (SEQ ID NO:11)	L235V/F243L/R292P/Y300L /P396L/E356D/M358L (SEQ ID NO:5)	SEQ ID NO:38
C0108	L5Q/W97Y (SEQ ID NO:8)	F49Y/A51G/W93F (SEQ ID NO:11)	R214K/S239D/K274Q/Y296 F/Y300F/L309V/I332E/A339 T/V397M (SEQ ID NO:4)	SEQ ID NO:38
C0109	L5Q/W97Y (SEQ ID NO:8)	F49Y/A51G/M30L/W93F/P80S (SEQ ID NO:13)	R214K/S239D/K274Q/Y296 F/Y300F/L309V/I332E/A339 T/V397M (SEQ ID NO:4)	SEQ ID NO:38
C0008 (контрольное антитело)	Wt (SEQ ID NO:6)	Wt (SEQ ID NO:9)	Wt (SEQ ID NO:1)	SEQ ID NO:38
C0070	L5Q/W97Y (SEQ ID NO:8)	Wt (SEQ ID NO:9)	Wt (SEQ ID NO:1)	SEQ ID NO:38
C0073	Wt (SEQ ID NO:6)	F49Y/A51G/W93F (SEQ ID NO:11)	Wt (SEQ ID NO:1)	SEQ ID NO:38
C0076	L5Q (SEQ ID NO:7)	F49Y/A51G (SEQ ID NO:10)	Wt (SEQ ID NO:1)	SEQ ID NO:38
C0077	L5Q (SEQ ID NO:7)	Y36F/F49Y/A51G (SEQ ID NO:37)	Wt (SEQ ID NO:1)	SEQ ID NO:38
C0078	L5Q (SEQ ID NO:7)	F49Y/A51G/W93F (SEQ ID NO:11)	Wt (SEQ ID NO:1)	SEQ ID NO:38
C0081	L5Q/W97Y (SEQ ID NO:8)	F49Y/A51G (SEQ ID NO:10)	Wt (SEQ ID NO:1)	SEQ ID NO:38
C0083	L5Q/W97Y (SEQ ID NO:8)	F49Y/A51G/W93F (SEQ ID NO:11)	Wt (SEQ ID NO:1)	SEQ ID NO:38
C0090	L5Q/W97Y (SEQ ID NO:8)	F49Y/A51G/M30L/W93F/P80S (SEQ ID NO:13)	Wt (SEQ ID NO:1)	SEQ ID NO:38

Для оценки гидрофобности и агрегации новые разработанные антитела анализировали методом гель-фильтрационной хроматографии (ЭХ) с использованием двух разных колонок для ЭХ и подвижных буферов, а также с использованием хроматографии гидрофобного взаимодействия (ГХ), и сравнивали с антителом против охMIF C0008.

Для проведения ЭХ образцы разводили до 0,1 мг/мл в 5× забуференном фосфатом солевом растворе, содержащем 0,02% Tween (5×ФСБ-Т), и образец объемом 50 мкл вносили в гель-фильтрационную колонку Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare) при скорости потока 0,75 мл/мин. Разделение и уравнивание выполняли в 5×ФСБ-Т при 22°C. Мониторинг пиков белков осуществляли с использованием поглощения при 214 нм; анализировали спектры с использованием пакета программного обеспечения для эмульсии Unicorn (GE Healthcare). Дополнительно образцы разводили до 0,2 мг/мл в 1×

забуференном фосфатом солевом растворе (1×ФСБ) и образец объемом 100 мкл вносили в гель-фильтрационную колонку Enrich 650 (Bio-Rad) со скоростью потока 1 мл/мин. Разделение и уравнивание выполняли в 1×ФСБ при 22°C. Мониторинг пиков белков осуществляли с использованием поглощения при 280 нм; анализировали спектры с помощью пакета программного обеспечения ChromLab (Bio-Rad). Регистрировали результаты как удерживаемый объем (V_r , мл) для главного пика и вручную проводили ранжирование по присутствию агрегатов.

Для ГХ-анализа все образцы разводили до конечной концентрации, составляющей 0,2 мг/мл, с использованием 50 мМ фосфата и 0,75 М сульфата аммония, pH 6,9. Высокоочищенные образцы антител независимо загружали на колонку HiTrap Butyl HP объемом 1 мл. Вводили по 50 мкл образцов; скорость потока в колонке поддерживали на уровне 1 мл/мин при 22°C. Разделение пиков проводили в градиенте 0–100% В в 20 объемах колонки (CV) (буфер В: 50 мМ фосфат, 20% изопропанол; pH7,0). Мониторинг пиков белков осуществляли с использованием поглощения при 280 нм; анализировали спектры с применением пакета программного обеспечения для эмульсии Unicorn (GE Healthcare). Регистрировали результаты как V_r (мл) на максимуме пика, для каждого пика.

Результаты: Контрольное антитело (C0008) продемонстрировало удерживаемый объем, близкий объему слоя эксклюзионных колонок (~24 мл Superdex 200, ~18 мл Enrich 650), что соответствует молекулярной массе, значительно меньшей, чем ожидаемая для IgG человека (фиг. 2А и В). Необычно длительное удерживание было обусловлено в основном гидрофобными взаимодействиями с поверхностью стационарной фазы. Помимо высокого удерживаемого объема в случае C0008 присутствовали значимые количества димеров и агрегатов IgG. Все новые разработанные антитела показали пониженный удерживаемый объем (V_r), демонстрирующий пониженное взаимодействие с колонкой и, соответственно, пониженную гидрофобность молекул (таблица 2, фиг. 2А и В). C0083 и C0090 показали самый низкий удерживаемый объем (таблица 2, фиг. 2В) и V_r соответствовал молекулярной массе мономерного IgG человека при сравнении со стандартом молекулярной массы. Кроме того, уровень димеров и агрегация антитела были значимо снижены в образцах новых разработанных антител C0073, C0078, C0083 и C0090 (фиг. 2 А и В). В частности, C0083 и C0090 продемонстрировали единственный пик мономера.

На основании удерживаемых объемов ГХ-колонки антитела ранжировали от наименее до наиболее (от наименьшего к наиболее высокому удерживаемому объему) гидрофобных IgG (фиг. 2С, таблица 3), и результаты подтвердили данные ЭХ-анализа.

Новое разработанное антитело С0083 (удерживаемый объем 12,37) было наименее гидрофобным, тогда как С0008 (удерживаемый объем 14,92 мл) показало наиболее высокую гидрофобность.

5 Таблица 2. Эксклюзионная хроматография

Образец	Подвижный буфер	Колонка	V _r (мл)	Агрегаты
С0008	5×ФСБ	Superdex 200	24,20	++
С0070	5×ФСБ	Superdex 200	16,43	+
С0073	5×ФСБ	Superdex 200	14,00	(+)
С0076	5×ФСБ	Superdex 200	21,10	+
С0077	5×ФСБ	Superdex 200	15,77	+
С0078	5×ФСБ	Superdex 200	14,02	(+)
С0081	5×ФСБ	Superdex 200	16,03	+
С0083	5×ФСБ	Superdex 200	13,01	-
С0008	1×ФСБ	Enrich 650	18,06	+
С0083	1×ФСБ	Enrich 650	12,39	-
С0090	1×ФСБ	Enrich 650	12,38	-

Таблица 3. Хроматография гидрофобного взаимодействия

Образец	V _r (мл)
С0008	14,92
С0070	13,67
С0073	13,37
С0076	14,84
С0077	14,05
С0078	13,41
С0081	13,48
С0083	12,37

10 На фиг. 2 показаны хроматографические профили, демонстрирующие пониженную агрегацию и гидрофобность новых разработанных антител против oxMIF. (А) Сравнение профилей элюции С0008 (контрольное антитело, область серого цвета) и новых разработанных антител на гель-фильтрационной колонке Superdex 200 Increase 10/300 GL с применением 5×ФСБ-Т в качестве подвижной фазы. (В) Сравнение профилей элюции С0008 (контрольное антитело, область серого цвета) и новых
15 разработанных антител на гель-фильтрационной колонке Enrich 650 с применением

1×ФСБ в качестве подвижной фазы (С) Сравнение профилей элюции С0008 (контрольное антитело, область серого цвета) и новых разработанных антител на колонке HiTrap Butyl HP ГХ.

5 **Пример 2.** Связывание новых разработанных антител против охМIF с иммобилизованным МIF (определение K_D)

Рекомбинантный МIF человека, разведенный в ФСБ до концентрации 1 мкг/мл, иммобилизовали на планшетах для ИФА ELISA в течение ночи при 4°C (преобразование МIF в охМIF в соответствии с Thiele et al., 2015). После блокирования серийные
10 разведения антител против охМIF добавляли в планшеты. Наконец, детектировали связанные антитела с применением конъюгата белка L/HRP и тетраметилбензидина (ТМВ) в качестве субстрата. Хромогенную реакцию останавливали 3М H₂SO₄ и измеряли OD при 450 нм. Данные разных экспериментов нормировали по максимальной OD антитела против охМIF С0008 (=100%) для соответствующего эксперимента и определяли значения
15 EC₅₀ путем 4-параметрической аппроксимации с применением GraphPad Prism (показано среднее для двух экспериментов).

Результаты: Связывание новых разработанных антител с иммобилизованным МIF (охМIF) измеряли в широком диапазоне концентраций; полученные кривые связывания приведены на фиг. 3. Антитело против охМIF (С0008) использовали в качестве
20 референсного для связывания охМIF. Кривые связывания и вычисленные значения EC₅₀, отражающие K_D , явным образом показали, что новые разработанные антитела С0073, С0076, С0078, С0083 и С0090 сохраняли аффинность (диапазон EC₅₀ 0,5–1,6 нМ, в пределах вариативности результатов анализа) в отношении охМIF, в отличие от С0008 (EC₅₀ 0,7 нМ) (фиг. 3А). Неожиданным образом, С0077 показало 5-кратное снижение
25 аффинности в отношении охМIF за счет всего лишь одной дополнительной точечной мутации (Y36F) в VL по сравнению с С0076 (фиг. 3А), хотя гидрофобность С0077 была заметно снижена (фиг. 2А).

В другой серии экспериментов новые разработанные антитела, несущие мутации в Fc-части для повышения эффекторных функций, показали значения EC₅₀ в диапазоне от
30 0,4 до 0,8 нМ, что также точно соответствует кажущейся аффинности контрольного антитела С0008 (фиг. 3В).

На фиг. 3 показано связывание новых разработанных антител против охМIF с иммобилизованным МIF (определение K_D). (А) Кривые связывания новых разработанных антител с Fc-частями дикого типа. (В) Кривые связывания новых

разработанных антител, несущих мутации в Fc-части для повышения эффекторных функций. С0008 использовали в качестве референсного антитела.

Таблица 4. Значения K_D антител против охMIF

Образец	K_D (нМ)
C0008	0,7
C0073	1,0
C0076	1,1
C0077	5,2
C0078	1,6
C0083	0,5
C0090	0,5
C0097	0,8
C0098	0,7
C0099	0,4
C0100	0,5

5

Пример 3: Неодинаковое связывание новых разработанных антител против охMIF с охMIF и с redMIF.

Антитела против охMIF иммобилизовали в микропланшетах в течение ночи при 4°C в концентрации 15 нМ. После блокирования лунки инкубировали с 50 нг/мл либо redMIF, либо суррогата охMIF NTB-MIF (Schinagl et al., 2018). Захваченный охMIF детектировали биотинилированным поликлональным антителом кролика против MIF и конъюгатом стрептавидина-HRP. Планшеты окрашивали тетраметилбензидином (ТМВ) и хромогенную реакцию останавливали добавлением 30% H_2SO_4 . OD измеряли при 450 нм. Данные разных экспериментов нормировали по максимальной OD антитела против охMIF С0008 (=100%) для соответствующего эксперимента; приведено среднее значение для двух – трех экспериментов.

Результаты: Связывание новых разработанных антител с растворимым охMIF и redMIF показано на фиг. 4. Результаты явным образом показали, что новые разработанные антитела С0073, С0076, С0078, С0083 и С0090 продемонстрировали сильное связывание с охMIF, но отсутствие связывания с redMIF, соответственно, антитела с пониженными гидрофобностью и агрегацией сохраняли способность различать охMIF и redMIF. Новые разработанные антитела показали OD, аналогичные OD контрольного антитела С0008, которое, как было описано, различает охMIF и redMIF (Thiele et al., 2015) (фиг. 4А).

20

Неожиданным образом, было показано, что связывание C0077 с oхMIF значимо снижала всего одна дополнительная точечная мутация (Y36F) в VL по сравнению с C0076 (фиг. 4A). C0077 демонстрирует заметно пониженную гидрофобность (фиг. 2A), однако не сохранило связывающих свойств.

5 В другой серии экспериментов новые разработанные антитела, содержащие мутации в Fc-части (C0097-C0100) для повышения эффекторных функций, также сохраняли способность различать oхMIF и redMIF, и показали OD, аналогичные OD антитела C0008 (фиг. 4B).

10 На фиг. 4 показано неодинаковое связывание новых разработанных антител с oхMIF и с redMIF. (A) Неодинаковое связывание новых разработанных антител с Fc-частями дикого типа. (B) Неодинаковое связывание новых разработанных антител, несущих мутации в Fc-части для повышения эффекторных функций. C0008 использовали в качестве референсного антитела.

15 **Пример 4:** Усиленные эффекторные функции за счет мутированных по Fc новых разработанных антител против oхMIF.

Согласно описанию выше, могут быть предприняты попытки увеличения АЗКЦ-потенциала антител за счет мутаций в Fc-части. Опосредованная Fc-рецептором антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (АЗКЦ) представляет собой важный механизм действия, за счет которого антитела нацеливаются на пораженные заболеванием клетки для их элиминации. Когда эффекторная Fc-часть связанных с мишенью антител также связывается с рецепторами FcγR3A на поверхности эффекторных клеток, происходит множественное перекрестное связывание двух типов клеток, что приводит к активации пути АЗКЦ. Сконструированные клетки Jurkat, стабильно экспрессирующие рецептор FcγR3A, вариант V158 (высокоаффинный), и элемент ответа NFAT, запускающий экспрессию люциферазы люциферазы светлячков, в качестве эффекторных клеток использовали для определения АЗКЦ-активности антител, которую количественно определяли по люциферазе, продуцированной в результате активации пути NFAT.

30 Репортерный анализ АЗКЦ по существу осуществляли согласно рекомендациям изготовителя (Promega #G, разведенный в ФСБ до 1 мкг/мл, иммобилизовали в планшетах для ИФА ELISA в течение ночи при 4°C (преобразование MIF в oхMIF в соответствии с Thiele et al., 2015). После блокирования добавляли серийные разведения новых разработанных антител согласно описанию в настоящем документе (C0097–C0100) вместе

с эффекторными клетками Jurkat, и планшеты инкубировали в течение 6 часов при 37°C / 5%CO₂ в инкубаторе с увлажнением. Наконец, добавляли реагент Bio-Glo Luciferase и измеряли люминесценцию (RLU) на мультимодальном планшетном ридере Tecan (время интеграции 0,5 с). Ималумаб использовали в качестве референсного антитела.

5

Результаты: все новые разработанные варианты, несущие Fc-мутации (C0097-C0100) показали значимый дозозависимый ответ на возрастающие концентрации новых разработанных антител, тогда как антитело C0008 не индуцировало опосредованной FcγRIIIa активации репортерных клеток Jurkat (фиг. 5).

10 На фиг. 5 показаны усиленные эффекторные функции новых разработанных антител против oхMIF в модифицированном репортерном биологическом анализе АЗКЦ (Promega #G7010). В отличие от C0008, все новые разработанные антитела против oхMIF индуцируют опосредованную FcγRIIIa активацию репортерных клеток Jurkat (n=2).

15 **Пример 5:** Биораспределение новых разработанных антител против oхMIF

Биораспределение нового разработанного антитела против oхMIF C0083 по сравнению с C0008 исследовали у самок мышей Balb/c, несущих подкожные опухоли, в модели сингенного рака толстой кишки CT26. Самки мышей Balb/c получали односторонние подкожные инъекции 3×10^5 клеток CT26 в ФСБ (100 мкл/животное). После достижения объема индивидуальных опухолей 150–300 мм³ мышей распределяли в группы лечения и вводили им однократную внутривенную дозу 5 мг/кг/день меченого IRDye 800CW C0008 или меченого IRDye 800CW C0083. Двух мышей использовали в качестве не получавших лечения контролей «без сигнала».

25 C0008 и C0083 метили IRDye 800CW с применением набора IRDye 800CW Protein Labeling Kit для высоких MW от LI-COR Biosciences, следуя инструкциям производителя. После завершения процесса мечения и до инъекции меченых антител мышам определяли концентрацию белка и эффективность мечения для меченого IRDye 800CW антитела с применением технологии Nanodrop; мышам вводили дозы, исходя из концентрации белка после мечения. In vivo визуализацию выполняли на устройстве для визуализации LI-COR
30 Pearl® Trilogy после введения меченых антител в следующие точки времени: 1 час, 6–8 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 168 часов после дозирования. Выполняли анализ изображений для количественного определения относительных единиц флуоресценции (RFU) антитела в опухоли (RFU= RFU области опухоли – фоновые RFU)

Результаты: Определяли значимое внутриопухолевое распределение введенных внутривенно меченых 800CW C0008 (фиг. 6A) и C0083 (фиг. 6B) с пиком через 24 часа и удержанием в опухоли до 7 дней. Указанный результат явным образом демонстрирует, что способность к проникновению в опухоль у C0083 сохранялась или даже улучшалась по сравнению с контрольным антителом против oxMIF C0008. Указанные два антитела тестировали в индивидуальных экспериментах и масштаб изображений оптимизировали для соответствующего эксперимента. Однако при использовании одинакового масштаба в обоих экспериментах становится значительно более очевидным улучшенное проникновение в опухоль и удержание C0083 (фиг. 6D) по сравнению с C0008. При цифровом анализе пиксельной интенсивности в области опухоли, опять же, улучшенное проникновение в опухоль и удержание C0083 становятся более явными (фиг. 6E). У не получавших лечения контрольных мышей сигнал не был детектирован (фиг. 6C).

На фиг. 6 показано проникновение в опухоль нового разработанного антитела против oxMIF C0083, определенное путем инфракрасной визуализации *in vivo* у мышей, несущих подкожные опухоли CT26. Снимки получали через 1 час, 6 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов и 168 часов после инъекции меченого IRDye 800CW антитела. А: Мыши, которые получали меченое IRDye 800CW C0008 (5мг/кг); В: Мыши, которые получали меченое IRDye 800CW C0083 (5мг/кг/день); С: не получавшие лечения контрольные мыши, D: Мыши, которые получали меченое IRDye 800CW C0083 (5мг/кг/день); изображения имеют тот же масштаб, что и на (А); Е: проникновение в опухоль и удержание C0083 и C0008 количественно определяли путем анализа цифровых изображений

Пример 6: Улучшенное получение нового разработанного антитела C0083.

Новое разработанное антитело против oxMIF C0083 получали путем транзientной экспрессии в клетках ExpiCHO (Thermo Fisher) по сравнению с C0008. Вкратце, 50–200 мл клеток ExpiCHO в фазе экспоненциального роста транзientно трансфицировали с применением набора для трансфекции клеток CHO ExpiFectamine CHO Kit (Thermo Scientific) и культивировали в течение 8 дней в соответствии с инструкциями изготовителя («стандартный протокол», Thermo Scientific) при 37°C в инкубаторе с увлажнением. Клетки извлекали путем центрифугирования и супернатанты разводили 1:1 40 мМ фосфатом натрия, 300 мМ хлоридом натрия, pH 7,2. Разведенные супернатанты проводили через фильтр с размером пор 0,2 мкм и вносили в колонку Mab Select Prism A (Cytiva) с

применением хроматографической системы NGC QUEST 10 Chromatography System (Bio-Rad) при комнатной температуре. Колонку промывали 10 объемами колонки 20 мМ фосфата натрия, 150 мМ хлорида натрия, рН 7,2, и антитела элюировали в 10 объемах колонки 100 мМ глицина, рН 3,5. Антитела немедленно нейтрализовали до значения рН 5, разводили в 1×ФСБ с рН 7,2, используя обессоливающие картриджи Bio-Scale P-6, и концентрировали до ~1мг/мл с применением устройств для центрифугирования Amicon Ultra-15 (Merck Millipore). Концентрацию белка определяли с использованием технологии NanoDrop и соответствующих коэффициентов экстинкции. Количество очищенного антитела после Mab Select Prism A и нейтрализации (итоговый выход соответствующего антитела) делили на объем культуры клеток; полученное в итоге значение в настоящем документе называется титром антитела (мг/л).

Результаты: Сравнение 3 индивидуальных повторов получения C0083 с C0008 ясно показало, что продуцирование нового разработанного антитела C0083 происходило значительно лучше (непарный t-критерий, $p=0,03$). Получали более высокие титры антитела (117 мг/л) по сравнению с C0008 (93 мг/л) (фиг. 7).

На фиг. 7 представлено улучшенное получение нового разработанного антитела против охMIF C0083.

Пример 7: Улучшенное получение новых разработанных антител против охMIF с усиленной АЗКЦ-активностью.

Антитела против охMIF (C0097, C0098 и C0100), несущие мутации для снижения гидрофобности и предрасположенность к агрегации, но также и мутации Fc для улучшения АЗКЦ-активности, получали путем транзientной экспрессии в клетках ExpiCHO (Thermo Fisher). Вкратце, 50 мл клеток ExpiCHO в фазе экспоненциального роста транзientно трансфицировали, используя набор ExpiFectamine CHO Kit (Thermo Scientific), и культивировали в течение 8 дней в соответствии с инструкциями изготовителя («стандартный протокол», Thermo Scientific) при 37°C в инкубаторе с увлажнением. Клетки извлекали путем центрифугирования и добавляли к супернатантам 1/10 объема 200 мМ фосфата натрия, 1500 мМ хлорида натрия, рН 7,2. Разведенные супернатанты проводили через фильтр с размером пор 0,2 мкм и вносили в колонку HiTrap Fibro PrismA (Cytiva) с применением хроматографической системы NGC QUEST 10 Chromatography System (Bio-Rad) при комнатной температуре. Колонку промывали 10 объемами колонки 20 мМ фосфата натрия, 150 мМ хлорида натрия с рН 7,2 и антитела

элюировали в 10 объемах колонки 100 мМ глицином с рН 3,5. Антитела немедленно нейтрализовали до рН 5 глицином до конечной концентрации глицина 250 мМ. Концентрацию белка определяли с использованием технологии NanoDrop и соответствующих коэффициентов экстинкции. Количество очищенного антитела после
5 HiTrap Fibro Prism A и нейтрализации (итоговый выход соответствующего антитела) делили на объем культуры клеток; полученное в итоге значение в настоящем документе называется титром антитела (мг/л). Для сравнения получали антитела против охМIF без оптимизации VH/VL применительно к гидрофобности/агрегации, однако несущие идентичные мутации Fc для улучшения АЗКЦ-активности (С0064, С0065 и С0067), с
10 применением той же процедуры.

Результаты: Получение антител против охМIF с улучшенными гидрофобностью/предрасположенностью к агрегации (С0097, С0098 и С0100) приводило к значимо более высоким титрам со сравнением с соответствующими им эквивалентами,
15 содержащими VH- и VL-домены С0008 (С0064, С0065 и С0067) (фиг. 8).

На фиг. 8 представлено улучшенное получение новых разработанных антител против охМIF с усиленными эффекторными функциями и пониженной гидрофобностью и предрасположенностью к агрегации, со сравнением с соответствующими им эквивалентами с усиленными эффекторными функциями, однако содержащими VH- и VL-
20 домены ималумаба (сравнение С0097 с С0064, С0098 с С0065 и С0100 с С0067).

Пример 8: Пониженная предрасположенность к агрегации и пониженная гидрофобность новых разработанных антител против охМIF с усиленными эффекторными функциями

Для оценки гидрофобности и агрегации новые разработанные антитела
25 анализировали методом гель-фильтрационной хроматографии (ЭХ) и хроматографии гидрофобного взаимодействия (ГХ), сравнивая с антителом против охМIF С0008.

Для проведения ЭХ образцы разводили до 1 мг/мл в 1× забуференном фосфатом солевом растворе (1×ФСБ) и 100 мкл образец вносили в гель-фильтрационную колонку Enrich 650 (Bio-Rad) со скоростью потока 1,25 мл/мин. Разделение и уравнивание
30 проводили в 1×ФСБ при комнатной температуре. Мониторинг пиков белков осуществляли с использованием поглощения при 280 нм; анализировали спектры с помощью пакета программного обеспечения ChromLab (Bio-Rad). Регистрировали результаты как

удерживаемый объем (V_T , мл) для главного пика и вручную проводили ранжирование по присутствию агрегатов.

Для ГХ-анализа все образцы разводили до конечной концентрации, составляющей 1 мг/мл, с применением 50 мМ фосфата и 0,75 М сульфата аммония, рН 6,8.

5 Высокоочищенные образцы антител (~ 100 мкг) независимо загружали на колонку HiTrap Butyl HP объемом 1 мл. Вводили образцы объемом 100 мкл и скорость потока в колонке поддерживали на уровне 1 мл/мин при комнатной температуре. Разделение пиков проводили в 20 объемах колонки (CV) в градиенте буфера В от 0 до 100% (буфер В: 50 мМ фосфат, 20% изопропанол; рН 7,0). Мониторинг пиков белков осуществляли с
10 использованием поглощения при 280 нм; анализировали спектры с применением пакета программного обеспечения для эмульсии Unicorn (GE Healthcare). Регистрировали результаты как V_T (мл) на максимуме пика, для каждого пика.

Результаты: Контрольное антитело С0008 продемонстрировало удерживаемый объем, близкий к свободному объему эксклюзионной колонки (~16 мл), что соответствует
15 молекулярной массе, значительно меньшей, чем ожидаемая для IgG человека (фиг. 9А). Необычное длительное удерживание в основном было обусловлено гидрофобными взаимодействиями с поверхностью стационарной фазы. Помимо высокого удерживаемого объема в случае С0008 присутствовали значимые количества димеров и агрегатов IgG. Новые разработанные антитела С0108 и С0109 показали значимо пониженный
20 удерживаемый объем (V_T), демонстрирующий пониженное взаимодействие с колонкой и, соответственно, пониженную гидрофобность молекул (фиг. 9А, таблица 5). V_T соответствовал молекулярной массе мономерного IgG человека при сравнении со стандартом молекулярной массы. Кроме того, димеры антител и агрегация отсутствовали в образцах новых разработанных антител С0108 и С0109 (фиг. 9А).

25 При применении ГХ V_T прямо пропорционален гидрофобности анализируемых антител, т.е. чем выше V_T , тем более гидрофобной является молекула. ГХ-анализ новых разработанных антител (С0083, С0090, С0108 и С0109) подтвердил, что они значимо менее гидрофобны (фиг. 9В, удерживаемый объем 15,2–16,2 мл, таблица 6) по сравнению с контрольным антителом С0008 (фиг. 9В, удерживаемый объем 20,8 мл, таблица 6).

30 Заключение: Из ЭХ- и ГХ-анализа очевидно, что новые разработанные антитела имеют улучшенные биохимические свойства, в частности, пониженные гидрофобность и предрасположенность к агрегации.

Таблица 5. Эксклюзионная хроматография

<i>Образец</i>	<i>Подвижный буфер</i>	<i>Колонка</i>	<i>V_r (мл)</i>	<i>Агрегаты</i>
C0008	1×ФСБ	Enrich 650	14,5	++
C0108	1×ФСБ	Enrich 650	11,9	-
C0109	1×ФСБ	Enrich 650	11,9	-

Таблица 6. Хроматография гидрофобного взаимодействия

<i>Образец</i>	<i>V_r (мл)</i>
C0008	20,8
C0083	15,4
C0090	16,2
C0108	15,2
C0109	16,0

На фиг. 9 приведены хроматографические профили, демонстрирующие пониженные агрегацию и гидрофобность новых разработанных антител против охMIF. (А) Сравнение профилей элюции C0008 (контрольное антитело, область серого цвета) и новых разработанных антител C0108 и C0109 с усиленными эффекторными функциями на гель-фильтрационной колонке Enrich 650 с применением 1×ФСБ в качестве подвижной фазы; (В) Сравнение профилей элюции C0008 (контрольное антитело, область серого цвета) и новых разработанных антител C0083, C0090, C0108 и C0109 на ГХ-колонке HiTrap Butyl HP.

Пример 9: Пониженное неспецифическое связывание новых разработанных антител против охMIF C0083 и C0090 с клетками A2780 MIF^{-/-}.

Линию клеток A2780 MIF^{-/-} получали путем редактирования гена MIF человека методом CRISPR/Cas9 в линии клеток карциномы яичников A2780. Отсутствие эндогенного белка MIF человека в линии клеток A2780 MIF^{-/-} подтверждали путем секвенирования по Сэнгеру и вестерн-блоттинга с применением поликлональных антител против MIF человека.

Клетки A2780 MIF^{-/-} разъединяли реагентом Cell Stripper (Corning, кат.№ 25-056-C1), промывали окрашивающим буфером (ФСБ +5% БСА) и высевали в 96-луночный планшет с U-образным дном с плотностью 2×10^5 клеток на лунку. Клетки окрашивали фиксируемым красителем для определения жизнеспособности eFluo780 (разведенным 1:2000 в ФСБ) в течение 20 минут при 4°C и промывали окрашивающим буфером. Клетки ресуспендировали в 50 мкл окрашивающего буфера, добавляли 50 мкл серийных

разведений новых разработанных антител против охMIF C0083, C0090, C0108, C0109, контрольное антитело против охMIF C0008 или изотипического IgG (конечные концентрации 37 нМ – 9,4 нМ). После инкубации в течение 40 минут при 4°C клетки промывали окрашивающим буфером, и ресуспендировали в 100 мкл вторичного антитела (антитело козы против IgG человека (H+L) с AlexaFluor 488, разведенное 1:100). После инкубации в течение 30 минут при 4°C клетки промывали окрашивающим буфером, ресуспендировали в ФСБ+2% БСА и помещали в проточный цитометр Cytotflex-S. Данные анализировали с помощью FlowJo и строили график зависимости GeoMean (средняя интенсивность флуоресценции для AF488) жизнеспособных клеток от концентрации антитела в GraphPad Prism.

Результаты и заключение: Из фиг. 10 очевидно, что новые разработанные антитела против охMIF C0083, C0090, C0108 и C0109 не связываются с клетками A2780 MIF^{-/-}, поскольку их значение Geo Mean очень близко значениям отрицательного контрольного изотипического IgG. И напротив, референсное антитело против охMIF C0008 показало значимое связывание с клетками A2780 MIF^{-/-}, хотя они не экспрессируют MIF. Соответственно, снижение гидрофобности приводило к сильному снижению или элиминации неспецифического связывания новых разработанных антител против охMIF C0083, C0090, C0108 и C0109 с A2780 MIF^{-/-}, тогда как контрольное антитело против охMIF C0008 неспецифически связывается с поверхностью клеток за счет своих гидрофобных свойств.

На фиг. 10 показано пониженное неспецифическое связывание новых разработанных антител против охMIF на клетках A2780 MIF^{-/-}, определенное с использованием FACS. Клетки A2780 MIF^{-/-} окрашивали новыми разработанными антителами против охMIF C0090, C0109 (А); C0083, C0108 (В) или контрольным антителом C0008, а также изотипическим IgG в качестве отрицательного контроля. Строили график зависимости GeoMean (средняя интенсивность флуоресценции для AF488) жизнеспособных клеток от концентрации антитела.

Пример 10: Связывание новых разработанных антител против охMIF с усиленными эффекторными функциями с иммобилизованным MIF (расчет K_D)

Рекомбинантный MIF человека, разведенный в ФСБ до концентрации 1 мкг/мл, иммобилизовали в планшетах для ИФА ELISA в течение ночи при 4°C (преобразование MIF в охMIF в соответствии с Thiele et al., 2015). После блокирования добавляли в планшеты серийные разведения антител против охMIF. Наконец, связанные антитела

детектировали с применением антител козы против IgG(Fc) человека, конъюгированных с HRP, и тетраметилбензидином (ТМВ) в качестве субстрата. Хромогенную реакцию останавливали 3М H₂SO₄ и измеряли OD при 450 нм. Данные разных экспериментов нормировали по максимальной OD антитела против охMIF C0008 (=100%) для соответствующего эксперимента, и определяли значения EC₅₀ путем 4-параметрической аппроксимации с применением GraphPad Prism (показано среднее +/- SEM для двух экспериментов).

Результаты и заключение: Связывание новых разработанных антител с усиленными эффекторными функциями с иммобилизованным MIF (охMIF) измеряли в широком диапазоне концентраций и итоговые кривые связывания приведены на фиг. 11. Антитело против охMIF C0008 использовали в качестве референсного для связывания охMIF. Кривые связывания и вычисленные значения EC₅₀, отражающие K_D, явным образом показали, что новые разработанные антитела C0108 и C0109 сохраняли аффинность в отношении охMIF в нижнем наномолярном диапазоне, в отличие от C0008 (фиг. 11, таблица 7).

На фиг. 11 приведены кривые связывания новых разработанных антител против охMIF с усиленными эффекторными функциями с иммобилизованным охMIF (расчет K_D); антитело против охMIF C0008 использовали в качестве референсного антитела.

Таблица 7: Расчетная величина аффинности антител против охMIF (ИФА ELISA)

Образец	K _D (нМ)
C0008	0,2
C0108	0,3
C0109	0,3

Пример 11: Неодинаковое связывание новых разработанных антител против охMIF с усиленными эффекторными функциями с охMIF и с redMIF.

Антитела против охMIF и нерелевантный контрольный IgG1 человека иммобилизовали в микропланшетах в течение ночи при 4°C в концентрации 15 нМ. После блокирования лунки инкубировали с 50 нг/мл либо redMIF, либо суррогата охMIF NTB-MIF (Schinagl et al., 2018). Захваченный охMIF детектировали с применением поликлонального антитела кролика против MIF и HRP-конъюгированного антитела козы против IgG кролика. Планшеты окрашивали тетраметилбензидином (ТМВ), и останавливали хромогенную реакцию добавлением 30% H₂SO₄. OD измеряли при 450 нм.

Данные двух экспериментов нормировали по максимальной OD антитела против охMIF C0008 (=100%) для соответствующего эксперимента; приведено среднее +/- SEM для двух – трех экспериментов.

Результаты и заключение: Связывание новых разработанных антител с усиленными эффекторными функциями с растворимыми охMIF и redMIF проиллюстрировано на фиг. 5 12. Результаты явным образом показали, что новые разработанные антитела C0108 и C0109 продемонстрировали сильное связывание с охMIF, но отсутствие детектируемого связывания с redMIF. Новые разработанные антитела показали OD, в значительной степени сопоставимые с OD референсного антитела C0008, которое, как было описано, различает охMIF и redMIF (Thiele et al., 2015). Специфического связывания нерелевантного контрольного IgG1 не наблюдалось. Соответственно, новые разработанные антитела с усиленными эффекторными функциями и пониженными гидрофобностью и агрегацией сохраняли способность различать охMIF и redMIF. 10

На фиг. 12 показано неодинаковое связывание новых разработанных антител с охMIF и с 15 redMIF. C0008 использовали в качестве референсного антитела, а изотипический IgG в качестве отрицательного контроля.

Пример 12: Определение аффинности новых разработанных антител в отношении охMIF человека и мыши с применением ППР

Новые разработанные антитела C0108 и C0109, а также контрольное антитело 20 против охMIF C0008 иммобилизовали на оптических сенсорных чипах Biacore CM5 (GE Healthcare) с применением стандартных условий для аминосочетания до плотности приблизительно 2500, 1500 или 100 RU в проточных ячейках FC2, FC3 и FC4, соответственно. FC1 использовали в качестве референсной ячейки и реакцию проводили только с буферами. Рекомбинантный MIF мыши или человека разводили в буфере HBS- 25 EP (GE Healthcare) до концентраций 50, 75, 100 или 150 нМ в присутствии 0,2% Proclin300 (активный компонент 5-хлор-2-метил-4-изотиазолин-3-он; Sigma) для преобразования MIF в суррогат охMIF (Thiele M et al., 2015) в течение 3 часов при комнатной температуре. Обработанный Proclin300 MIF вносили в иммобилизованные антитела против охMIF при скорости потока 30 мкл/мин в течение 3 минут с использованием инструмента Biacore™ 30 3000 Instrument (GE Healthcare). Время диссоциации составляло 300 секунд, и чип регенерировали с применением 10 mM HCl в течение 3 минут. Кинетику для ряда концентраций анализировали путем локальной одновременной аппроксимации

связывания/диссоциации каждой кривой связывания после вычитания фона референсной ячейки (FC1) с использованием итеративной модели взаимодействия Ленгмюра 1:1 с компенсацией переноса масс, с помощью программного обеспечения BiaEvaluation 4,1 (GE Healthcare). Данные представлены как среднее +/- SD (стандартное отклонение) вычисленных значений K_D для проточных ячеек 2–4.

Результаты и заключение: Связывание новых разработанных антител с усиленными эффекторными функциями с растворимым охMIF человека и мыши, определенное с помощью ППР, показано в таблице 8. Результаты явным образом показали, что новые разработанные антитела имеют наномолярные значения аффинности, составляющие приблизительно 3 нМ, то есть в том же диапазоне, что и контрольное антитело против охMIF C0008. Аффинность в отношении охMIF мыши была приблизительно в 5–8 раз ниже, чем в отношении охMIF человека у всех антител против охMIF. Соответственно, новые разработанные антитела с усиленными эффекторными функциями и пониженными гидрофобностью и агрегацией сохраняли аффинность в отношении охMIF человека и мыши.

Таблица 8: Аффинность антител против охMIF (ППР)

Аналит	Образец	K_D (нМ)	SD (нМ)
охMIF человека	C0008	3,49	+/- 0,38
	C0108	6,06	+/- 2,30
	C0109	3,69	+/- 0,83
охMIF мыши	C0008	26,9	+/- 3,01
	C0108	31,6	+/- 2,67
	C0109	28,6	+/- 0,21

Пример 13: Фармакокинетика новых разработанных антител против охMIF C0083 и C0090 по сравнению с контрольным антителом против охMIF C0008 у мышей BALB/c nude

Новые разработанные антитела против охMIF C0083 и C0090, и контрольное антитело против охMIF C0008 инъецировали внутривенно самкам мышей BALB/c nude в дозе 10 мг/кг. Через 4, 10, 24, 48 и 96 часов после инъекции собирали по 20 мкл крови путем пункции хвостовой вены с применением покрытых K_2 -ЭДТК капилляров и переносили в покрытые K_2 -ЭДТК сосуды, содержащие 60 мкл ФСБ. После

центрифугирования супернатанты (= разведенная 1:4 плазма) анализировали с применением количественного ИФА ELISA на антитело против охMIF.

Вкратце, рекомбинантный MIF человека (OncoOne), разведенный в ФСБ до концентрации 1 мкг/мл, иммобилизовали в планшетах для ИФА ELISA (MaxiSorp, Nunc) в течение ночи при 4°C. После блокирования буфером для разведения (DB, 2% рыбьего желатина/TBST) разведенные образцы плазмы (итоговое разведение 1:100 – 1:100 000) добавляли в планшеты. Связанные антитела детектировали с применением HRP-конъюгированного антитела козы против IgG (Fc) человека (1:40 000 в TBST, Thermo Scientific #32420). Тетраметилбензидин (ТМВ, Thermo Scientific #34029) добавляли в качестве субстрата и останавливали хромогенную реакцию 50 мкл 30% H₂SO₄; OD измеряли при 450 нм. Серийные разведения С0008, С0083 и С0090 использовали для построения стандартных кривых с применением гиперболического регрессионного анализа в GraphPad Prism, и для вычисления концентрации антител в плазме. Строили график зависимости средней концентрации антитела в точке времени от времени взятия, и вычисляли значения продолжительности полужизни, используя модель однофазного затухания в GraphPad Prism.

Результаты: На фиг. 13 показана фармакокинетика антител против охMIF, описываемая моноэкспоненциальной убывающей функцией. Вычисленные значения продолжительности полужизни составили 11 ч для контрольного антитела против охMIF С0008 и 15 ч для новых разработанных антител против охMIF С0083 и С0090, соответственно. Кроме того, вычисляли площадь под кривой (AUC) моноэкспоненциальной убывающей функции для расчета общего воздействия антитела и биодоступности. Вычисленные значения AUC составили 1600, 3784 и 3266 для С0008, С0083 и С0090, соответственно.

Показана фармакокинетика новых разработанных антител против охMIF С0083 и С0090 в сравнении с контрольным антителом против охMIF С0008 у мышей BALB/c nude. Концентрацию антител в плазме определяли с помощью количественного ИФА ELISA на антитело против охMIF через 4, 10, 24, 48 и 96 часов после однократного внутривенного введения 10 мг/кг антител против охMIF, и вычисляли значения продолжительности полужизни, используя модель однофазного затухания в GraphPad Prism.

Заключение: Замены в переменных областях новых разработанных антител против охMIF С0083 и С0090 обеспечивали в 1,4 раза более продолжительное время

полужизни и более чем в 2 раза более высокую биодоступность (AUC) по сравнению с контрольным антителом против охMIF C0008.

Пример 14: Повышенные эффекторные функции новых разработанных антител против охMIF C0108 и C0109, определенные с использованием репортерных анализов

5 Применяя сконструированные клетки Jurkat, стабильно экспрессирующие рецептор FcγRIIIa человека, V158 (высокоаффинный аллотип) или F158 (низкоаффинный аллотип) для исследования АЗКЦ, или аллотип H131 рецептора человека FcγRIIIa для исследования АЗКФ, и элемент ответа NFAT, запускающий экспрессию люциферазы светлячков, в качестве эффекторных клеток, количественно определяли биологическую активность антитела по люциферазе, продуцированной в результате активации пути NFAT.

10 Для получения высокочувствительных целевых клеток клетки HCT116 и A2780 трансфицировали плазмидой huMIF-pDisplay (Invitrogen), проводили отбор с использованием генетицина и FACS-сортировку для получения линий клеток, стабильно экспрессирующих заякоренный в мембране мономерный MIF человека (HCT116-pMIF или 15 A2780-pMIF), т.е. MIF экспонирован как мономерный белок, эпитоп охMIF в котором доступен для антител против охMIF (Schinagl et al., Biochemistry 2018). Указанные линии клеток демонстрируют повышенное присутствие охMIF на клеточной поверхности, и, соответственно, представляют собой чувствительный инструмент для анализа *in vitro*.

20 Репортерные анализы АЗКЦ или АЗКФ по существу проводили согласно рекомендациям изготовителя (Promega #G7010 и #G9991). Вкратце, по 1×10^4 клеток/лунку HCT116-pMIF (фиг. 14 А и С) или A2780-pMIF (фиг. 14 В) в 100 мкл культуральной среды (среда RPMI 1640 с добавлением пенициллина/стрептомицина/L-глутамина и 5 % ФБС с 25 низким содержанием IgG) высевали в 96-луночные планшеты и инкубировали в течение ночи при 37°C/5 % CO₂ в инкубаторе с увлажнением для прикрепления. После этого серийные разведения новых разработанных антител против охMIF с усиленными эффекторными функциями C0108 и C0109, или контрольного антитела C0008 с Fc дикого типа (конечная концентрация 0,01 – 100 нМ) и эффекторные клетки Jurkat (фиг. 14 А-В, 30 эффекторные клетки с FcγRIIIa; фиг. 14 С, эффекторные клетки с FcγRIIIa) при соотношении эффекторных и целевых клеток, равном приблизительно 6:1, инкубировали в течение 6 ч при 37°C / 5% CO₂ в инкубаторе с увлажнением. Наконец, аналитические планшеты уравнивали до комнатной температуры и добавляли реагент Bio-Glo Luciferase. Люминесценцию (RLU) измеряли через 10–20 мин инкубации с применением мультимодального планшетного ридера Tecan (время интеграции 0,5 с).

Результаты: Из фиг. 14 А-С очевидно, что новые разработанные антитела С0108 и С0109, несущие усиливающие АЗКЦ/АЗКФ мутации в Fc-части, продемонстрировали выраженную активацию АЗКЦ (фиг. 14 А-В) или АЗКФ (фиг. 14 С) в репортерных клетках, тогда как контрольное антитело С0008 не индуцировало или индуцировало только незначительную опосредованную FcγRIIa (АЗКЦ, Фиг. 14 А-В) или FcγRIIa (АЗКФ, Фиг. 14 С) активацию репортерных клеток Jurkat при их совместном культивировании с клетками НСТ116-рMIF (фиг. 14 А, С) или А2780-рMIF (фиг. 14 В).

Заключение: Новые разработанные антитела против охMIF С0108 и С0109, несущие усиливающие АЗКЦ/АЗКФ мутации в Fc-части, продемонстрировали значительно повышенную АЗКЦ- и АЗКФ-активность в репортерных биологических анализах по сравнению с несущим Fc дикого типа контрольным антителом С0008.

На фиг. 14 показаны усиленные эффекторные функции новых разработанных антител С0108 и С0109, определенные с использованием репортерных анализов. (А-В) Репортерный биологический анализ АЗКЦ с новыми разработанными антителами С0108 и С0109 с усиленными эффекторными функциями, с использованием сконструированных эффекторных клеток Jurkat, стабильно экспрессирующих FcγRIIa (аллотип V с выраженной реакцией, аллотип F со слабой реакцией), и целевых клеток НСТ116-рMIF (А) или А2780-рMIF (В), со сравнением с контрольным антителом против охMIF С0008 с Fc дикого типа; (С) репортерный биологический анализ АЗКФ с новыми разработанными антителами С0108 и С0109 с усиленными эффекторными функциями с применением сконструированных эффекторных клеток Jurkat, стабильно экспрессирующих FcγRIIa, и целевых клеток НСТ116-рMIF, со сравнением с контрольным антителом против охMIF С0008 с Fc дикого типа. Показаны среднее и SEM (n=2-4).

Пример 15: Усиленная АЗКЦ-функция новых разработанных антител против охMIF С0108 и С0109, определенная в биологическом анализе с лизисом клеток МКПК.

Указанный анализ выполняли для определения лизиса клеток, обусловленного антителозависимой цитотоксичностью (АЗКЦ), индуцированной новыми разработанными антителами против охMIF. Цитотоксичность измеряли с применением анализа для детекции HiBiT (Promega) для количественного определения высвобождения меченого HiBiT белка из целевых клеток с применением нелигандного реагента для детекции, содержащего LgBit (LargeBiT) и фуримазин (субстрат). HiBiT и LgBiT спонтанно

собираются в функциональный фермент NanoBiT® и испускают поддающийся количественному определению люминесцентный сигнал в присутствии субстрата.

Для получения высокочувствительных репортерных целевых клеток клетки НСТ116 трансфицировали плазмидой HaloTag-HiBiT (Promega #CS1956B17), проводили отбор с бластицидином и FACS-сортировку в виде пулов клеток. Стабильные HiBiT-экспрессирующие пулы клеток затем трансфицировали плазмидой huMIF-pDisplay (Invitrogen), проводили отбор с генетицином и сортировали методом FACS с получением пулов клеток, стабильно экспрессирующих внутриклеточный HiBiT и заякоренный в мембране мономерный охMIF человека (НСТ116-HiBiT-pMIF), т.е. MIF экспонируется в виде мономерного белка, в котором эпитоп охMIF доступен для антител против охMIF (Schinagl et al., Biochemistry 2018). Указанные линии клеток демонстрируют повышенное присутствие охMIF на клеточной поверхности, и, соответственно, представляют собой чувствительный инструмент для анализа *in vitro*.

Вкратце, 1×10^4 клеток/лунку целевых клеток НСТ116-HiBiT-pMIF в 50 мкл культуральной среде (среда RPMI 1640 с добавлением пенициллина/стрептомицина/L-глутамина и 5% ФБС с ультранизким содержанием IgG) высевали в 96-луночные планшеты и инкубировали в течение ночи при 37°C/5% CO₂ в инкубаторе с увлажнением для прикрепления. После этого добавляли в планшеты по 50 мкл серийных разведений новых разработанных антител против охMIF C0108 и C0109, или контрольного антитела против охMIF C0008 с Fc дикого типа в культуральной среде (конечная концентрация 0,01–100 нМ) и 50 мкл эффекторных клеток МКПК человека от двух отдельных здоровых доноров (4×10^5 клеток/лунку; соотношение эффекторных и целевых клеток – 40:1). Получали характеристики МКПК от двух разных доноров с помощью FACS-анализа для оценки содержания НК-клеток, представляющих собой релевантный тип клеток для указанного анализа. После добавления антител и МКПК планшет инкубировали в течение ночи при 37°C и 5% CO₂ в инкубаторе с увлажнением. На следующий день добавляли 10 мкл реагента Nano-Glo HiBiT Extracellular Detection Reagent (Promega #N2421) и измеряли люминесцентные сигналы (RLU, время интеграции 0,1 с) на планшет-ридере Tecan. Анализ выполняли с включением анализируемых образцов и доноров в двух или трех повторностях.

Результаты: Из фиг. 15 очевидно, что новые разработанные антитела C0108 и C0109, несущие усиливающие АЗКЦ/АЗКФ мутации в Fc-части, продемонстрировали значительно повышенную АЗКЦ-активность с МКПК от обоих доноров (фиг. 15А, 22%

НК-клеток; фиг. 15B, 7% НК-клеток) по сравнению с контрольным антителом против охMIF C0008.

Заключение: Новые разработанные антитела против охMIF C0108 и C0109, несущие усиливающие АЗКЦ/АЗКФ мутации в Fc-части, не демонстрировали значительно

5 повышенной АЗКЦ-активности в анализе опосредованного МКПК клеточного киллинга по сравнению с несущим Fc дикого типа контрольным антителом против охMIF.

На фиг. 15 показана усиленная АЗКЦ-активность новых разработанных антител против охMIF C0108 и C0109, несущих усиливающие АЗКЦ/АЗКФ мутации в Fc-части, определенная в биологическом анализе опосредованной МКПК клеточной токсичности.

10 Биологический анализ АЗКЦ с новыми разработанными антителами против охMIF C0108 и C0109 и МКПК в качестве эффекторных клеток (**A:** 22% НК-клеток, **B:** 7% НК-клеток) и НСТ116-рMIF в качестве целевых клеток по сравнению с контрольным антителом против охMIF C0008 с Fc дикого типа. Приведены значения среднего и SEM для двух или трех репликатов, полученные с использованием МКПК от двух здоровых доноров.

15 **Пример 16:** Новые разработанные антитела против охMIF демонстрируют значительно пониженное высвобождение неспецифических цитокинов из МКПК человека.

Синдром высвобождения цитокинов (CRS) представляет собой форму синдрома системной воспалительной реакции (SIRS), который может запускаться различными

20 факторами, такими как инфекции. CRS также известен как нежелательное явление при применении некоторых медикаментов на основе моноклональных антител. CRS возникает, когда значительные количества лейкоцитов, в том числе В-клеток, Т-клеток, естественных клеток-киллеров, макрофагов, дендритных клеток и моноцитов активируются и высвобождают воспалительные цитокины, такие как ИЛ-6, ИФН-гамма,

25 ИЛ-8, MCP-1, помимо прочих, что активирует еще больше лейкоцитов в петле положительной обратной связи патогенного воспаления. Указанный процесс при дисрегуляции может быть жизнеугрожающим за счет системного гипервоспаления, гипотензивного шока и мультиорганной недостаточности. Соответственно, оценивали потенциальную способность новых разработанных антител против охMIF к

30 высвобождению воспалительных цитокинов из МКПК в анализе *in vitro*.

Вкратце, новые разработанные антитела против охMIF C0108 и C0109 (оба в концентрации 70 нМ) и контрольное антитело против охMIF C0008 (70 нМ) инкубировали со свежеразмороженными МКПК ($4-5 \times 10^5$ клеток на лунку) от трех здоровых доноров в

150 мкл среды RPMI1640 с добавлением 5% сыворотки с ультранизким содержанием IgG в 96-луночных планшетах. После инкубации в течение ночи при 37°C/5% CO₂ в инкубаторе с увлажнением планшеты центрифугировали при 300 × g в течение 5 минут для осаждения клеток, и супернатанты переносили в 96-луночные планшеты с V-образным
5 дном. Осветленные супернатанты анализировали в цитометрическом анализе на основе гранул BioLegend LegendPlex на ИЛ-6 и MCP-1 человека в соответствии с протоколом изготовителя. Измерение проводили на цитометре CytoFlex-S с устройством для загрузки 96-луночных планшетов (Beckman Coulter). В качестве классификационного канала для гранул использовали канал АФЦ (возбуждение от лазера с длиной волны 638 нм,
10 полосовой фильтр 660/10 нм), в качестве репортерного канал ФЭ (возбуждение от желтого лазера 561 нм, полосовой фильтр 585/42 нм). Данные анализировали с применением программного обеспечения для анализа LegendPlex (BioLegend) и строили графики в GraphPad Prism. Приведены значения среднего +/- SEM от 3 разных доноров МКПК.

Результаты и заключение: Из фиг. 16 очевидно, что новые разработанные антитела
15 C0108 и C0109, несущие усиливающие АЗКЦ/АЗКФ мутации в Fc-части, неожиданным образом показали отсутствие высвобождения или пренебрегаемые уровни высвобождения ИЛ-6 и MCP-1 из МКПК при концентрациях до 70 нМ по сравнению с C0008. Можно было ожидать, что C0108 и C0109 индуцируют более высокие уровни высвобождения цитокинов за счет их более высокой аффинности в отношении Fc_γ-рецепторов, чем у
20 референсного антитела против оxMIF C0008, несущего Fc-часть дикого типа. При этом C0008 индуцировало значимое высвобождение ИЛ-6 и MCP-1 при той же концентрации (70 нМ), очевидно за счет более высокой предрасположенности к агрегации и неспецифическому связыванию за счет гидрофобности. Известно, что агрегация терапевтических антител, даже незначительная, сильно потенцирует высвобождение
25 цитокинов из иммунных клеток.

На фиг. 16 показано, что новые разработанные антитела против оxMIF демонстрируют сильно пониженное неспецифическое высвобождение цитокинов из МКПК человека. Новые разработанные антитела против оxMIF C0108 и C0109, несущие усиливающие АЗКЦ/АЗКФ мутации в Fc-части (70 нМ), и контрольное антитело против
30 оxMIF C0008 (70 нМ) инкубировали с МКПК человека в течение ночи, и супернатанты анализировали в цитометрических анализах на основе гранул LegendPlex (BioLegend) на ИЛ-6 человека (А) и MCP-1 человека (В). Приведены значения среднего +/- SEM для концентраций цитокинов от 3 разных доноров МКПК.

ИСТОЧНИКИ:

Bloom B.R. and Bennet, B., 1966, Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity, *Science* 153, 80–82

5 Brinkmann U. and Kontermann R.E., 2017, The making of bispecific antibodies, *MABS*, 9, 2, 182-212

David, J.R., 1966, Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 56, 72–77

Estep P. et al., 2015, An alternative assay to hydrophobic interaction chromatography for high-throughput characterization of monoclonal antibodies, *MAbs*, 7(3), 553-561

10 Ewert S. et al., 2003, Structure-based improvement of the biophysical properties of immunoglobulin VH domains with a generalizable approach, *Biochemistry*, 18, 42(6), 1517-28

Hong, P., et al. (2012). A review size-exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates. In *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* (Vol. 35, Issue 20, pp. 2923–2950). Taylor & Francis.
15 <https://doi.org/10.1080/10826076.2012.743724>

Hussain F. et al., 2013, Human anti-macrophage migration inhibitory factor antibodies inhibit growth of human prostate cancer cells in vitro and in vivo, *Mol Cancer Ther.* Jul;12(7):1223-34

Ianello A. and Ahmad A., 2005, Role of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
20 in the efficacy of therapeutic anti-cancer monoclonal antibodies, *Cancer and Metastasis Review*, 24, 487-499

Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3

Mahalingam D. et al., 2015, ASCO Abstract ID2518

25 Mahalingam et al. 2020, Phase I study of Imalumab (BAX69), a fully human recombinant antioxidized macrophage migration inhibitory factor antibody in advanced solid tumours, *Br J Clin Pharmacol.* 86(9):1836-1848

Morrison, S.L., et al., 1984, Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 6851-6855

30 Natsume A. et al., 2009, “Improving effector functions of antibodies for cancer treatment: Enhancing ADCC and CDC”, *Drug, Design, development and Therapy*, 3, 7-16

Sambrook et al, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (4th Ed.), Vols. 1 -3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2012).

Schinagl, A., et al., 2018, Role of the Cysteine 81 Residue of Macrophage Migration Inhibitory Factor as a Molecular Redox Switch. *Biochemistry*, 57(9), 1523–1532. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b01156>

5 Schinagl. A. et al., 2016, Oxidized macrophage migration inhibitory factor is a potential new tissue marker and drug target in cancer, *Oncotarget*. Nov 8;7(45):73486-73496

Spiess C. et al., 2015, Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies, *Mol.Immunol.*, 67, 95-106

Tang J., et al., 2018, Comprehensive analysis of the clinical immuno-oncology landscape, *Ann Oncol.*;29(1):84-91

10 Thiele, M. et al., (2015). Selective Targeting of a Disease-Related Conformational Isoform of Macrophage Migration Inhibitory Factor Ameliorates Inflammatory Conditions. *Journal of Immunology*, 195(5), 2343–2352. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500572>

Van der Kant, R. et al., 2017, Prediction and Reduction of the Aggregation of Monoclonal Antibodies, *J.Mol.Biol.*, 429(8), 1244-1261

15 Wei Li et al., 2016, Antibody Aggregation: Insights from Sequence and Structure, *Antibodies*, 5(3), 19

Willuda J. et al., 1999, High thermal stability is essential for tumor targeting of antibody fragments: engineering of a humanized anti-epithelial glycoprotein-2 (epithelial cell adhesion molecule) single-chain Fv fragment, *Cancer Res.*, 15; 59(22), 5758-67

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантное антитело против охMIF или его антигенсвязывающий фрагмент с пониженным потенциалом агрегации и пониженной гидрофобностью, содержащее(ий) следующие переменные домены:

5 (a1) переменный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:9 и по меньшей мере одну из замен аминокислот M30L, F49Y, A51G, P80S, W93F, или

(a2) переменный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:9 с 1, 2, 3, 4 или 5 заменами аминокислот, дополнительно содержащий консервативный тирозин в положении 36, и по меньшей мере одну из замен аминокислот M30L, F49Y, A51G, P80S, W93F; и один из

(b1) переменного домена тяжелой цепи, содержащего SEQ ID NO:6; или

(b2) переменного домена тяжелой цепи, содержащего SEQ ID NO:6 и замены аминокислот L5Q и/или W97Y, или

10 (b3) переменного домена тяжелой цепи, содержащего SEQ ID NO:6 с 1, 2, 3, 4 или 5 заменами аминокислот, и с заменами аминокислот L5Q и/или W97Y,

при этом положения аминокислот пронумерованы в соответствии с Kabat, и потенциал агрегации и гидрофобность снижены по сравнению с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим SEQ ID NO:6 и SEQ ID NO:9 без указанных замен аминокислот.

20

2. Рекомбинантное антитело против охMIF по п. 1, содержащее замены аминокислот W93F и/или W97Y.

25 3. Рекомбинантное антитело против охMIF по п. 1 или 2, имеющее усиленные эффекторные функции, содержащее константную область тяжелой цепи, содержащую

(a) SEQ ID NO:2 или константную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO:2 и содержащую аминокислоты 239D и 332E; или

30 (b) SEQ ID NO:3, или константную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO:3 и содержащую аминокислоты 239D, 268F, 324T и 332E; или

(c) SEQ ID NO:4, или константную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO:4 и содержащую аминокислоты 239D и 332E; или

(d) SEQ ID NO:5, или константную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO:5 и содержащую аминокислоты 235V, 243L, 292P, 300L и 396L,

5 при этом положения аминокислот пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU.

4. Антитело против охMIF по любому из пп. 1–3, содержащее последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:8, 10, 11, 12 и 13.

10 5. Антитело против охMIF по любому из пп. 1–3, содержащее последовательности SEQ ID NO:6, 11 и любую из последовательностей SEQ ID NO:1, 2, 3, 4 или 5.

6. Антитело против охMIF по любому из пп. 1–3, содержащее последовательности SEQ ID NO:7, 10 и любую из последовательностей SEQ ID NO:1, 2, 3, 4 или 5.

15 7. Антитело против охMIF по любому из пп. 1–3, содержащее последовательности SEQ ID NO:7, 11 и любую из последовательностей SEQ ID NO:1, 2, 3, 4 или 5.

20 8. Антитело против охMIF по любому из пп. 1–3, содержащее последовательности SEQ ID NO:8, 11 и любую из последовательностей SEQ ID NO:1, 2, 3, 4 или 5, или SEQ ID No:39, или SEQ ID NO:40.

25 9. Антитело против охMIF по любому из пп. 1–3, содержащее последовательности SEQ ID NO:8, 13 и любую из последовательностей SEQ ID NO:1, 2, 3, 4 или 5, или SEQ ID No:41, или SEQ ID NO:42.

10. Антитело против охMIF по любому из пп. 1–3, содержащее последовательности SEQ ID NO:8, 10 и любую из последовательностей SEQ ID NO:1, 2, 3, 4 или 5.

30 11. Антитело против охMIF по любому из пп. 1–3, содержащее последовательности SEQ ID NO:39, 40, 41 или 42.

12. Антитело против охMIF по любому из пп. 1–3, содержащее последовательности SEQ ID NO: 39, 44, 41 или 45.

13. Антитело против oxMIF по любому из пп. 1–12, выбранное из группы, состоящей из биспецифических антител, scFv, (scFv)₂, scFvFc, Fab, Fab', и F(ab')₂, Fab'-SH, слитых Fab-scFv, слитых Fab-(scFv)₂, Fab-scFv-Fc, Fab-(scFv)₂-Fc, слитых белков из двух одноцепочечных антител разных видов (BiTE), и минителя.
14. Антитело по любому из пп. 1–13 для применения при получении медикамента.
15. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп. 1–13, необязательно совместно с фармацевтическим носителем или адъювантом.
16. Фармацевтическая композиция по п. 15, характеризующаяся тем, что указанная композиция содержит 10–250 мг/мл антитела по любому из пп. 1–13, в частности, содержит > 50 мг/мл.
17. Фармацевтическая композиция по п. 15 или 16, характеризующаяся тем, что указанная фармацевтическая композиция выполнена с возможностью подкожного введения.
18. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 15–17, характеризующаяся тем, что указанная композиция предназначена для введения в качестве единственного вещества, или для введения с дополнительной фармацевтической композицией, содержащей одно или более активных веществ, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из противовирусных, противовоспалительных, противораковых, антиангиогенных и антибиотических веществ.
19. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 15–18 для применения в лечении пациента, страдающего воспалительным заболеванием, гиперпролиферативным нарушением, инфекционным заболеванием или раком, в частности, в лечении астмы, васкулита, артрита, сепсиса, септического шока, эндотоксического шока, синдрома токсического шока, приобретенного респираторного дистресс-синдрома, гломерулонефрита, воспалительного заболевания кишечника, болезни Крона, язвенного колита, перитонита, нефрита и псориаза, рака ободочной и прямой кишки, рака яичников,

рака молочной железы, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы и рака легкого.

5

20. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по любому из пп. 1–13.

21. Экспрессионный вектор, содержащий молекулу (молекулы) нуклеиновой кислоты по п. 20.

10

22. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 20 или экспрессионный вектор по п. 21.

15

23. Способ получения антитела по любому из пп. 1–13, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 22 и выделение указанного антитела из культуры клеток.

Фиг. 1:

Последовательности константной тяжелой цепи (CH), CH₁-CH₃

- Дикий тип (wt)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID
NO:1)

- S239D/I332E

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP~~E~~EKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID
NO:2)

- S239D/I332E/H268F/S324T

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSFEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVTNKALPAP~~E~~EKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID
NO:3)

- R214K/S239D/K274Q/Y296F/Y300F/L309V/I332E/A339T/V397M

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP~~E~~EKTISKTKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPM

LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:4)

- L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L/E356D/M358L

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELVGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTLRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSRDE~~L~~TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPLVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:5)

Последовательности VH

- wt

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMNWVRQAPGKGLEWVSSIG
SSGGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGSQWLYGMDVW
GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:6)

- L5Q

EVQL**Q**ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMNWVRQAPGKGLEWVSSI
GSSGGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGSQWLYGMDV
WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:7)

- L5Q/W97Y

EVQL**Q**ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMNWVRQAPGKGLEWVSSI
GSSGGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGSQYLYGMDV
WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:8)

Последовательности VL

- wt

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQRIMTYLNWYQQKPKGKAPKLLIFVASH
SQSGVPSRFRGSGSETDFTLTISGLQPEDSATYYCQQSFWTPLTFGGGTKVEIK
(SEQ ID NO:9)

- F49Y/A51G

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQRIMTYLNWYQQKPGKAPKLLIYVGS
SH
SQSGVPSRFRGSGSETDFTLTISGLQPEDSATYYCQQSFWTPLTFGGG
TKVEIK
(SEQ ID NO:10)

- F49Y/A51G/W93F

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQRIMTYLNWYQQKPGKAPKLLIYVGS
SH
SQSGVPSRFRGSGSETDFTLTISGLQPEDSATYYCQQSFFTPLTFGGG
TKVEIK (SEQ
ID NO:11)

- M30L/F49Y/A51G/W93F

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQRILTYLNWYQQKPGKAPKLLIYVGS
SHS
QSGVPSRFRGSGSETDFTLTISGLQPEDSATYYCQQSFFTPLTFGGG
TKVEIK (SEQ
ID NO:12)

- M30L/F49Y/A51G/P80S/W93F

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQRILTYLNWYQQKPGKAPKLLIYVGS
SHS
QSGVPSRFRGSGSETDFTLTISGLQSEDSATYYCQQSFFTPLTFGGG
TKVEIK (SEQ
ID NO:13)

- Y36F/F49Y/A51G

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQRIMTYLNWFQQKPGKAPKLLIYVGS
SH
SQSGVPSRFRGSGSETDFTLTISGLQPEDSATYYCQQSFWTPLTFGGG
TKVEIK
(SEQ ID NO:37)

Последовательность CL

- wt

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYAPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(SEQ ID NO:38)

C0083 VH-L5Q/W97Y/VL-F49Y A51G W93F:

- Легкая цепь C0083

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQRIMTYLNWYQQKPGKAPKLLIYVGS
SH
SQSGVPSRFRGSGSETDFTLTISGLQPEDSATYYCQQSFFTPLTFGGG
TKVEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYAPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:39)

- Тяжелая цепь C0083

EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMNWVRQAPGKGLEWSSI
GSSGGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGSQYLYGMDV
WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO:40)

C0090 VH- L5Q W97Y/ VL -F49Y A51G M30L W93F P80S:

- Легкая цепь C0090

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQRILTYLNWYQQKPGKAPKLLIYVGS
HSGVPSRFRGSGSETDFTLTISGLQSEDSATYYCQQSFTPLTFGGGTKVEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:41)

- Тяжелая цепь C0090

EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMNWVRQAPGKGLEWSSI
GSSGGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGSQYLYGMDV
WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO:42)

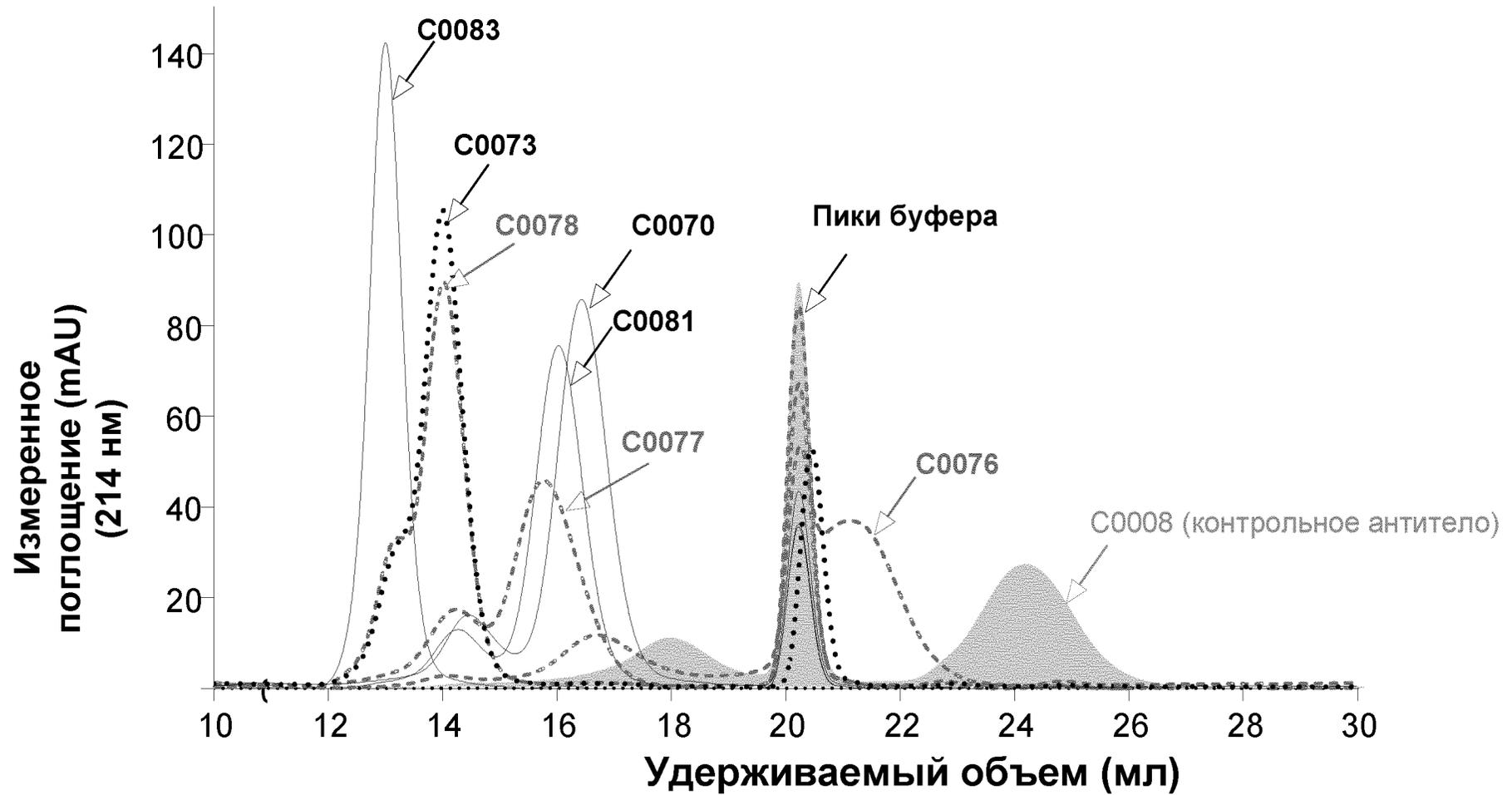
- Тяжелая цепь C0108

EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMNWVRQAPGKGLEWSSI
GSSGGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGSQYLYGMDV
WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVQFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVWHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEE
KTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO:44)

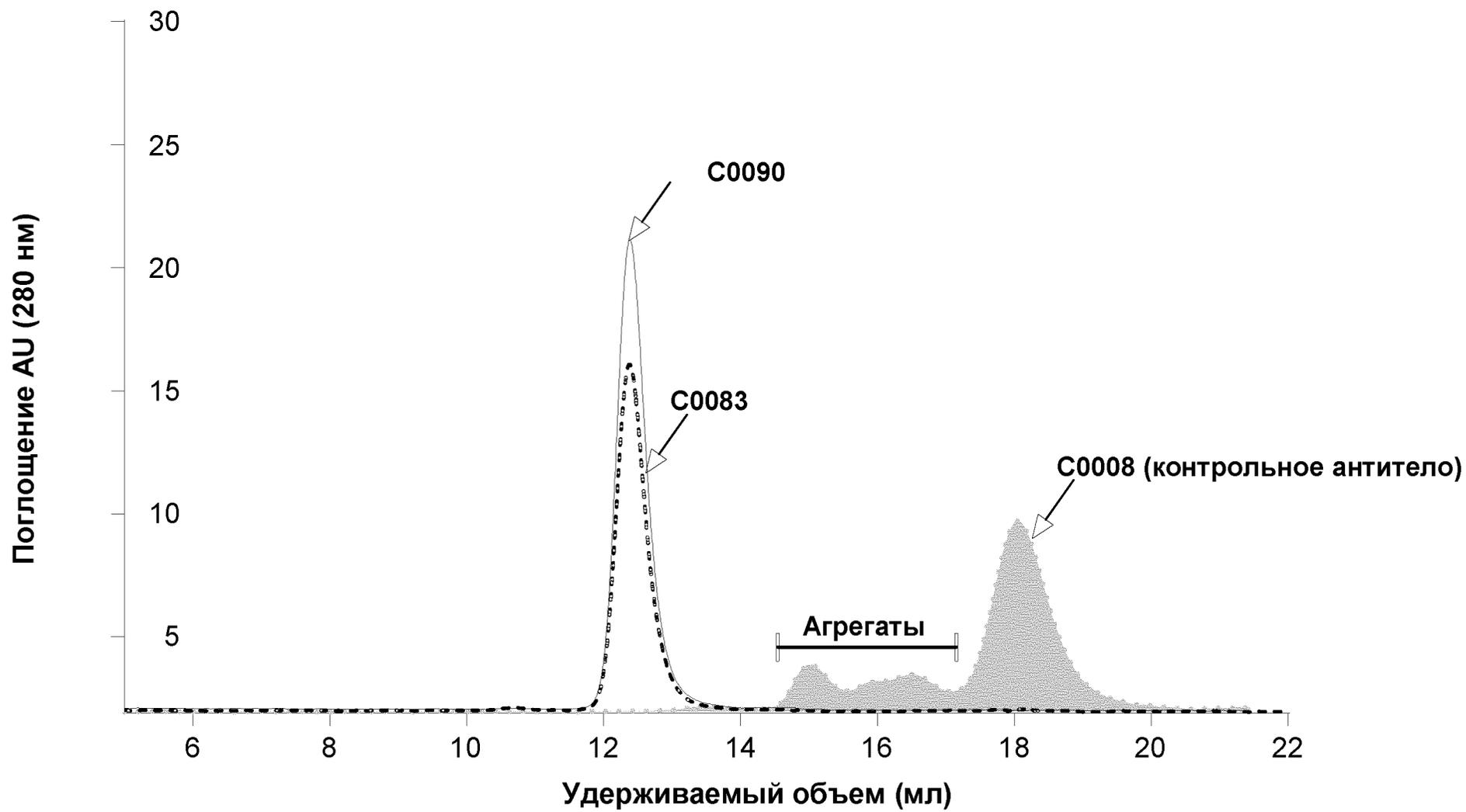
- Тяжелая цепь C0109

EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMNWVRQAPGKGLEWSSI
GSSGGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGSQYLYGMDV
WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVQFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVWHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEE
KTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO:45)

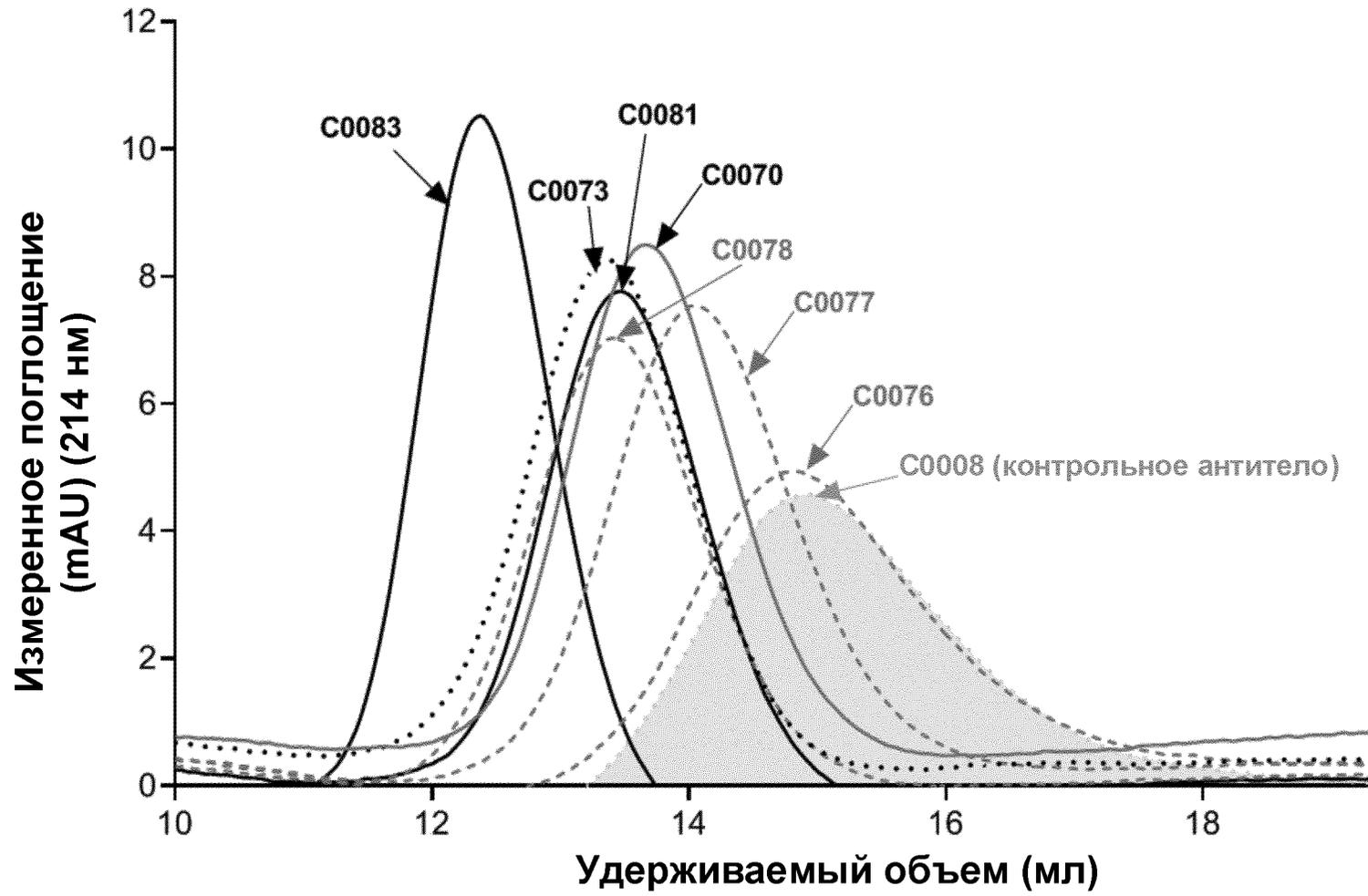
Фиг. 2А



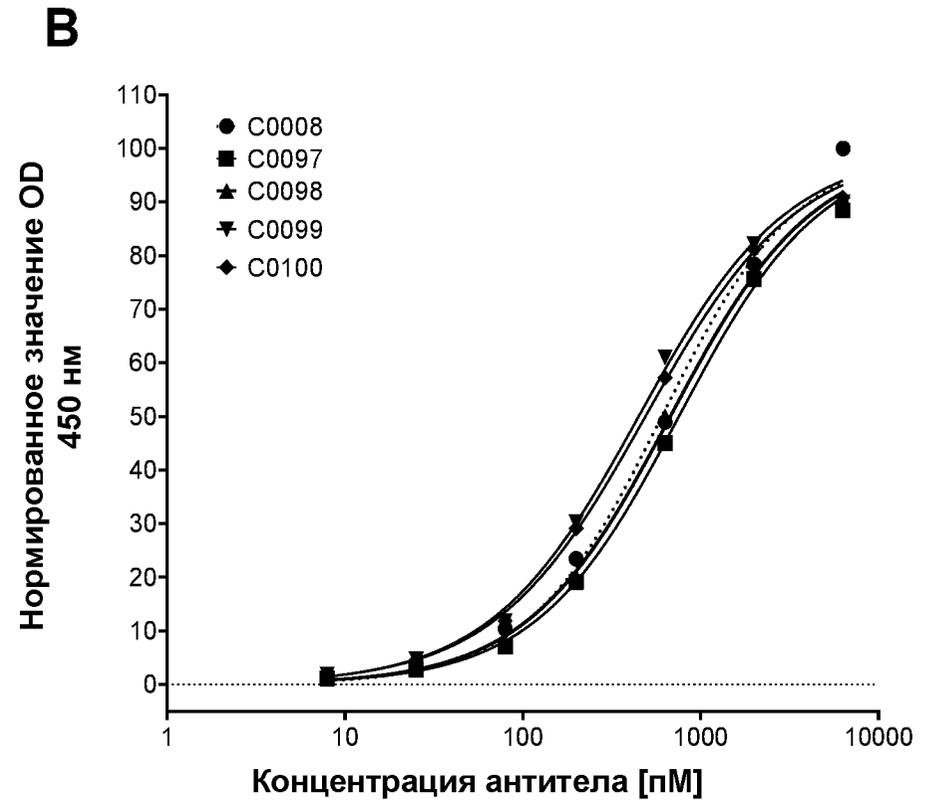
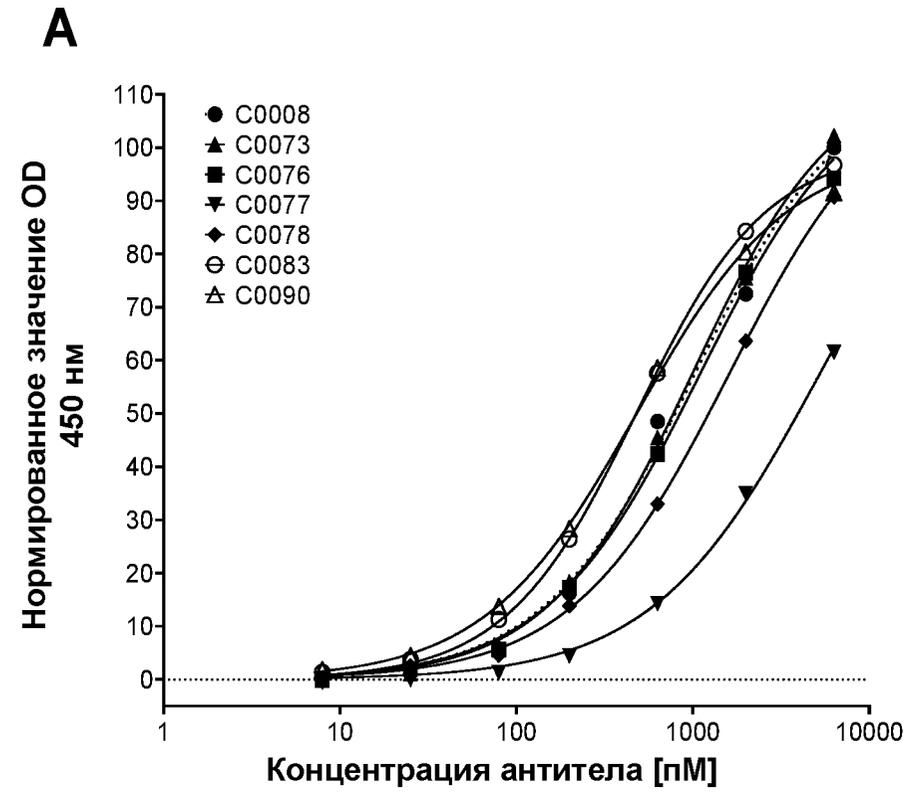
Фиг. 2В



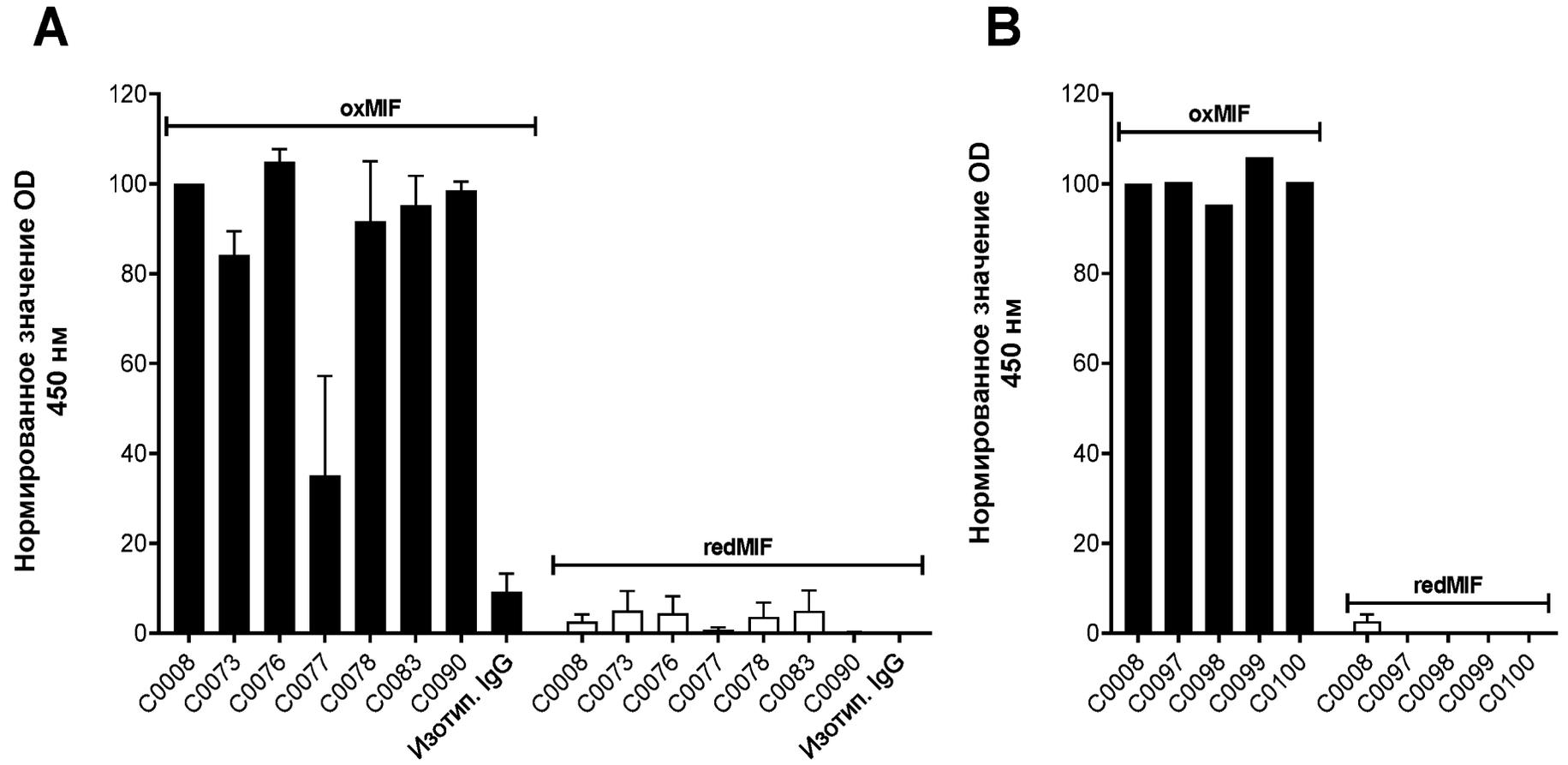
Фиг. 2С



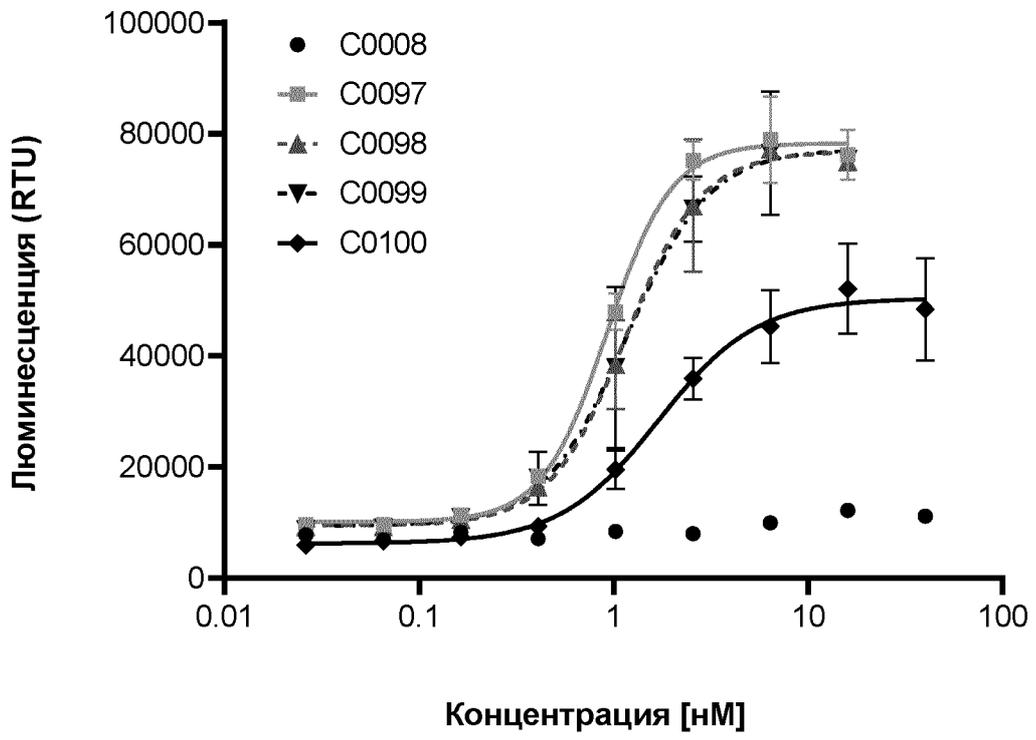
Фиг. 3



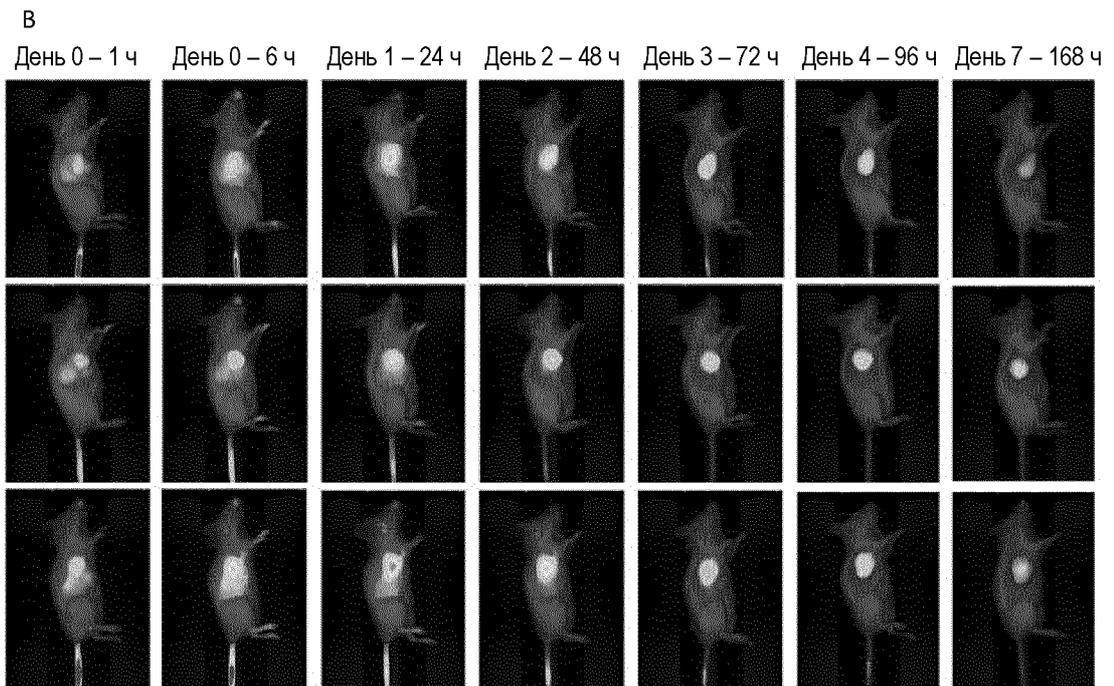
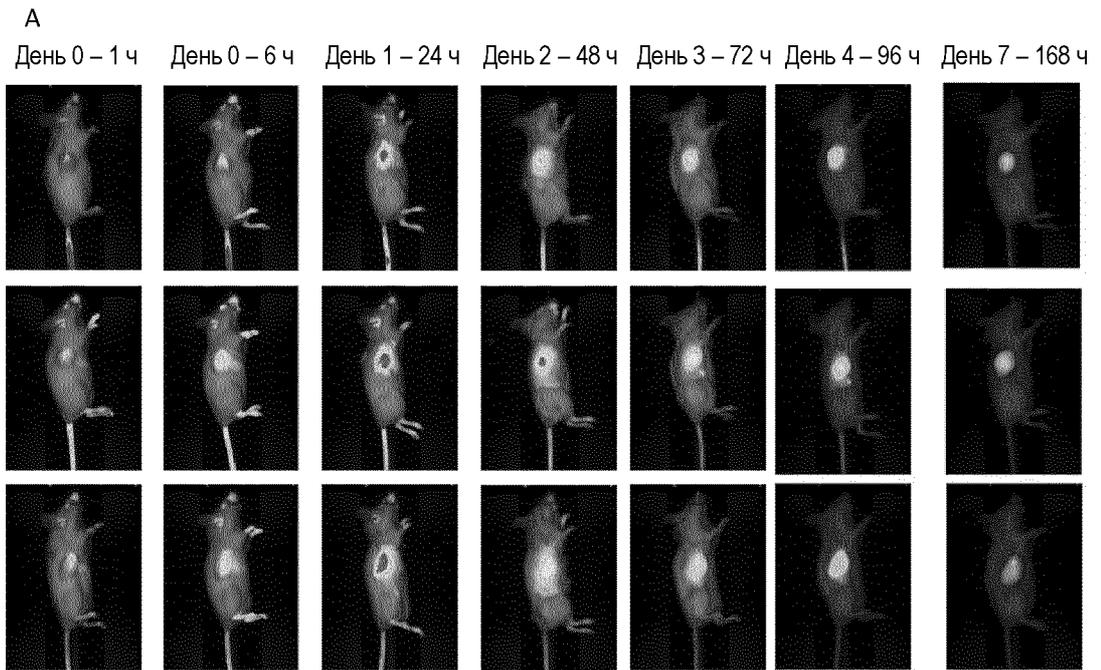
Фиг. 4



Фиг. 5

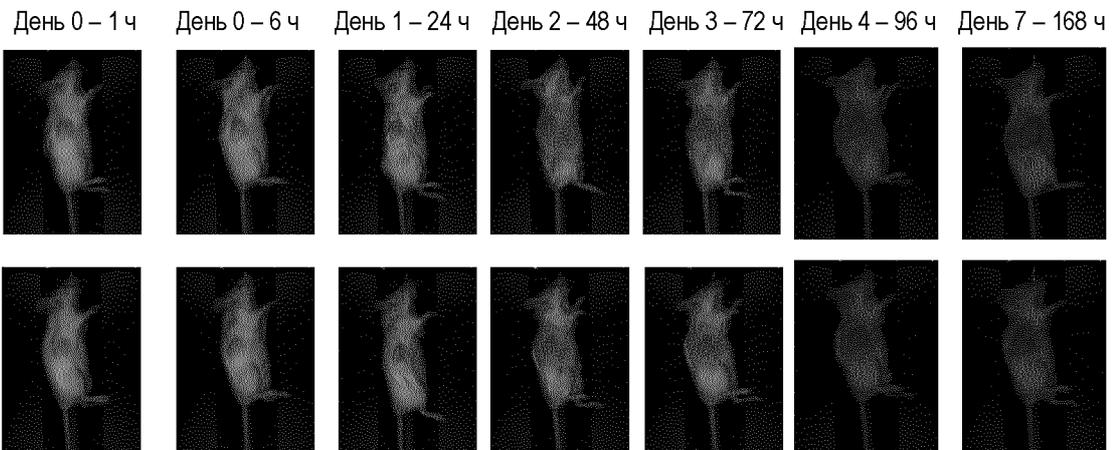


Фиг. 6

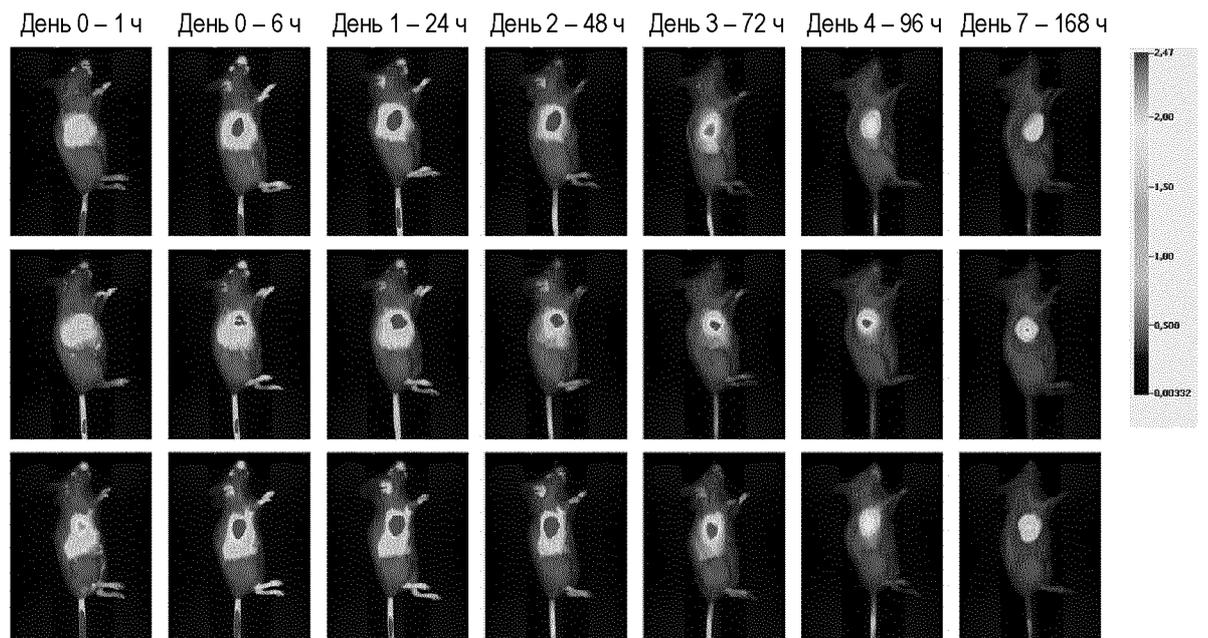


Фиг. 6 (продолжение)

С

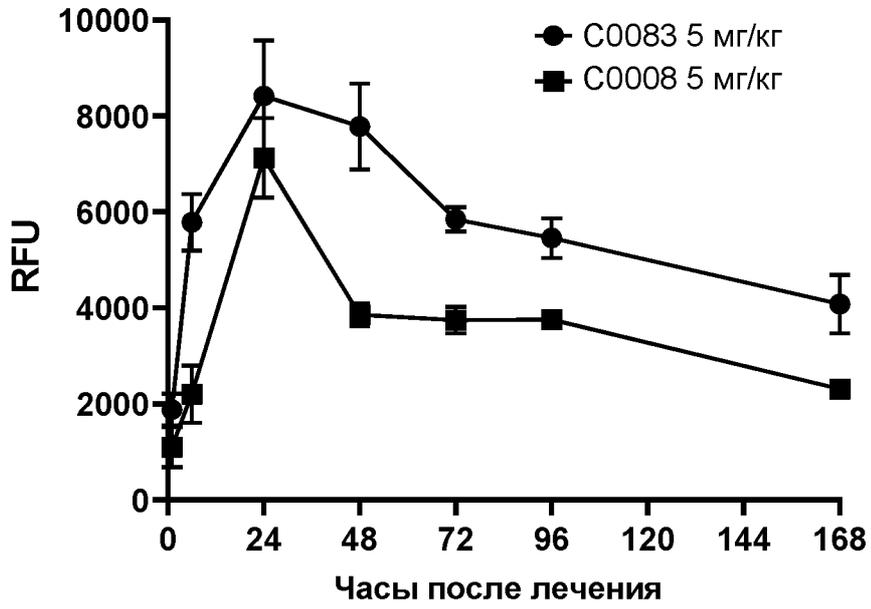


D

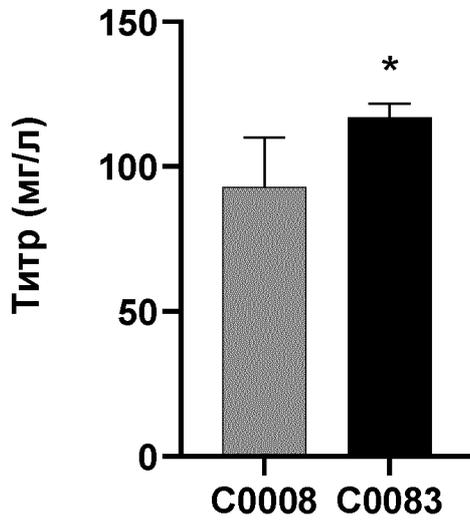


Фиг. 6 (продолжение)

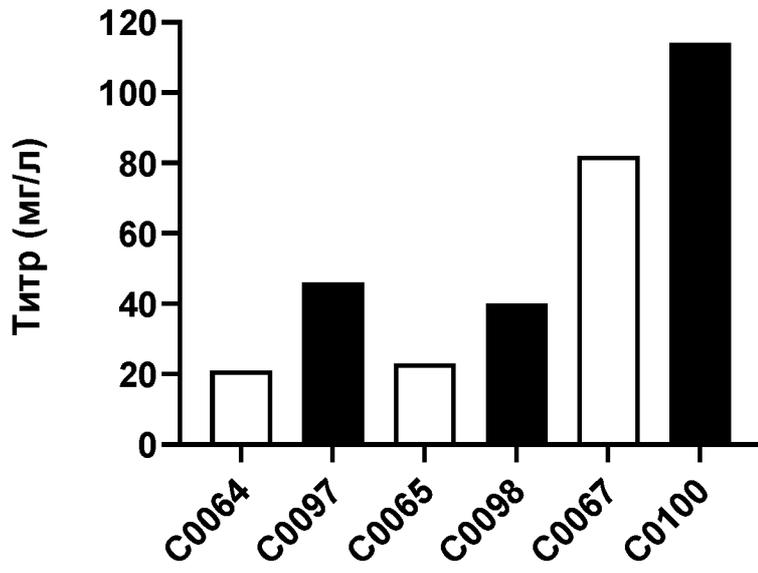
Е



Фиг. 7

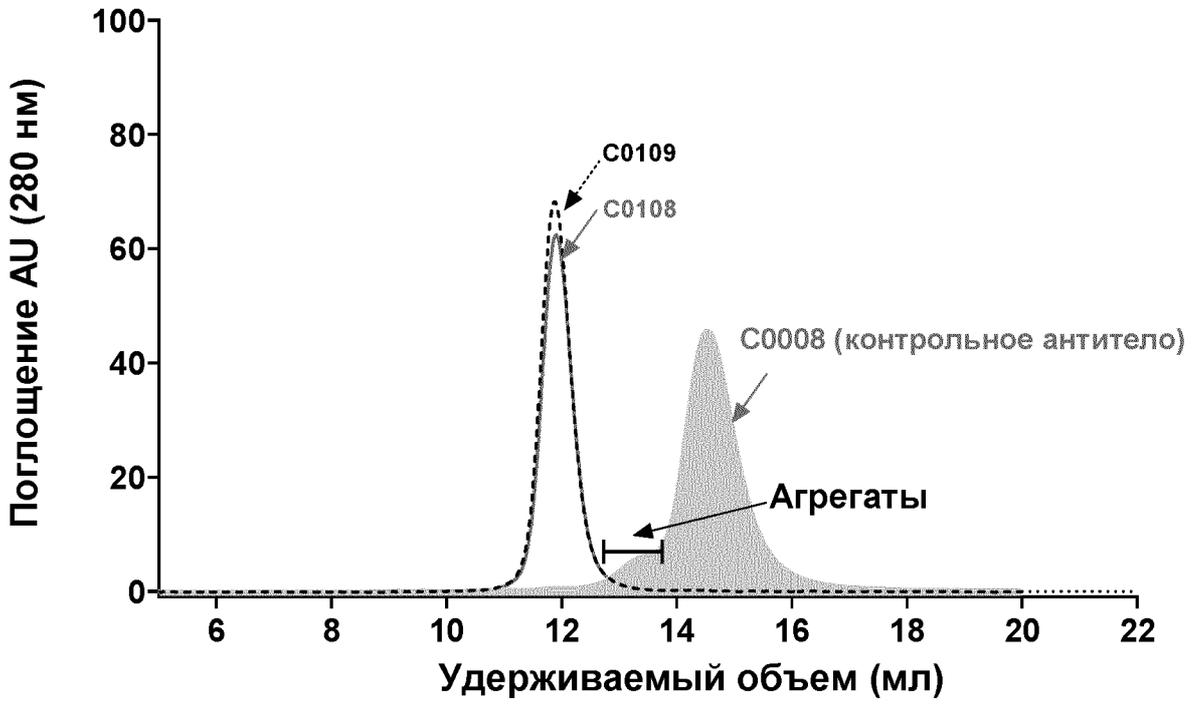


Фиг. 8

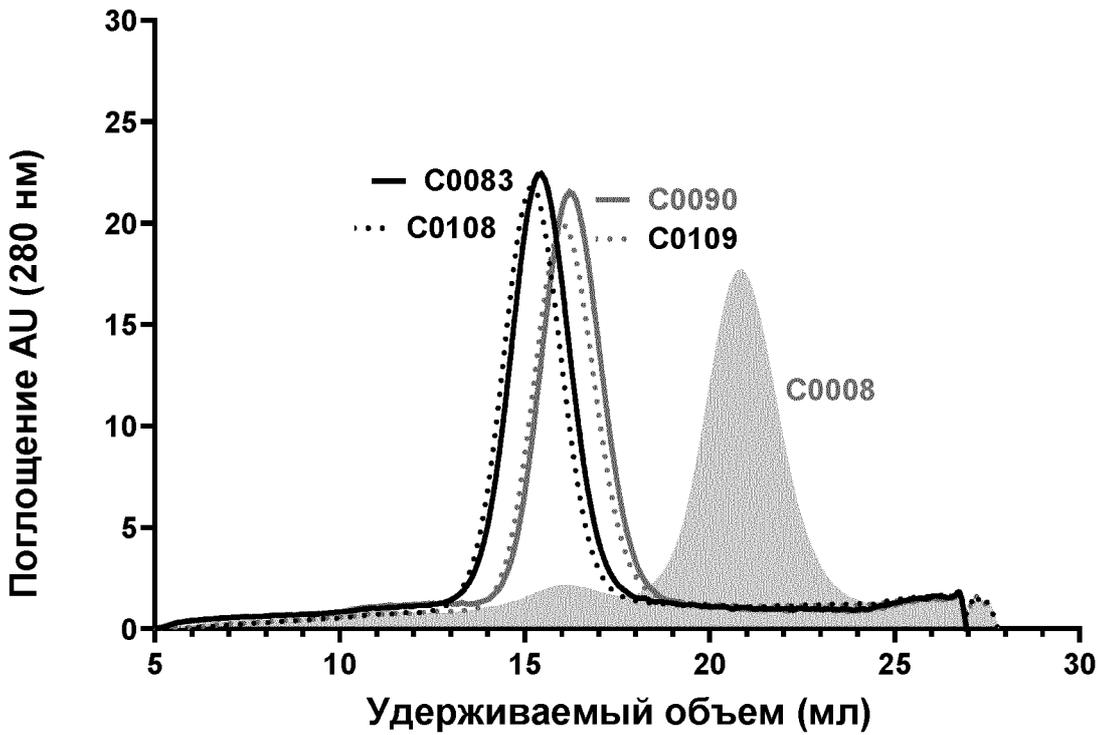


Фиг. 9

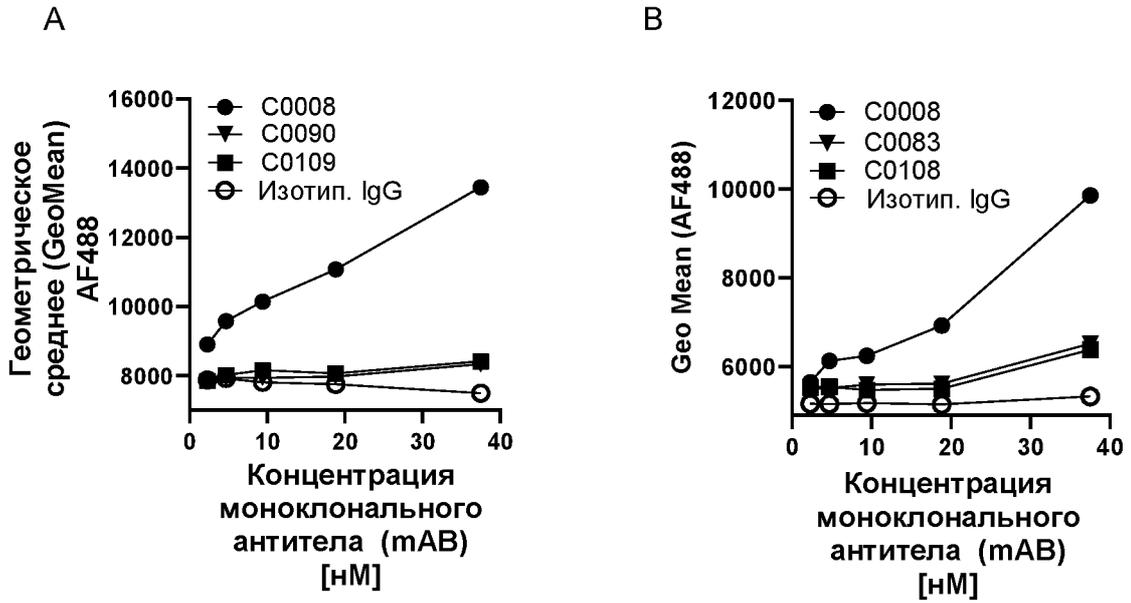
А



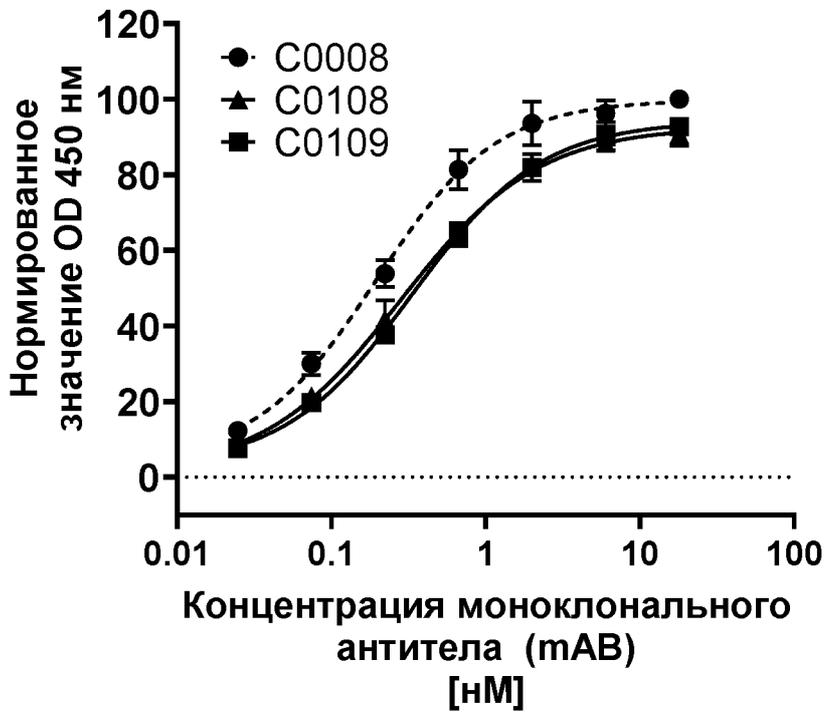
В



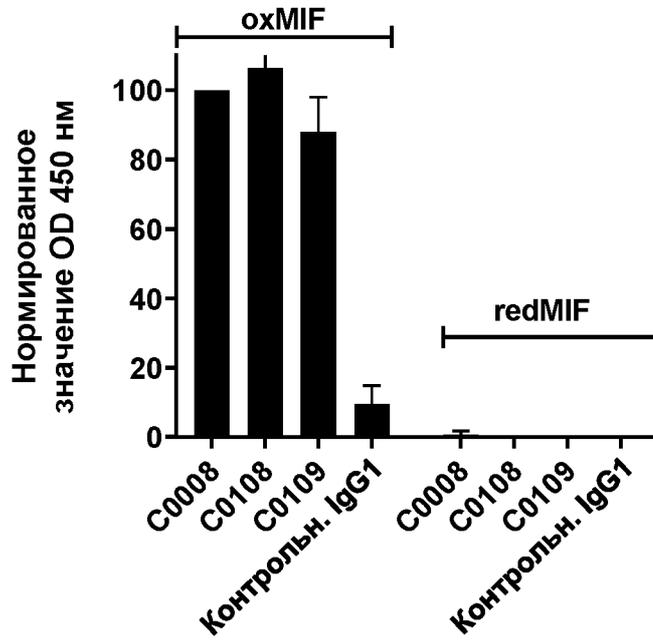
Фиг. 10



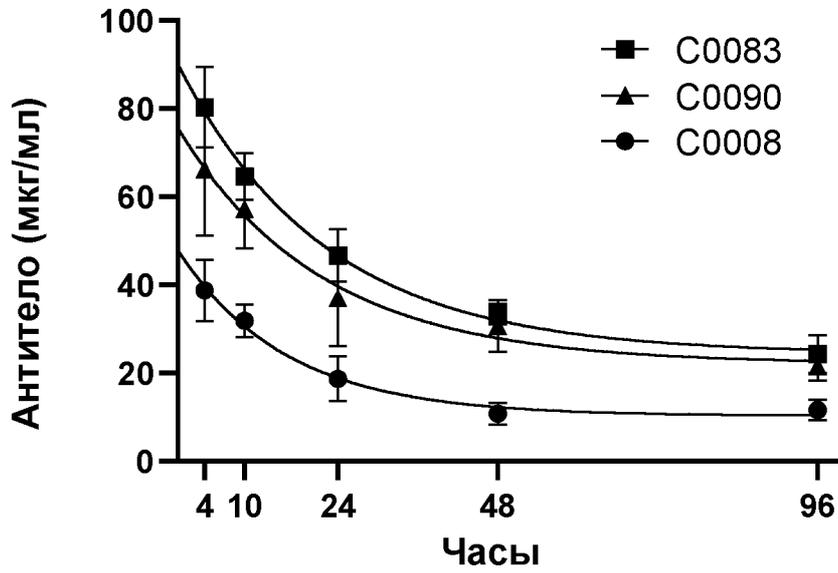
Фиг. 11



Фиг. 12

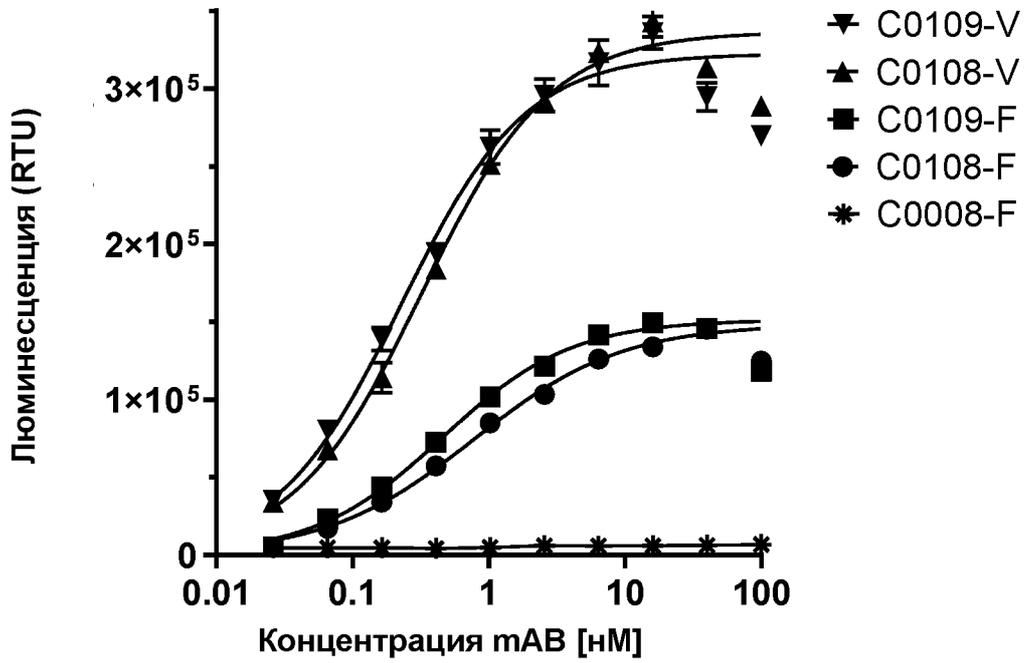


Фиг. 13

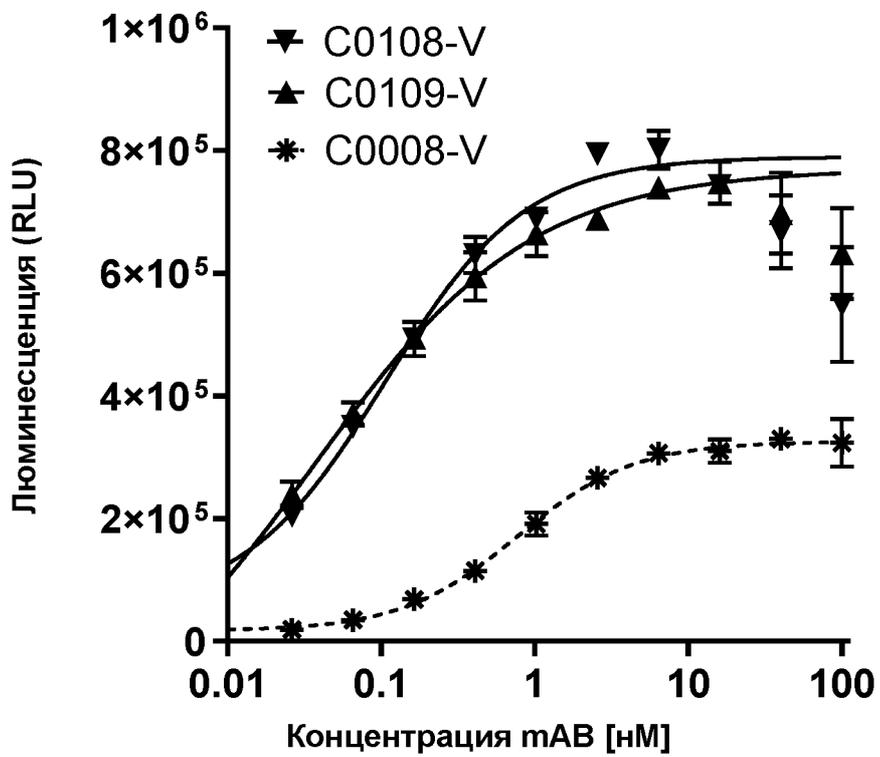


Фиг. 14

А

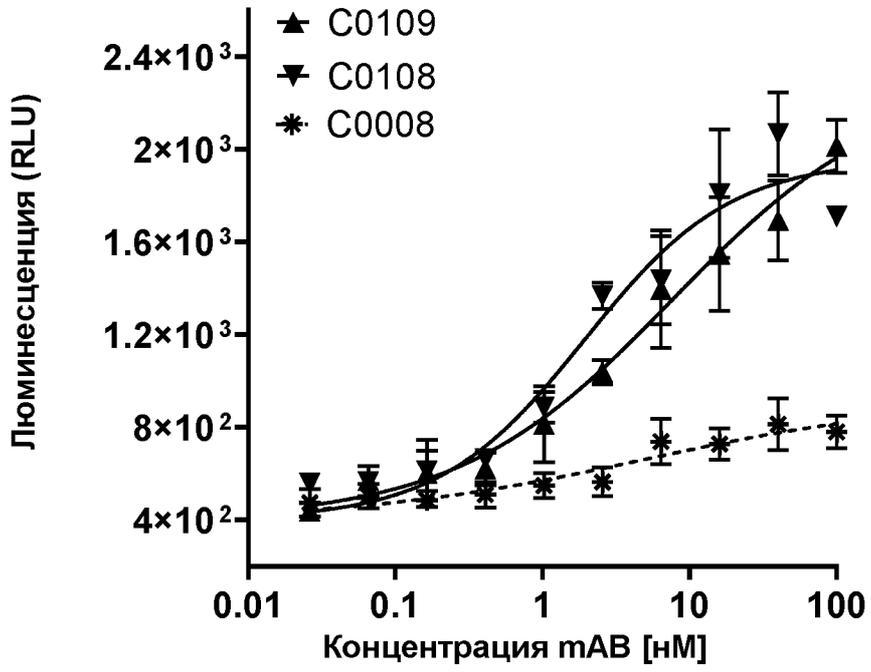


В



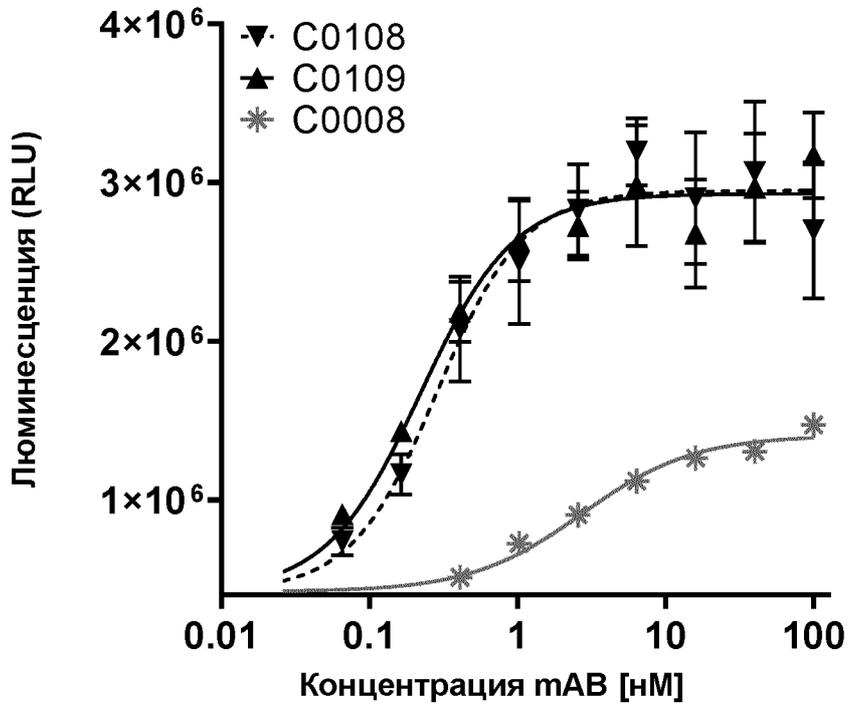
Фиг. 14 (продолжение)

С

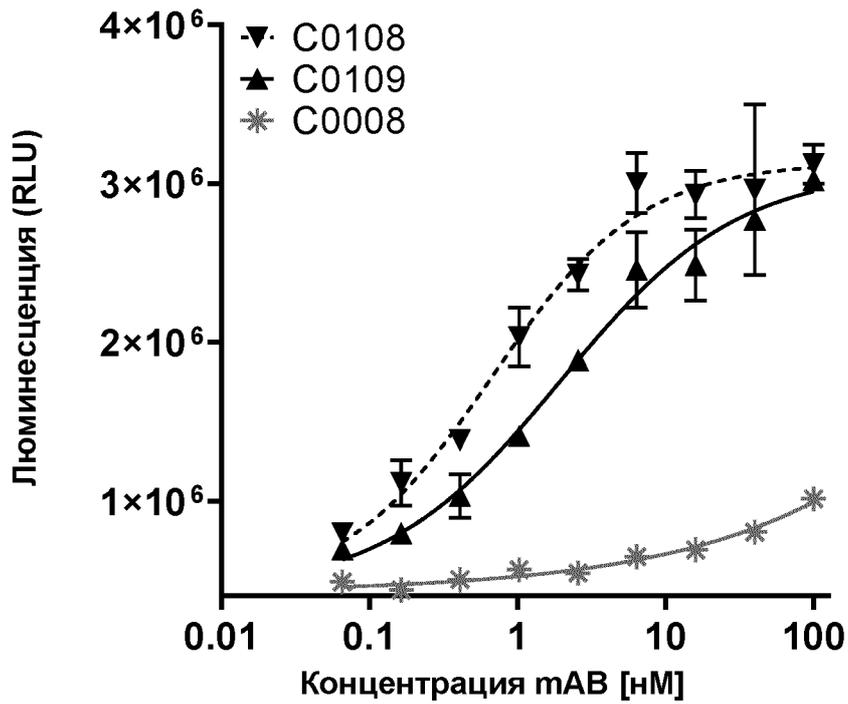


Фиг. 15

А

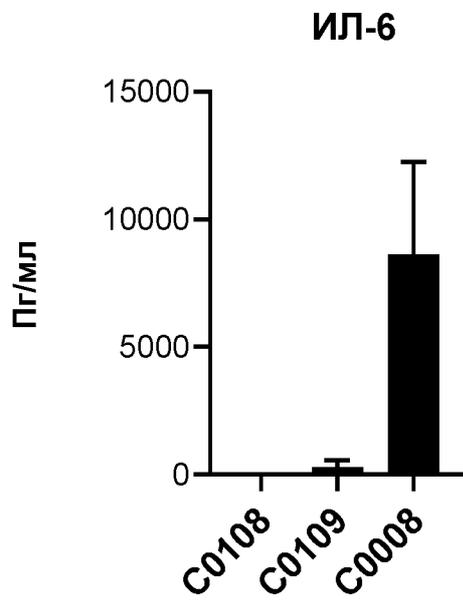


В



Фиг. 16

А



В

