

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201400568 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2014.12.30(22) Дата подачи заявки
2012.11.09(51) Int. Cl. C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(54) АЛБУМИНСВЯЗЫВАЮЩИЕ АНТИТЕЛА И ИХ СВЯЗЫВАЮЩИЕ ФРАГМЕНТЫ

(31) 61/558,559

(32) 2011.11.11

(33) US

(86) PCT/EP2012/072335

(87) WO 2013/068571 2013.05.16

(71) Заявитель:
ЮСБ ФАРМА С.А. (BE)(72) Изобретатель:
Адамс Ралф, Бхатта Паллави, Хейвуд
Сэм Филлип, Хамфриз Дейвид Пол
(GB)(74) Представитель:
Веселицкая И.А., Кузенкова Н.В.,
Веселицкий М.Б., Каксис Р.А.,
Белоусов Ю.В., Куликов А.В.,
Кузнецова Е.В. (RU)

(57) В заявке описано связывающее сывороточный альбумин антитело или его фрагмент, содержащее/содержащий переменный домен тяжелой цепи, который имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, и/или содержащее/содержащий переменный домен легкой цепи, который имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4, в частности, содержащее/содержащий переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, которые имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 3, или переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, которые имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 4.

белый домен легкой цепи, которые имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 4. В заявке описаны также полинуклеотиды, кодирующие антитела или фрагменты, векторы, которые их содержат, и клетки-хозяева, обладающие способностью экспрессировать полинуклеотиды. В заявке описаны также фармацевтические композиции, содержащие антитела или фрагменты, и терапевтическое применение любого из них.

1A



1B



Первый переменный домен легкой цепи VL1

Первый переменный домен тяжелой цепи VH1

Константные области сКарра и CH1

Второй переменный домен легкой цепи VL2

Второй переменный домен тяжелой цепи VH2

Дисульфидный мостик

A1

201400568

201400568

A1

5

10

15

Заявка № 201400568

Заявитель ЮСБ Фарма С.А., ВЕ

АЛЬБУМИНСВЯЗЫВАЮЩИЕ АНТИТЕЛА И ИХ СВЯЗЫВАЮЩИЕ
ФРАГМЕНТЫ

20

Настоящее изобретение относится к новым альбуминсвязывающим антителам и их фрагментам. Указанные антитела можно применять, например, для удлинения времени полужизни в сыворотке лекарственных средств или белков, конъюгированных с ними. Описаны также способы получения указанных молекул и содержащие их фармацевтические композиции.

25

30

Высокая специфичность и аффинность антител делает их идеальными диагностическими и терапевтическими агентами, прежде всего для модуляции белок: белковых взаимодействий. Успехи в области технологии получения рекомбинантных антител позволили получать фрагменты антител, такие как Fv-, Fab-, Fab'- и F(ab')₂-фрагменты и другие фрагменты антител. Указанные молекулы меньшего размера сохраняют антигенсвязывающую активность полных антител и могут также обладать улучшенной способностью проникать в ткани и улучшенными фармакокинетическими свойствами по сравнению с

полными молекулами иммуноглобулинов. Фактически фрагменты антител могут представлять собой универсальные терапевтические агенты, о чем свидетельствует успешное создание в настоящее время таких продуктов как ReoPro® и Lucentis®. Хотя очевидно, что указанные фрагменты обладают целым рядом преимуществ по сравнению с полными иммуноглобулинами, они имеют также недостаток, которым является повышенная скорость клиренса из сыворотки, поскольку у них отсутствует Fc-домен, который обеспечивает пролонгированное время жизни *in vivo* (Medasan и др., J. Immunol. 158, 1997, сс. 2211-2217).

10 Средства увеличения времени полужизни фрагментов антител, таких как Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ и другие фрагменты антител, известны. Одним из подходов является конъюгация фрагмента с молекулами полимеров. Так, короткое время полужизни Fab'-, F(ab')₂-фрагментов в кровотоке животных можно удлинять путем конъюгации с полиэтиленгликолем (ПЭГ; см., например, WO 98/25791, 15 WO 99/64460 и WO 98/37200). Другим подходом является модификация фрагмента антитела путем конъюгации с агентом, который взаимодействует с FcRn-рецептором (см., например, WO 97/34631). Еще один подход к удлинению времени полужизни заключается в применении полипептидов, которые связываются с сывороточным альбумином (см., например, Smith и др., 20 Bioconjugate Chem. 12, 2001, сс. 750-756; EP 0486525; US 6267964; WO 04/001064; WO 02/076489 и WO 01/45746). Сывороточный альбумин представляет собой белок, очень широко распространенный как в сосудистых, так и во внесосудистых компартментах, время полужизни которого у человека составляет примерно 19 дней (Peters, Adv Protein Chem. 37, 1985, сс. 161-245). 25 Этот показатель близок к времени полужизни IgG1, составляющему примерно 21 день (Waldeman и Strober, Progr. Allergy, 13, 1969, сс. 1-110).

Описаны связывающиеся с сывороточным альбумином единичные переменные домены антител, а также их применение в качестве конъюгатов для удлинения времени полужизни лекарственных средства, включая 30 представляющие собой лекарственные средства NCE (новая химическая субстанция), белки и пептиды (см., например, Holt и др., Protein Engineering, Design & Selection, т. 21, 5, сс. 283-288, WO 04003019, WO 2008/096158, WO 05118642, WO 2006/0591056 и WO 2011/006915). Другие антитела к

сывороточному альбумину и их применение в форматах мультиспецифических антител описаны в WO 2009/040562, WO 2010/035012 и WO2011/086091. В частности, ранее описаны два переменных домена, обозначенных как 645gH1 и 645gL1, последовательности которых представлены в настоящем описании в SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10.

В настоящем изобретении предложены улучшенные альбуминсвязывающие антитела, выведенные из указанных последовательностей. Преимуществом антител, представленных в настоящем описании, является то, что их аффинность сопоставима с аффинностью исходного антитела, и, кроме того, они могут обладать одним или несколькими свойствами, которые позволяют применять их в терапевтическом продукте, например, пониженной иммуногенностью, повышенной стабильностью, улучшенной экспрессией или т.п.

Предпочтительно антитела, предлагаемые в изобретении, связываются с человеческим сывороточным альбумином.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, связываются с сывороточным альбумином обезьян циномоглус, мышинным сывороточным альбумином и/или крысиным сывороточным альбумином.

Одним из вариантов осуществления настоящего изобретения является альбуминсвязывающее антитело или его фрагмент, которое/который содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

Одним из вариантов осуществления настоящего изобретения является альбуминсвязывающее антитело или его фрагмент, которое/который содержит переменную область легкой цепи, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4.

Одним из вариантов осуществления настоящего изобретения является альбуминсвязывающее антитело или его фрагмент, которое/который содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, и переменную область легкой цепи, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения переменная область тяжелой цепи содержит цистеин в положении 44 тяжелой цепи и имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.

5 Согласно одному из вариантов осуществления изобретения переменная область легкой цепи содержит цистеин в положении 100 легкой цепи и имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4.

10 Вариабельные области антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, можно включать в любой приемлемый формат антитела. К указанным антителам относятся полные антитела и их функционально активные фрагменты или производные. Таким образом, указанные альбуминсвязывающие антитела могут представлять собой полные молекулы антител, имеющие полноразмерные тяжелые и легкие цепи, или их фрагменты, и могут представлять собой (но, не ограничиваясь только ими) Fab, модифицированный Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, антитела в виде единичных переменных доменов, scFv, двух-, трех- или 15 четырехвалентные антитела, бис-scFv, димерные (диабоды), тримерные (триабоды), тетрамерные (тетрабоды), трибоды, DVD-Ig, DART, BiTE и эпитопсвязывающие фрагменты любого из указанных выше форматов (см., например, Holliger и Hudson, Nature Biotech. 23(9), 2005, сс. 1126-1136; Adair и Lawson, Drug Design Reviews - Online 2(3), 2005, сс. 209-217). Методы создания 20 и производства указанных фрагментов антител хорошо известны в данной области (см., например, Verma и др., Journal of Immunological Methods, 216, 1998, сс. 165-181). Мультивалентные антитела могут содержать несколько специфичностей или могут являться моноспецифическими (см., например, WO 92/22853, WO 99/37791 и WO 05/113605). Другие 25 мультивалентные/мультиспецифические форматы включают форматы, описанные в WO 2009/040562, WO 2010/035012 и WO 2011/086091, в том числе Fab-Fv и Fab-dsFv, которые проиллюстрированы в настоящем описании на фиг 1А и фиг. 1Б соответственно.

30 Домены константных областей молекулы антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, если они присутствуют, можно выбирать, учитывая предполагаемую функцию молекулы антитела, и, в частности эффекторные функции, которые могут требоваться. Например, домены константной области могут представлять собой домены человеческого IgA, IgD, IgE, IgG или IgM. В

частности, можно применять домены константной области человеческого IgG, прежде всего изотипов IgG1 и IgG3, когда требуются эффекторные функции антитела. В альтернативном варианте, когда не требуются эффекторные функции антитела, можно применять изотипы IgG2 и IgG4. Как должно быть очевидно, можно применять также варианты последовательностей указанных доменов константных областей. Например, можно применять молекулы IgG4, в которых серин в положении 241 заменен на пролин, описанные у Angal и др., *Molecular Immunology*, 30(1), 1993, сс. 105-108. Специалисту в данной области также должно быть очевидно, что антитела можно подвергать различным пост-трансляционным модификациям. Тип и степень указанных модификаций часто зависят от линии клеток-хозяев, применяемой для экспрессии антитела, а также от условий культивирования. Указанные модификации могут включать вариации гликозилирования, окисления метионина, формирования дикетопиперазина, изомеризации аспартата и деаминирования аспарагина. Часто встречающейся модификацией является потеря карбоксиконцевого основного остатка (такого как лизин или аргинин) под действием карбоксипептидаз (как это описано у Harris R.J., *Journal of Chromatography* 705, 1995, сс. 129-134).

В одном из вариантов осуществления изобретения тяжелая цепь антитела содержит CH1-домен и легкая цепь антитела содержат CL-домен либо каппа-, либо лямбда-цепи.

Как должно быть очевидно, указанные альбуминсвязывающие антитела или их фрагменты можно при необходимости конъюгировать с любыми другими антителами или их фрагментами, другими белками, такими как ферменты, гормоны, цитокины, пептиды или другие молекулы или лекарственные средства. Альбуминсвязывающие антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, наиболее предпочтительно следует применять для удлинения времени полужизни в сыворотке указанных конъюгированных с ними субстанций.

В одном из примеров альбуминсвязывающее антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, связывают, ковалентно или нековалентно, с выбранным терапевтическим или диагностическим соединением. Приемлемые терапевтические соединения могут включать, например, агонисты или антагонисты рецепторов, ингибиторы ферментов, хелаторы металлов,

противовирусные агенты, противогрибковые агенты, сердечно-сосудистые лекарственные средства и химиотерапевтические лекарственные средства.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения альбуминсвязывающее антитело или его фрагмент, предлагаемое/предлагаемый в настоящем изобретении, сливают или конъюгируют со вторым антителом или его фрагментом, которое/который связывается с представляющим интерес антигеном.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения представляющий интерес антиген, с которым связывается второе антитело или фрагмент антитела, может представлять собой ассоциированный с клеткой белок, например, белок клеточной поверхности, находящийся на клетках, таких как бактериальные клетки, дрожжевые клетки, Т-клетки, эндотелиальные клетки или опухолевые клетки, или может представлять собой растворимый белок. Представляющие интерес антигены могут представлять собой также любые приемлемые для медицинских целей белки, такие как белки, повышающая регуляция которых имеет место в процессе болезни или инфекции, например, рецепторы и/или соответствующие им лиганды. Конкретными примерами белков клеточной поверхности являются молекулы адгезии, например, интегрины, такие как $\beta 1$ -интегрины, например, VLA-4, E-селектин, P-селектин или L-селектин, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11a, CD11b, CD18, CD19, CD20, CD23, CD25, CD33, CD38, CD40, CD45, CDW52, CD69, CD134 (OX40), ICOS, BCMP7, CD137, CD27L, CDCP1, DPCR1, дудулин2, FLJ20584, FLJ40787, HEK2, KIAA0634, KIAA0659, KIAA1246, KIAA1455, LTBP2, LTK, MAL2, MRP2, нектинподобный белок 2, NKCC1, PTK7, RAIG1, TCAM1, SC6, BCMP101, BCMP84, BCMP11, DTD, карциноэмбриональный антиген (CEA), человеческий глобулин молочного жира (HMFG1 и 2), антигены ГКГС класса I и ГКГС класса II и VEGF, и при необходимости их рецепторы.

Растворимые антигены включают интерлейкины, такие как IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-16 или IL-17, вирусные антигены, например, антигены респираторного синцитиального вируса или цитомегаловируса, иммуноглобулины, такие как IgE, интерфероны, такие как интерферон α , интерферон β или интерферон γ , фактор некроза опухолей- α , фактор некроза опухолей- β , колониестимулирующие факторы, такие как G-CSF или GM-CSF, и

тромбоцитарные факторы роста, такие как PDGF- α и PDGF- β , и при необходимости их рецепторы. Другие антигены включают поверхностные антигены бактериальных клеток, бактериальные токсины, вирусы, такие как вирус гриппа, EBV, HerA, B и C, биотеррористические агенты, радионуклиды и
5 тяжелые металлы, а также яды и токсин змей и пауков.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения антитело или его фрагмент можно применять для функционального изменения активности представляющего интерес антигена. Например, антитело может непосредственно или опосредованно обладать нейтрализующим, антагонистическим или
10 агонистическим действием в отношении активности указанного антигена.

Антитело или его фрагмент, конъюгированное/конъюгированный с альбуминсвязывающим антителом, предлагаемым в настоящем изобретении, можно получать из любых видов, но предпочтительно его выводят из
15 моноклонального антитела, полностью человеческого антитела или гуманизированного антитела. Фрагмент антитела, предназначенный для применения согласно настоящему изобретению, можно выводить из молекулы иммуноглобулина любого класса (например, IgG, IgE, IgM, IgD или IgA) или подкласса и можно получать из любых видов, включая, например, мышей, крыс, акул, кроликов, свиней, хомяков, верблюдов, лам, коз или человека.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения антитело представляет собой Fab- или Fab'-фрагмент, который является фрагментом моноклонального, полностью человеческого, гуманизированного или химерного антитела. Согласно одному из вариантов осуществления изобретения Fab- или Fab'-фрагменты антитела являются полностью человеческими или
20 гуманизированными.

Моноклональные антитела можно получать с помощью любого метода, известного в данной области, такого как метод гибридом (Kohler и Milstein, Nature, 256, 1975, сс. 495-497), метод триом, метод человеческих В-клеточных гибридом (Kozbor и др., Immunology Today, 4, 1983, с. 72) и метод EBV-
30 гибридом (Cole и др., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, изд-во Alan R Liss, Inc., 1985, сс. 77-96).

Антитела, предназначенные для применения согласно настоящему изобретению, можно создавать с помощью, основанных на использовании

антител индивидуальных лимфоцитов, путем клонирования и экспрессии кДНК
вариабельных областей иммуноглобулинов, которые вырабатываются
индивидуальными лимфоцитами, отобранными по признаку производства
специфических антител, например, с помощью методов, описанных у Babcook J.
5 и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(15), 1996, сс. 7843-78481; в WO 92/02551, WO
2004/051268 и WO 2004/106377.

Гуманизированные антитела представляют собой молекулы антител из
видов кроме человека, которые имеют один или несколько гипервариабельных
участков (CDR) из видов кроме человека и каркасный участок из молекулы
10 человеческого иммуноглобулина (см., например, US 5585089).

Антитела, предназначенные для применения согласно настоящему
изобретению, можно создавать также с помощью различных известных в данной
области методов фагового дисплея, которые включают методы, описанные у
Brinkman и др., J. Immunol. Methods, 182, 1995, сс. 41-50; Ames и др., J. Immunol.
15 Methods, 184, 1995, сс. 177-186, Kettleborough и др., Eur. J. Immunol., 24, 1994,
сс. 952-958; Persic и др., Gene, 187, 1997, сс. 9-18; Burton и др., Advances in
Immunology, 57, 1994, сс. 191-280; WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047;
WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; и WO 95/20401; и US 5698426;
5223409; 5403484; 5580717; 5427908; 5750753; 5821047; 5571698; 5427908;
20 5516637; 5780225; 5658727; 5733743 и 5969108. Кроме того, для создания
гуманизированных антител можно использовать трансгенных мышей или другие
организмы, включая другие виды млекопитающих.

Полностью человеческими являются антитела, в которых вариабельные
области и константные области (если присутствуют) как тяжелых, так и легких
25 цепей все имеют человеческое происхождение или практически идентичны
последовательностям человеческого происхождения, но необязательно получены
из того же самого антитела. Примерами полностью человеческих антител могут
являться антитела, полученные, например, с помощью описанных выше методов
фагового дисплея, и антитела, полученные с использованием мышей, в которых
30 мышинные гены вариабельных и/или константных областей иммуноглобулина
заменены их человеческими копиями, например, согласно описанному в целом в
EP 0546073 B1, US 5545806, US 5569825, US 5625126, US 5633425, US 5661016,
US 5770429, EP 0438474 B1 и EP 0463151 B1.

Исходный продукт для фрагмента антитела, например, Fab или Fab', предназначенного для применения согласно настоящему изобретению, можно получать из любого полного антитела, прежде всего полного моноклонального антитела, с помощью любых приемлемых методов ферментативного расщепления и/или разложения, например, путем обработки пепсином. В альтернативном или дополнительном варианте исходный материал для антитела можно получать с помощью методов рекомбинантной ДНК, включающих манипуляцию и повторную экспрессию ДНК, которая кодирует переменные и/или константные области антитела. При необходимости можно применять стандартные методы молекулярной биологии для модификации, добавления или делеции аминокислот или доменов. Имеющие любые изменения переменные или константные области все еще подпадают под понятия «переменных» и «константных» областей, применяемых в контексте настоящего описания.

Исходный материал для фрагмента антитела можно получать из любых видов, включая, например, мышей, крыс, кроликов, хомяков, верблюдов, лам, коз или человека. Части фрагментов антител можно получать из более чем одного вида, например, фрагменты антител могут быть химерными. В одном из примеров константные области получают из одного вида, а переменные области из другого. Исходный материал для фрагмента антитела может также быть модифицирован. В другом примере переменную область фрагмента антитела создавали с использованием методов конструирования рекомбинантной ДНК. Указанные сконструированные версии включают версии, созданные, например, из встречающихся в естественных условиях переменных областей антител с помощью инсерций, делеций или замен, затрагивающих аминокислотные последовательности встречающихся в естественных условиях антител. Конкретные примеры такого типа включают сконструированные домены переменных областей, содержащие по меньшей мере один CDR и необязательно одну или несколько аминокислот каркасного участка из одного антитела, а остальной домен переменной области из второго антитела. Методы создания и производства указанных фрагментов антител хорошо известны в данной области (см. например, Boss и др., US 4816397; Cabilly и др., US 6331415; Shrader и др., WO 92/02551; Ward и др., Nature, 341, 1989, с. 544; Orlandi и др., Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 86, 1989, с. 3833; Riechmann др., Nature,

322, 1988, с. 323; Bird и др., Science, 242, 1988, с. 423; Queen и др., US 5585089; Adair, WO 91/09967; Mountain и Adair, Biotechnol. Genet. Eng. Rev, 10, 1992, сс. 1-142; Verma и др., Journal of Immunological Methods, 216, 1998, сс. 165-181).

В одном из примеров альбуминсвязывающий вариабельный домен, предлагаемый в настоящем изобретении, сливают с однодоменным антителом или dAb. Единичные вариабельные домены, известные также как однодоменные антитела или dAb, предназначенные для применения согласно настоящему изобретению, можно создавать с помощью методов, известных в данной области, включая методы, описанные в WO 2005/118642, у Ward и др., Nature, 341, 1989, сс. 544-546 и Holt и др., Trends in Biotechnology, 21, 2003, сс. 484-490. В одном из вариантов осуществления изобретения однодоменное антитело, предназначенное для применения согласно настоящему изобретению, представляет собой вариабельный домен тяжелой цепи (VH) или вариабельный домен легкой цепи (VL). Каждый домен легкой цепи может относиться либо к каппа-, либо лямбда-подгруппе. Методы выделения доменов VH и VL описаны в данной области, см., например, EP 0368684 и Ward и др., выше. Указанные домены можно выводить из любых приемлемых видов или исходных материалов для антител. В одном из вариантов осуществления изобретения однодоменное антитело можно получать из организма грызунов, человека или других видов. В одном из вариантов осуществления изобретения однодоменное антитело является гуманизированным.

В одном из вариантов осуществления изобретения однодоменное антитело выводят из фаговой дисплейной библиотеки, используя методы, описанные, например, в WO 2005/118642, у Jespers и др., Nature Biotechnology, 22, 2004, сс. 1161-1165 и Holt и др., Trends in Biotechnology, 21, 2003, сс. 484-490. Предпочтительно указанные однодоменные антитела являются полностью человеческими, но их можно выводить также из других видов. В одном из вариантов осуществления изобретения единичный вариабельный домен является химерным, т.е. его каркасный участок имеет человеческое или практически человеческое происхождение, а CDR-участок(ки) имеет(ют) происхождение из видов кроме человека. Как должно быть очевидно, последовательность однодоменного антитела после ее выделения можно модифицировать для

улучшения характеристик однодоменного антитела, например, растворимости, как описано у Holt и др., выше.

В контексте настоящего описания понятие «практически человеческий» подразумевает, что сохраняются человеческие особенности исходного материала, которые могут удовлетворять требованиям с позиции иммуногенности. Понятие «практически человеческий материал» может включать материал, в котором одна аминокислота в последовательности каркасного участка добавлена, удалена в результате делеции или замены другой аминокислотой.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения dAb имеет человеческую последовательность, полученную на основе дисплея scFv-фага или из трансгенных мышей линии Humouse™ или Velocimouse™ или из гуманизированных последовательностей грызунов.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения dAb получают из человеческой последовательности или гуманизированной последовательности грызунов, верблюдов или акул. Указанное dAb предпочтительно должно быть гуманизированным. В одном из примеров однодоменное антитело представляет собой VHH-домен на основе иммуноглобулинов верблюдовых, описанных в EP 0656946. В одном из примеров верблюдов или лам иммунизируют представляющим интерес антигеном и отбирают образцы крови с соответствующим титром. Ген, кодирующий dAb, можно клонировать с использованием одноклеточной ПЦР или В-клетку(и), кодирующую(ие) dAb, можно иммортализовать путем трансформации EBV или путем слияния с клетками иммортальной линии.

В одном из примеров один или несколько переменных доменов антител, предлагаемых в настоящем изобретении, встраивают в мультвалентный формат антител согласно методу, описанному в WO 2009/040562, WO 2010/035012 или WO 2011/086091. Указанные форматы могут быть моноспецифическими, биспецифическими или триспецифическими. Таким образом, в одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения, представляющие собой антитело слитые белки, предлагаемые в изобретении, представляют собой транслируемые слитые белки, т.е. генетические слияния, последовательность каждого из которых кодируется экспрессионным вектором. В альтернативном

варианте компоненты представляющего собой антитело слитого белка можно сливать химическими путями, т.е. посредством химической конъюгации или химического перекрестного сшивания. Указанные химические пути известны в данной области.

5 Примеры указанных транслируемых слитых белков с дисульфидными мостиками и без них проиллюстрированы на фиг. 1А и 1Б.

 Таким образом, одним из вариантов осуществления изобретения является представляющий собой мультиспецифическое антитело слитый белок, который содержит Fab- или Fab'-фрагмент антитела, обладающий специфичностью в отношении представляющего интерес антигена, в котором указанный фрагмент слит по меньшей мере с одной последовательностью единичного переменного домена, специфического в отношении человеческого сывороточного альбумина, имеющего последовательность (SEQ), которая представлена в SEQ ID NO: 1, 2, 3 или 4.

15 В одном из примеров переменные домены альбуминсвязывающих антител, предлагаемых в настоящем изобретении, сливаются с фрагментами антител, такими как Fab'-фрагменты, которые несут нативную или модифицированную шарнирную область. Если фрагмент антитела, предназначенный для применения при получении указанного слитого белка, предлагаемого в изобретении, представляет собой Fab'-фрагмент, то указанный фрагмент, как правило, удлиняет С-конец тяжелой цепи на одну или несколько аминокислот. Таким образом, предлагаемое в изобретении слияние, представляющее собой антитело, может содержать Fab'-фрагмент, слитый в результате трансляции (или химически слитый) со связывающей альбумин 20 переменной областью, непосредственно или через линкер. Кроме того, примеры приемлемых Fab'-фрагментов антител включают описанные в WO 2005/003170 и WO 2005/003171.

 В другом примере фрагменты антител представляют собой Fab-фрагменты. Таким образом, предлагаемое в изобретении слияние, представляющее собой антитело, может содержать Fab-фрагмент, слитый в результате трансляции (или химически слитый) с линкерной последовательностью, которая в свою очередь слита в результате трансляции (или химически слита) с одной или несколькими связывающими альбумин переменными областями. Предпочтительно Fab-

фрагмент представляет собой Fab-фрагмент, который заканчивается на межцепочечных остатках цистеина, что описано в WO 2005/003169.

Согласно настоящему изобретению каждый вариабельный домен антитела к альбумину, слитый с Fab- или Fab'-фрагментом, может быть слит непосредственно или через линкер.

В контексте настоящего описания подразумевается, что понятие «непосредственно слитый» относится к тому факту, что «последняя» аминокислота Fab или Fab' сцеплена с помощью пептидной связи с «первой» аминокислотной единицей вариабельного домена альбуминсвязывающего антитела, предлагаемого в настоящем изобретении (или, как очевидно, наоборот).

Примерами линкерных областей, которые можно применять для связывания вариабельного домена с Fab или Fab', включают (но, не ограничиваясь только ими), гибкие линкерные последовательности и жесткие линкерные последовательности. Гибкие линкерные последовательности включают описанные у Huston и др., PNAS 85, 1988, сс. 5879-5883; Wright и Deonarain, Mol. Immunol., 44(11), 2007, сс. 2860-2869; Alftan и др., Prot. Eng., 8(7), 1995, сс. 725-731; Luo и др., J. Biochem., 118(4), 1995, сс. 825-831; Tang и др., J. Biol. Chem. 271(26), 1996, сс. 15682-15686 и у Turner и др., JIMM 205, 1997, сс. 42-54 (см. репрезентативные примеры в таблице 1).

Таблица 1. Гибкие линкерные последовательности

SEQ ID NO:	Последовательность
21	SGGGGSE
22	DKTHTS
23	(S)GGGGS
24	(S)GGGGSGGGGS
25	(S)GGGGSGGGGSGGGGS
26	(S)GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
27	(S)GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
28	AAAGSG-GASAS
29	AAAGSG-XGGGS-GASAS
30	AAAGSG-XGGGSXGGGS -GASAS
31	AAAGSG- XGGGSXGGGSXGGGS -GASAS
32	AAAGSG- XGGGSXGGGSXGGGSXGGGS-GASAS

SEQ ID NO:	Последовательность
33	AAAGSG-XS-GASAS
34	PGGNRGTTTTRRPATTTGSSPGPTQSHY
35	ATTTGSSPGPT
36	ATTTGS
-	GS
37	EPSGPISTINSPPSKESHKSP
38	GTVAAPSVFIFPPSD
39	GGGGIAPSMVGGGGGS
40	GGGGKVEGAGGGGGGS
41	GGGGSMKSHDGGGGGS
42	GGGGNLITIVGGGGGS
43	GGGGVVPSLPGGGGS
44	GGEKSIPGGGGGS
45	RPLSYRPPFPFGFPSVRP
46	YPRSIYIRRRHPSPLTT
47	TPSHLSHILPSFGLPTFN
48	RPVSPFTFPRLSNSWLPA
49	SPA AHFPRSIPRPGPIRT
50	APGPSAPSHRSLPSRAFG
51	PRNSIHFLHPLLVA PLGA
52	MPSLSGVLQVRYLSPPDL
53	SPQYPSPLTLTPHPSL
54	NPSLNPPSYLHRAPSRIS
55	LPWRTSLLPSLPLRRRP
56	PPLFAKGPVGLLSRSFPP
57	VPPAPVVSLRSAHARPPY
58	LRPTPPRVRSYTCCPTP-
59	PNVAHVLP LLTVPWDNLR
60	CNPLLPLCARSPAVRTFP

(S) является необязательным в последовательностях 23-27.

Примеры жестких линкерных последовательностей включают пептидные последовательности GAPAPAAPAPA (SEQ ID NO: 61), PPPP (SEQ ID NO: 62) и PPP.

5

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения последовательность шарнирной области антитела или ее часть применяют в

качестве линкера, например, указанную выше шарнирную последовательность. Как правило, Fab'-фрагменты антитела, предназначенные для применения согласно настоящему изобретению, несут нативную или модифицированную шарнирную область. Указанные шарнирные области применяют в качестве

5 встречающегося в естественных условиях линкера к фрагменту альбуминсвязывающего вариабельного домена. Нативная шарнирная область представляет собой шарнирную область, ассоциированную в норме с C_{H1} -доменом молекулы антитела. Модифицированная шарнирная область представляет собой любую шарнирную область, которая отличается по длине

10 и/или составу от нативной шарнирной области. Указанные шарнирные области могут включать шарнирные области из любого другого вида, например, шарнирные области человека, мышей, крыс, кроликов, хомяков, верблюдов, лам или коз. Другие модифицированные шарнирные области могут содержать полную шарнирную область, выведенную из антитела другого класса или

15 подкласса по сравнению с C_{H1} -доменом. Так, например, C_{H1} -домен из класса $\gamma 1$ можно присоединять к шарнирной области из класса $\gamma 4$. В альтернативном варианте модифицированная шарнирная область может содержать часть встречающейся в естественных условиях шарнирной области или

20 повторяющуюся единицу, где каждая единица в повторе выведена из встречающейся в естественных условиях шарнирной области. В следующем альтернативном варианте встречающуюся в естественных условиях шарнирную область можно изменять путем замены одного или нескольких остатков цистеина или других остатков на нейтральные остатки, такие как аланин, или

25 путем замены находящихся в соответствующем положении остатков на остатки цистеина. С помощью таких путей количество остатков цистеина в шарнирной области можно повышать или снижать. Помимо этого можно контролировать другие характеристики шарнирной области, такие как расстояние остатка(ов) цистеина от межцепочечной цистеина легких цепей, расстояние между

30 остатками цистеина в шарнирной области и состав других аминокислот в шарнирной области, которые могут влиять на свойства шарнирной области, такие как гибкость, например, можно включать в шарнирную область остатки глицина для повышения вращательной гибкости или можно включать остатки пролина для снижения гибкости. В альтернативном варианте в шарнирную

область можно включать комбинации заряженных или гидрофобных остатков для придания способности к мультимеризации (см., например, у Richter и др., Prot. Eng. 14(10), 2001, сс. 775-783 применение заряженных или ионных «хвостов», например, кислотных «хвостов», в качестве линкеров, и у Kostelny и др., J. Immunol. 5(1), 1992, сс. 1547-1553 применение последовательностей лейциновых молний). Другие модифицированные шарнирные области могут быть полностью синтетическими и их можно создавать для обеспечения требуемых свойств, таких как длина, состав и гибкость.

К настоящему времени описан целый ряд модифицированных шарнирных областей, например, в US 5677425, US 6642356, WO 99/15549, WO 2005/003170, WO 2005/003169, WO 2005/003170, WO 98/25971 и WO 2005/003171, и они включены в настоящее описание в качестве ссылки. Указанные шарнирные области, как правило, расположены за СН1-областью, но они могут также быть включены на конец константной области фрагмента легкой каппа-цепи или лямбда-цепи (см. примеры в таблице 3).

Таблица 3. Последовательности шарнирных линкеров

SEQ ID NO:	Последовательность
63	DKTHTCAA
64	DKTHTCPPCPA
65	DKTHTCPPCPATCPPCPA
66	DKTHTCPPCPATCPPCPATCPPCPA
67	DKTHTCPPCPAGKPTLYNSLVMSDTAGTCY
68	DKTHTCPPCPAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY
69	DKTHTCCVECPCPA
70	DKTHTCPRCPKSCDTPPPCPCPA
71	DKTHTCPSCPA

Вариабельные домены антител, предлагаемых в настоящем изобретении, представляют собой комплементарную VH/VL-пару, которая совместно связывает антиген, т.е. они представляют собой комплементарную VH/VL-пару, которая обладает одинаковой специфичностью связывания. Фактически они представляют собой VH/VL-пару, выведенную из одного и того же антитела.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения VH-домен сливают с С-концом константной области тяжелой цепи (CH1), а VL домен сливают с С-концом константной области легкой цепи (С-каппа или С-лямбда).

5 Согласно одному из вариантов осуществления изобретения VH и VL связывают дисульфидным мостиком, который, вероятно, придает дополнительную стабилизацию конструкции, что может оказаться целесообразным.

10 Согласно одному или нескольким вариантам осуществления изобретения дисульфидный мостик между константными областями тяжелых и легких цепей, например, в Fab, например, между CH-доменом и CL- или СК-доменом, отсутствует, например, в результате замены одного или нескольких остатков цистеина, который(ые) формирует(ют) мостик. Указанный один или указанные несколько остатков цистеина может(гут) быть заменен(ы), например, остатком серина.

15 Согласно одному или нескольким вариантам осуществления изобретения межцепочечный дисульфидный мостик между тяжелой и легкой цепью, т.е. между CH-доменом и CL- или СК-доменом, присутствует.

Одним из примеров настоящего изобретения является представляющий собой биспецифическое антитело слитый белок, который содержит:

20 тяжелую цепь, содержащую в направлении от N-конца первый переменный домен тяжелой цепи (V_{H1}), CH1-домен и второй переменный домен тяжелой цепи (V_{H2}),

25 легкую цепь, содержащую в направлении от N-конца первый переменный домен легкой цепи (V_{L1}), CL-домен и второй переменный домен легкой цепи (V_{L2}),

в котором указанные тяжелые и легкие цепи расположены так, что V_{H1} и V_{L1} образуют первый антигенсвязывающий сайт, а V_{H2} и V_{L2} образуют второй антигенсвязывающий сайт,

30 где антиген, связывающийся со вторым антигенсвязывающим сайтом, представляет собой человеческий сывороточный альбумин и второй переменный домен тяжелой цепи (V_{H2}) имеет последовательность SEQ ID NO:

1 и второй вариабельный домен легкой цепи (V_L2) имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения альбуминсвязывающие вариабельные области тяжелой и легкой цепи сцеплены дисульфидным мостиком. Таким образом, одним из примеров настоящего изобретения является представляющий собой биспецифическое антитело слитый белок, который содержит:

тяжелую цепь, содержащую в направлении от N-конца первый вариабельный домен тяжелой цепи (V_H1), CH1-домен и второй вариабельный домен тяжелой цепи (V_H2), легкую цепь, содержащую в направлении от N-конца первый вариабельный домен легкой цепи (V_L1), CL-домен и второй вариабельный домен легкой цепи (V_L2),

в котором указанные тяжелые и легкие цепи расположены так, что V_H1 и V_L1 образуют первый антигенсвязывающий сайт, а V_H2 и V_L2 образуют второй антигенсвязывающий сайт,

где антиген, связывающийся со вторым антигенсвязывающим сайтом, представляет собой человеческий сывороточный альбумин,

в котором второй вариабельный домен тяжелой цепи (V_H2) имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, и второй вариабельный домен легкой цепи (V_L2) имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, и

второй вариабельный домен тяжелой цепи (V_H2) и второй вариабельный домен легкой цепи (V_L2) сцеплены дисульфидным мостиком.

Одним из примеров настоящего изобретения является представляющий собой мультиспецифическое антитело слитый белок, который содержит:

тяжелую цепь, содержащую в направлении от N-конца первый вариабельный домен тяжелой цепи (V_H1), CH1-домен, второй вариабельный домен тяжелой цепи (V_H2) и третий вариабельный домен тяжелой цепи (V_H3),

легкую цепь, содержащую в направлении от N-конца первый переменный домен легкой цепи (V_L1), CL-домен, второй переменный домен легкой цепи (V_L2) и третий переменный домен легкой цепи (V_L3),

5 в котором указанные тяжелые и легкие цепи расположены так, что VH1 и VL1 образуют первый антигенсвязывающий сайт и VH2 и VL2 образуют второй антигенсвязывающий сайт, и VH3 и VL3 образуют третий антигенсвязывающий сайт,

где антиген, связывающийся со вторым или третьим антигенсвязывающим сайтом, представляет собой человеческий сывороточный альбумин, и

10 в котором второй или третий переменный домен тяжелой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, и второй или третий переменный домен легкой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4.

Как должно быть очевидно, между одним или несколькими доменами, 15 указанными выше, могут присутствовать линкеры. В частности, линкер может находиться между CL и VL2 и CH1 и VH2 и, если он присутствует, то линкер может находиться между VL2 и VL3 и VH2 и VH3. Приемлемые линкеры описаны выше. Дополнительные линкеры представлены на фиг. 2(д) и (е), SEQ ID NO: 5 и 6.

20 Согласно одному из вариантов осуществления изобретения антитело представляет собой scFv. Согласно одному из вариантов осуществления изобретения антитело представляет собой scFv, в котором переменные домены (VH и VL) сцеплены с помощью линкера, представленного в SEQ ID NO: 17.

25 Переменные домены антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, связываются с альбумином с аффинностью, достаточной для удлинения времени полужизни конъюгата, такого как Fab или Fab', *in vivo*. Из литературы известно, связывание с альбумином с аффинностью, характеризующейся величиной меньшей или равной 2,5 мкМ, может удлинять время полужизни *in vivo* (Nguyen A. и др., Protein Engineering, Design & Selection, 19(7), 2006, сс. 291-297). В 30 одном из примеров пара переменных доменов антитела, предлагаемая в настоящем изобретении, характеризуется высокой аффинностью связывания, например, 3 нМ (наномолярная). В одном из примеров связывание однодоменных антител с антигеном характеризуется аффинностью, находящейся в наномолярном

или микромолярном диапазоне. Аффинность можно измерять с помощью любого приемлемого метода, известного в данной области, включая метод поверхностного плазмонного резонанса с использованием встречающегося в естественных условиях или рекомбинантного сывороточного альбумина.

- 5 Предпочтительно связывание альбуминсвязывающего антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, с человеческим сывороточным альбумином характеризуется аффинностью, составляющей примерно 1мкМ или менее. Согласно одному из вариантов осуществления связывание антитела характеризуется аффинностью, составляющей примерно 500нМ или менее.
- 10 Согласно одному из вариантов осуществления связывание антитела характеризуется аффинностью, составляющей примерно 200нМ или менее. Согласно одному из вариантов осуществления связывание антитела характеризуется аффинностью, составляющей примерно 100нМ или менее. Согласно одному из вариантов осуществления связывание антитела
- 15 характеризуется аффинностью, составляющей примерно 50нМ или менее. Согласно одному из вариантов осуществления связывание антитела характеризуется аффинностью, составляющей примерно 20нМ или менее. Согласно одному из вариантов осуществления связывание антитела характеризуется аффинностью, составляющей примерно 10нМ или менее.
- 20 Согласно одному из вариантов осуществления связывание антитела характеризуется аффинностью, составляющей примерно 5нМ или менее. Согласно одному из вариантов осуществления связывание антитела характеризуется аффинностью, составляющей примерно 2нМ или менее. Согласно одному из вариантов осуществления связывание антитела
- 25 характеризуется аффинностью, составляющей примерно 1нМ или менее. Как должно быть очевидно, аффинность антител, предлагаемых в настоящем изобретении, можно изменять с помощью любого приемлемого метода, известного в данной области. Таким образом, настоящее изобретение относится также к вариантам молекул антител, предлагаемых в настоящем изобретении,
- 30 которые обладают повышенной аффинностью к альбумину. Такие варианты можно получать с помощью различных протоколов созревания аффинности, включая мутацию CDR (Yang и др., J. Mol. Biol., 254, 1995, сс. 392-403), перестановку цепи (Marks и др., Bio/Technology, 10, 1992, сс. 779-783),

применение штаммов-мутаторов *E. coli* (Low и др., J. Mol. Biol., 250, 1996, сс. 359-368), перестановку ДНК (Patten и др., Curr. Opin. Biotechnol., 8, 1997, сс. 724-733), фаговый дисплей (Thompson и др., J. Mol. Biol., 256, 1996, сс.77-88) и ПЦР, предназначенную для получения гибридных молекул ДНК (Cramer и др., Nature, 391, 1998, сс. 288-291). У Vaughan и др. (выше) обсуждены указанные методы созревания аффинности.

Настоящее изобретение относится также к выделенной последовательности ДНК, кодирующей альбуминсвязывающее антитело или слитый белок, предлагаемый в настоящем изобретении. Последовательности ДНК, предлагаемые в настоящем изобретении, могут содержать синтетическую ДНК, например, полученную с помощью химического процесса, кДНК, геномную ДНК или любую их комбинацию.

Последовательности ДНК, которые кодируют предлагаемые в изобретении слитые белки, представляющие собой антитела с двойной специфичностью, можно получать с помощью методов, известных специалистам в данной области. Например, последовательности ДНК, кодирующие часть или все фрагменты антитела, линкеры и/или dAb, можно синтезировать при необходимости из определенных последовательностей ДНК или на основе соответствующих аминокислотных последовательностей.

Для получения последовательностей ДНК, кодирующих предлагаемый в настоящем изобретении слитый белок, представляющий собой антитело с двойной специфичностью, можно применять стандартные методы молекулярной биологии. Требуемые последовательности ДНК можно синтезировать полностью или частично с использованием методов синтеза олигонуклеотидов. При необходимости можно применять сайтнаправленный мутагенез и полимеразную цепную реакцию (ПЦР).

Настоящее изобретение относится также к клонирующему или экспрессионному вектору, содержащему одну или несколько последовательностей ДНК, предлагаемых в настоящем изобретении. Таким образом, изобретение относится к клонирующему или экспрессионному вектору, содержащему одну или несколько последовательностей ДНК, которая(ые) кодирует(ют) предлагаемый в настоящем изобретении слитый белок, представляющий собой антитело с двойной специфичностью. В одном из

предпочтительных вариантов осуществления изобретения клонирующий или экспрессионный вектор содержит одну последовательность ДНК, кодирующую полный слитый белок, представляющий собой антитело с двойной специфичностью. Таким образом, клонирующий или экспрессионный вектор
5 содержит кодирующие транскрипционные единицы ДНК, в такой последовательности, чтобы в результате трансляции продуцировался слитый белок.

Фактически, как должно быть очевидно специалистам в данной области, слитый белок, предлагаемый в изобретении, может иметь альбуминсвязывающий
10 переменный домен на N-конце или на C-конце и поэтому кодирующая альбуминсвязывающий домен транскрипционная единица ДНК может быть первой или последней соответственно в последовательности ДНК, кодирующей трансляционное слияние. Таким образом, трансляционное слияние может содержать N-концевой переменный домен и C-концевой Fab или Fab'. Кроме
15 того, трансляционное слияние может содержать N-концевой Fab или Fab' и C-концевой альбуминсвязывающий переменный домен.

Как должно быть очевидно, тяжелую цепь антитела или легкую цепь антитела или его фрагмента можно включать в один и тот же вектор или в
20 разные векторы. Согласно одному из вариантов осуществления изобретения один вектор может нести трансляционное слияние, содержащее тяжелую цепь, а другой вектор может нести трансляционное слияние, содержащее легкую цепь.

ДНК-код фрагмента антитела, входящего в трансляционное слияние, предлагаемое в изобретении, можно включать в вектор в виде транскрипционной
25 единицы в конфигурации, известной специалисту в данной области, например транскрипционная единица может содержать код легкой цепи, за которой расположен код тяжелой цепи или наоборот (см., в частности, Humphreys и др., Protein Expression and Purification, 26, 2002, сс. 309-320).

Предпочтительно вектор, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит соответствующую лидерную последовательность, такую как лидерная
30 последовательность антитела. Такие лидерные последовательности хорошо известны в данной области.

Общие методы, с помощью которых можно конструировать векторы, методы трансфекции и методы культивирования хорошо известны специалистам

в данной области. В этой связи следует упомянуть в качестве ссылки «Current Protocols in Molecular Biology», под ред. F. M. Ausubel, изд-во Wiley Interscience, New York, 1999 и руководство Maniatis Manual, опубликованное изд-вом Cold Spring Harbor Publishing.

5 Изобретение относится также к клетке-хозяину, содержащей один или несколько клонирующих или экспрессионных векторов, которые содержат одну или несколько последовательностей ДНК, кодирующих предлагаемый в настоящем изобретении слитый белок, представляющий собой антитело с двойной специфичностью. Любую приемлемую систему клетка-хозяин/вектор
10 можно применять для экспрессии последовательностей ДНК, кодирующих слитый белок, представляющий собой антитело с двойной специфичностью. Можно применять бактериальные, например, *E. coli*, и другие микробные системы или можно применять также эукариотические системы, например, можно применять экспрессионные системы на основе клеток-хозяев
15 млекопитающих. Приемлемые клетки-хозяева из млекопитающих включают клетки NS0, CHO, миеломы или гибридомы. Таким образом, согласно одному из вариантов осуществления изобретения слитый белок, предлагаемый в настоящем изобретении, экспрессируют в *E. coli*. Согласно другому варианту осуществления изобретения слитый белок, предлагаемый в настоящем изобретении,
20 экспрессируют в клетках млекопитающих.

Настоящее изобретение относится также к способу получения альбуминсвязывающего антитела или слитого белка, заключающемуся в том, что культивируют клетку-хозяина, содержащую вектор, предлагаемый в настоящем изобретении, в условиях, пригодных для запуска экспрессии белка с
25 последовательности ДНК, которая кодирует указанное альбуминсвязывающее антитело. Изобретение относится также к способам выделения альбуминсвязывающего антитела.

После получения альбуминсвязывающего антитела, предлагаемое в настоящем изобретении, при необходимости можно очищать, используя любой приемлемый метод, известный в данной области. Например, можно применять (но, не ограничиваясь только ими) хроматографические методы, такие как
30 ионообменная хроматография, гель-фильтрация, хроматография на белке G или основанная на гидрофобном взаимодействии хроматография.

Размер антитела или представляющего собой антитело слитого белка можно подтверждать общепринятыми методами, известными в данной области, такими как гель-фильтрация и ДСН-ПААГ в невосстанавливающих условиях. Указанные методики можно применять, например, для подтверждения того, что белок не димеризован и/или не в нем не имеет место потеря участка. Если обнаружены димеры, а требуется гомогенный мономерный продукт, то мономерный представляющий собой антитело слитый белок можно очищать от димерных видов с помощью общепринятых хроматографических методик, описанных выше. Согласно настоящему изобретению применение усовершенствованных переменных областей, представленных в SEQ ID NO: 1-4, позволяет получать продукт с большим содержанием мономеров.

Антитела, конъюгаты и слитые белки, предлагаемые в изобретении, можно применять для лечения заболеваний или нарушений, таких как воспалительные заболевания и нарушение, иммунное заболевание и нарушение, фиброзные нарушения и различные виды рака.

Под понятие «воспалительное заболевание» или «нарушение» и «иммунное заболевание или нарушение» подпадают ревматоидный артрит, псориатический артрит, болезнь Стилла, болезнь Макла-Уэльса, псориаз, болезнь Крона, неспецифический язвенный колит, SLE (системная красная волчанка), астма, аллергический ринит, атопический дерматит, рассеянный склероз, васкулит, сахарный диабет типа I, трансплантация и болезнь «трансплантат против хозяина».

Под понятие «фиброзное нарушение» подпадают идиопатический легочный фиброз (IPF), системный склероз (или склеродерма), фиброз почки, диабетическая нефропатия, IgA-нефропатия, гипертензия, конечная стадия болезни почек, перитонеальный фиброз (постоянный амбулаторный перитонеальный диализ), цирроз печени, возрастная дегенерация желтого пятна (ARMD), ретинопатия, реактивный сердечный фиброз, рубцевание, келоиды, ожоги, кожные язвы, пластическая операция на сосудах, операция по коронарному шунтированию, артропластика и операция по удалению катаракты.

Под понятие «рак» подпадают злокачественные новообразования, возникающие из эпителия, присутствующие в коже или наиболее часто в выстилке органов тела, например в: молочной железе, яичнике, предстательной

железе, легком, почке, поджелудочной железе, желудке, мочевом пузыре или кишечнике. У рака имеется тенденция к проникновению в соседнюю ткань и распространению (метастазы) в отдаленные органы, например: в кость, печень, легкое или головной мозг.

5 Таким образом, следующим объектом изобретения является фармацевтическая композиция, которая содержит антитело, слияние или конъюгат антитела, предлагаемое/предлагаемый в изобретении, в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями, эксципиентами или разбавителями. Также предложено применение

10 представляющего собой антитело слитого белка, предлагаемого в изобретении, для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения заболевания или нарушения. Наиболее предпочтительно заболевание или нарушение представляет собой воспалительное заболевание или нарушение.

15 Фармацевтические композиции, предлагаемые в изобретении, могут иметь форму, пригодную для орального, трансбуккального, парентерального, подкожного, назального, местного, офтальмического или ректального введения, или форму, пригодную для введения путем ингаляции или инфузии.

При необходимости, например, если однодоменное антитело или антитела представляющего собой антитело слитого белка связывается(ются) с

20 альбумином, то может требоваться предварительно приготавливать слитый белок с двойной специфичностью в сочетании с человеческим или рекомбинантным сывороточным альбумином с помощью пригодного метода, известного в данной области.

25 Если фармацевтическая препаративная форма является жидкой, например, представляет собой раствор или суспензию, то препаративная форма может содержать также альбумин, например, человеческий сывороточный альбумин, в частности, рекомбинантный альбумин, такой как рекомбинантный человеческий сывороточный альбумин. Приемлемые количества могут составлять менее 2 мас.% в пересчете на всю препаративную форму, в частности, менее 1, 0,5 или

30 0,1 мас.%. Это может способствовать стабилизации представляющего собой антитело компонента в препаративной форме. Фармацевтическая композиция может быть лиофилизирована для последующего восстановления с помощью водного растворителя.

Одним из вариантов осуществления изобретения является содержащий стандартную дозу контейнер, такой как пузырек, содержащий лиофилизированное «антитело», предлагаемое в изобретении.

Предназначенные для орального введения фармацевтические композиции могут иметь форму, например, таблеток, лепешек или капсул, приготовленных с помощью общепринятых методов в сочетании с фармацевтически приемлемыми эксципиентами, такими как связующие вещества (например, предварительно желатинизированный кукурузный крахмал, поливинилпирролидон или гидроксипропилметилцеллюлоза); наполнители (например, лактоза, микрокристаллическая целлюлоза или вторичный кислый фосфат кальция); замасливатели (например, стеарат магния, тальк или кремнезем); разрыхлители (например, картофельный крахмал или гликолят натрия); или смачивающие агенты (например, натрийлаурилсульфат). На таблетки можно наносить покрытие с помощью методов, хорошо известных в данной области. Жидкие препараты, предлагаемые для орального введения, могут иметь форму, например, растворов, сиропов или суспензий, или они могут присутствовать в виде сухого продукта, предназначенного для восстановления водой или другим приемлемым ранее указанным наполнителем. Указанные жидкие препараты можно получать общепринятыми путями с использованием фармацевтически приемлемых добавок, таких как суспендирующие агенты, эмульгаторы, неводные наполнители или консерванты. Препараты могут также при необходимости содержать забуферивающие соли, корригенты, красители или подслащивающие вещества.

Препараты для орального введения можно приготавливать в форме с контролируемым высвобождением действующего вещества.

Предназначенные для трансбуккального введения композиции могут иметь форму таблеток или лепешек, приготовленных общепринятым образом.

Антитела, слияние и/или конъюгаты, предлагаемые в изобретении, можно приготавливать для парентерального введения путем инъекции, например, болюсной инъекции или инфузии. Предназначенные для инъекции препаративные формы могут присутствовать в виде стандартной дозы лекарственного средства, например, в стеклянных ампулах или мультидозовых контейнерах, например, стеклянных пузырьках. Предназначенные для инъекции

композиции могут иметь такие формы, как суспензии, растворы или эмульсии в маслянистых или водных наполнителях, и могут содержать предназначенные для приготовления препаративной формы агенты, такие как суспендирующие, стабилизирующие агенты, консерванты и/или диспергирующие агенты.

5 Альтернативно этому, действующее вещество может находиться в порошкообразной форме, предназначенной для восстановления перед применением с помощью приемлемого наполнителя, например, стерильной свободной от пирогенов воды.

10 Помимо описанных выше препаративных форм антитела, предлагаемые в изобретении, можно приготавливать в форме препаратов в виде депо. Указанные препаративного формы длительного действия можно вводить путем имплантации или путем внутримышечной инъекции.

15 Для назального введения или введения путем ингаляции соединения, предлагаемые в настоящем изобретении, может оказаться удобным вводить в форме аэрозольного спрея, входящего в находящиеся под давлением упаковки или распылитель, с использованием приемлемого пропеллента, например, дихлордифторметана, фтортрихлорметана, дихлортetraфторэтана, диоксида углерода или другого пригодного газа или смеси газов.

20 При необходимости композиции могут присутствовать в упаковке или диспенсерном устройстве, которое может содержать одну или несколько стандартных доз лекарственного средства, включающих действующее вещество. Упаковка или диспенсерное устройство может быть снабжено инструкциями по применению.

25 Для местного применения соединения, предлагаемые в настоящем изобретении, может оказаться удобным приготавливать в форме приемлемой мази, содержащей действующее вещество, суспендированное или растворенное в одном или нескольких фармацевтически приемлемых носителях. Конкретными носителями являются, например, минеральное масло, жидкий вазелин, пропиленгликоль, полиоксиэтилен, полиоксипропилен, эмульгирующий воск и
30 вода. Альтернативно этому, соединения, предлагаемые в настоящем изобретении, можно приготавливать в форме приемлемого лосьона, который содержит действующее вещество, суспендированное или растворенное в одном или нескольких фармацевтически приемлемых носителях. Конкретными

носителями являются, например, минеральное масло, сорбитанмоностеарат, полисорбат 60, сложные цетиловые эфиры воска, цетеариловый спирт, бензиловый спирт, 2-октилдодеканол и вода.

5 Согласно одному из вариантов осуществления изобретения препаративная форма представляет собой препаративную форму для местного применения, включая ингаляцию.

10 Приемлемые предназначенные для ингаляции препараты включают порошки для ингаляций, аэрозоли с дозирующим устройством, содержащие газы-пропелленты, или растворы для ингаляций без газообразных пропеллентов. Предлагаемые в настоящем изобретении порошки для ингаляций, содержащие действующее вещество, могут состоять только из вышеуказанных действующих веществ или смеси вышеуказанных действующих веществ с физиологически приемлемым эксципиентом.

15 Указанные порошки для ингаляций могут включать моносахариды (например, глюкозу или арабинозу), дисахариды (например, лактозу, сахарозу, мальтозу), олиго- и полисахариды (например, декстраны), многоатомные спирты (например, сорбит, маннит, ксилит), соли (например, хлорид натрия, карбонат кальция) или их смеси друг с другом. Предпочтительно применяют моно- или дисахариды, в частности, лактозу или глюкозу можно применять (но, не ограничиваясь только указанным) в форме их гидратов.

20 Для отложения частиц в легких требуется, чтобы размер частиц составлял менее 10 мкм, в том числе 1-9 мкм, например, от 0,1 до 5 мкм, в частности от 1 до 5 мкм. Наиболее важным является размер частиц действующего вещества (такого как антигено или его фрагмент).

25 Газы-пропелленты, которые можно применять для приготовления предназначенных для ингаляции аэрозолей, хорошо известны в данной области. Приемлемые газы-пропелленты выбирают из углеводородов, таких как *n*-пропан, *n*-бутан или изобутан, и галогенуглеводородов, таких как хлорированные и/или фторированные производные метана, этана, пропана, бутана, циклопропана или циклобутана. Вышеуказанные газы-пропелленты можно применять

30 индивидуально или в виде их смесей.

Наиболее предпочтительными газами-пропеллентами являются галогенированные алкановые производные, выбранные из TG 11, TG 12, TG 134a

и TG227. Из вышеуказанных галогенированных углеводородов наиболее предпочтительными являются TG134a (1,1,1,2-тетрафторэтан) и TG227 (1,1,1,2,3,3,3-гептафторпропан), а также их смеси.

5 Предназначенные для ингаляции аэрозоли, содержащие газ-пропеллент, могут содержать также другие ингредиенты, такие как соразтворители, стабилизаторы, поверхностно-активные вещества (детергенты), антиоксиданты, замасливатели и агенты для регулирования значения pH. Все указанные ингредиенты известны в данной области.

10 Предлагаемые в изобретении аэрозоли, содержащие газ-пропеллент, которые предназначены для ингаляции, могут содержать действующее вещество в концентрации вплоть до 5 мас.%. Аэрозоли, предлагаемые в изобретении, содержат например, действующее вещество в концентрации от 0,002 до 5 мас.%, от 0,01 до 3 мас.%, от 0,015 до 2% мас.%, от 0,1 до 2 мас.%, от 0,5 до 2 мас.% или от 0,5 до 1 мас.%.

15 Альтернативно этому, для местного внесения в легкое можно применять также препаративную форму в виде жидкого раствора или суспензии, например, с использованием такого устройства, как распылитель, например, распылитель, соединенный с компрессором (например, распылитель Pari LC-Jet Plus(R), соединенный с компрессором Pari Master(R), изготовленный на фирме Pari
20 Respiratory Equipment, Inc., Ричмонд, шт. Вирджиния).

Различные форматы антителя, предлагаемого в изобретении, можно вводить в виде дисперсии в растворителе, например, в форме раствора или суспензии. Его можно суспендировать в соответствующем физиологическом растворе, например, соляном растворе или другом фармакологически
25 приемлемом растворителе или забуференном растворе. Забуференные растворы, известные в данной области, могут содержать динатрия эдетат в количестве от 0,05 до 0,15 мг, NaCl в количестве от 8,0 до 9,0 мг, полисорбат в количестве от 0,15 до 0,25 мг, безводную лимонную кислоту в количестве от 0,25 до 0,30 мг и цитрат натрия в количестве от 0,45 до 0,55 мг на 1 мл воды, при этом значение
30 pH составляет примерно от 4,0 до 5,0. Можно применять, например, суспензию лиофилизированного антителя.

Препаративные формы терапевтических суспензий или растворов могут содержать также один или несколько эксципиентов. Эксципиенты хорошо

известны в данной области и включают буферы (например, цитратный буфер, фосфатный буфер, ацетатный буфер и бикарбонатный буфер), аминокислоты, мочевины, спирты, аскорбиновую кислоту, фосфолипиды, белки (например, сывороточный альбумин), ЭДТК, хлорид натрия, липосомы, маннит, сорбит и глицерин. Растворы или суспензии можно капсулировать в липосомы или биоразлагаемые микросферы. Препаративную форму следует, как правило, получать в практически стерильной форме с использованием стерильных процессов изготовления.

Они могут включать получение и стерилизацию фильтрацией забуференного растворителя/раствора, применяемого в препаративной форме, асептическое суспендирование антитела в стерильном забуференном растворителе/растворе и диспергирование препаративной формы в стерильных емкостях с использованием методов, известных обычным специалистам в данной области.

Распыляемую препаративную форму, представленную в настоящем описании, можно приготавливать, например, в виде единичных стандартных доз (например, в запечатанных пластиковых контейнерах или флаконах), упакованных в оболочку из фольги. Каждый флакон содержит стандартную дозу в объеме, например, 2 мл, в растворителе/забуференном растворе.

Различные форматы антител, указанных в настоящем описании, можно вводить с помощью распыления.

Для офтальмического применения соединения, предлагаемые в настоящем изобретении, может оказаться удобным приготавливать в форме микронизированных суспензий в изотоническом с отрегулированным значением рН стерильном соляном растворе с добавлением консерванта, такого как бактерицидный или фунгицидный агент, например, нитрат фенилртути, бензалконийхлорид или ацетат хлоргексидина, или без консерванта. Альтернативно этому, для офтальмического применения соединения можно приготавливать в форме мази, такой как вазелин.

Для ректального применения соединения, предлагаемые в настоящем изобретении, может оказаться удобным приготавливать в форме суппозитория. Их можно приготавливать путем смешения действующего вещества с приемлемым не вызывающим раздражения эксципиентом, который является

твердым при комнатной температуре, но расплавляется в прямой кишке с высвобождением активного компонента. Указанные продукты включают, например, кокосовое масло, пчелиный воск и полиэтиленгликоли.

5 Количество соединения, предлагаемого в изобретении, которое требуется для профилактики или лечения конкретного состояния, должно варьироваться в зависимости от выбранного соединения и состояния пациента, подлежащего
лечению. Однако, как правило, суточные дозы могут варьировать от примерно 10 нг/кг до 1000 мг/кг, как правило, от 100 нг/кг до 100 мг/кг, например,
10 примерно от 0,01 до 40 мг/кг веса тела при оральном или трансбуккальном введении, примерно от 10 нг/кг до 50 мг/кг веса тела при парентеральном введении и от примерно 0,05 до примерно 1000 мг, например, от примерно 0,5 до примерно 1000 мг при назальном введении или введении путем ингаляции или инфузии.

15 Предпочтительные отличительные признаки каждого варианта осуществления изобретения являются такими же, как для каждого из других вариантов осуществления изобретения с соответствующими изменениями. Все публикации, включая (но, не ограничиваясь только ими) патенты и заявки на патент, процитированные в настоящем описании, включены в него в качестве
20 ссылки так, если бы каждая индивидуальная публикация полностью была специально и индивидуально включена в настоящее описание в качестве ссылки.

Следует иметь в виду, что в контексте настоящего описания под понятием «содержащий» подразумевается также «включающий».

Варианты осуществления изобретения можно объединять, если это технически возможно.

25 Указанные в настоящем описании варианты осуществления изобретения содержат определенные отличительные признаки/элементы. Описание распространяется также на отдельные варианты осуществления изобретения, которые состоят или в основном состоят из указанных отличительных признаков/элементов.

30 Ниже настоящее изобретение дополнительно описано с помощью примеров, которые даны только с целью иллюстрации и никоим образом не ограничивают объем настоящего изобретения.

Перечень чертежей:

На чертежах показано:

на фиг. 1А- схематичное изображение Fab-Fv;

на фиг. 1Б- схематичное изображение Fab-dsFv;

5 на фиг. 2-5 – последовательности, предлагаемые в настоящем изобретении;

на фиг. 6 – данные о связывании меченной с помощью AlexaFluor 488

конструкции Fab-dsFv A26 с активированными человеческими CD4⁺OX40⁺-Т-клетками;

10 на фиг. 7 – данные о титрах (в мкг/мл) конструкций антител, полученных при кратковременной экспрессии в НЕК293-клетках;

на фиг. 8 – результаты анализа с помощью ДСН-ПААГ стабилизированных дисульфидными мостиками Fab scFv;

на фиг. 9 – объединенные в таблицу данные об аффинности связывания с человеческим сывороточным альбумином различных конструкций;

15 на фиг. 10 - объединенные в таблицу данные об аффинности связывания с антигеном Fab различных конструкций;

на фиг. 11 – данные о титрах (в мкг/мл) конструкций антител, полученных при кратковременной экспрессии в СНО-клетках;

20 на фиг. 12 – результаты анализа с помощью ДСН-ПААГ различных конструкций;

на фиг. 13 – данные о термостабильности различных конструкций, экспрессируемых в СНО-клетках.

Манипуляции с ДНК и общие методы

25 Для трансформаций использовали компетентные штаммы *E. coli* и стандартные методы их культивирования. Ферменты, осуществляющие рестрикцию и модификацию ДНК, получали от фирм Roche Diagnostics Ltd. и New England Biolabs. Для получения препаратов плазмид использовали наборы для очистки плазмид Maxi Plasmid (фирма QIAGEN, каталожный № 12165).

30 Реакции секвенирования ДНК осуществляли с помощью набора для секвенирования с использованием терминирующих реакций ABI Prism Big Dye (каталожный № 4304149) и осуществляя процесс с помощью автоматического секвенатора (фирма Applied Biosystems). Данные анализировали с использованием программы Sequencher (фирма Genecodes). Олигонуклеотиды

получали от фирмы Sigma или Invitrogen. Гены, кодирующие исходные последовательности V-области, конструировали путем автоматического синтеза с помощью DNA2.0 и модифицировали для создания трансплантированных версий с помощью сайтнаправленного мутагенеза с использованием олигонуклеотидов. Концентрацию Fab-Fv определяли, используя метод ЖХВР на основе белка G.

Пример 1

Создание и анализ различных гуманизированных трансплантатов антитела 645 в A26Fab-645dsFv

10 Ранее были описан Fab-dsFv-формат антител (фиг. 1Б) и гуманизированное антитело к альбумину, обозначенное как «645gH1gL1» в WO 2010/035012. Ранее авторы настоящего изобретения описали также создание гуманизированного антагонистического антитела к OX40, обозначенного как «A26» в WO 2010/096418. Было описано создание нового улучшенного гуманизированного трансплантата антитела «645», обозначенного как 645dsgH5gL4, и создание молекулы антитела Fab-dsFv, включающей указанный трансплантат, встроенный в Fv-компонент, и переменные области «A26», встроенные в Fab-компонент.

15 Последовательности 645gH1 и gL1 представлены на фиг. 3 (а) и (б), SEQ ID NO: 9 и 10.

20 Конструирование плазмид A26Fab-645dsFv(gH1gL1) и A26Fab-645dsFv(gH5gL4)

Общую кодирующую область легкой цепи A26Fab-645dsFv(gL1) (SEQ ID NO: 12) клонировали в экспрессионном векторе млекопитающих фирмы UCB под контролем промотора HCMV-MIE и полиА-последовательности. Варибельную область легкой цепи 645dsFv(gL1) (SEQ ID NO: 10) мутировали с получением 645dsFv(gL4) (SEQ ID NO: 4) с использованием метода перекрывающей ПЦР. Общую кодирующую область тяжелой цепи A26Fab-645dsFv(gH1) (SEQ ID NO: 11) клонировали в экспрессионном векторе млекопитающих фирмы UCB под контролем промотора HCMV-MIE и полиА-последовательности. Варибельную область тяжелой цепи 645dsFv(gH1) (SEQ ID NO: 9) мутировали с получением 645dsFv(gH5) (SEQ ID NO: 2) с использованием метода перекрывающей ПЦР. Правильность конструкций подтверждали секвенированием.

Экспрессия в клетках млекопитающих A26Fab-645dsFv(gH1gL1) и A26Fab-645dsFv(gH5gL4)

Клетки линии НЕК293 трансфектировали несущими тяжелую и легкую цепи плазидами, используя реагент для трансфекции фирмы Invitrogen 293fectin, согласно инструкциям производителя. В целом, метод состоял в следующем: 25 мкг плазмиды тяжелой цепи и 25 мкг плазмиды легкой цепи инкубировали с 100 мкл 293fectin и 1700 мкл среды Optipro в течение 20 мин при КТ. Затем смесь добавляли к 50×10^6 НЕК293-клеток в 50 мл суспензии и инкубировали в течение 6 дней при встряхивании при 37°C. Через 6 дней супернатант собирали центрифугированием при $1500 \times g$ в течение 10 мин для удаления клеток и затем стерилизовали фильтрацией через фильтры с размером пор 0,22 мкм.

Очистка на белке G A26Fab-645dsFv(gH1gL1) и A26Fab-645dsFv(gH5gL4)

Примерно 50 мл супернатантов после фильтрации через фильтры с размером пор 0,22 мкм, концентрировали до объема ~2 мл, используя концентраторы типа Amicon Ultra-15 с мембранами, верхняя граница отсекающей молекулярной массы которых составляла 10 кДа, и центрифугировали при $4000 \times g$ в качающемся роторе. 1,8 мл концентрированного супернатанта вносили со скоростью 1 мл/мин на 1-миллилитровую колонку, заполненную сефарозой Gammabind Plus (фирма GE Healthcare), уравновешенную 20мМ фосфатом, 40мМ NaCl, pH 7,4. Колонку отмывали 20мМ фосфатом, 40мМ NaCl, pH 7,4 и связанный продукт элюировали 0,1М глицином/HCl, pH 2,7. Пиковую фракцию элюции собирали и доводили значение pH до ~7 с помощью 2М Трис/HCl, pH 8,5. Элюированную фракцию с отрегулированным значением pH концентрировали и подвергали диафильтрации в 20мМ фосфате, 150мМ NaCl, pH 7,4, используя концентраторы типа Amicon Ultra-15 с мембранами, верхняя граница отсекающей молекулярной массы которых составляла 10 кДа, и центрифугировали при $4000 \times g$ в качающемся роторе до получения конечного объема ~0,3 мл.

Анализ методом гель-фильтрации A26Fab-645dsFv(gH1gL1) и A26Fab-645dsFv(gH5gL4)

Очищенные на белке G образцы анализировали с помощью ЖХВР-гель-фильтрации. Образцы разделяли на колонке с Супердекс 200 10/300 GL Tricorn

(фирма GE Healthcare), используя изократический градиент ЗФР, pH 7,4 со скоростью 1 мл/мин. Обнаруженный пик находился при 280 нм и кажущуюся молекулярную массу относительно объема элюции рассчитывали путем сравнения со стандартной кривой для белков с известными молекулярными массами. Изменение гуманизированного трансплантата 645dsFv от gH1gL1 к gH5gL4 приводило к повышению процентного содержания мономеров экспрессированной конструкции A26Fab-645dsFv с 59% до 71%, т.е. увеличение на 12%, без какого-либо изменения термической стабильности dsFv (данные не представлены) или аффинности связывания dsFv с ЧСА (человеческий сывороточный альбумин (данные не представлены)).

Пример 2

2.1 BIAcore-анализ кинетики связывания A26 Fab-dsFv (645gH5gL4) с OX40

Применяемая в этом и во всех последующих примерах конструкция A26 Fab-dsFv 645gH5gL4 имела последовательность тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 7 (фиг. 2 (ж)) и последовательность легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 8 (фиг. 2(з)), т.е. тяжелая цепь включала линкер G4S, G4T, G4S, представленный в SEQ ID NO: 5, см. фиг. 2(д).

BIA (молекулярный анализ взаимодействия, разработанный фирмой BIAcore (Biomolecular Interaction Analysis)) осуществляли с помощью устройства BIAcore T200 (фирма GE Healthcare). Affinipure F(ab')₂-фрагмент козьего антитела к человеческому IgG, специфический в отношении F(ab')₂-фрагмента (фирма Jackson ImmunoResearch) иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 посредством аминного сочетания до достижения уровня захвата ≈5000 единиц ответа (RU). В качестве подвижного буфера применяли HBS-EP-буфер (10мМ HEPES, pH 7,4, 0,15М NaCl, 3мМ ЭДТК, 0,05% сурфактанта P20, фирма GE Healthcare) со скоростью потока 10 мкл/мин. Для захвата иммобилизованным антителом к человеческому IgG-F(ab')₂ инъецировали по 10 мкл A26 Fab' в концентрации 0,5 мкг/мл или A26Fab-dsFv в концентрации 1 мкг/мл. Человеческий OX40 титровали относительно захваченного A26 в различных концентрациях (от 25 до 1,5625нМ) со скоростью потока 30 мкл/мин. Поверхность регенерировали, используя инъекции 2 × 10 мкл 50мМ HCl с последующей инъекцией 5 мкл 5мМ NaOH со скоростью потока 10 мкл/мин. Кривые связывания после вычитания фона анализировали с помощью

программы T200evaluation (версия 1.0) согласно стандартным процедурам.

Кинетические параметры определяли, используя алгоритм аппроксимации.

Образец	Ka (1/Мс)	Kd (1/с)	KD (М)	KD (пМ)
Fab'	2,18 ± 0,38 E+05	1,00 E-05	4,68E-11	46,8
Fab-Fv	2,55 ± 0,35 E+05	1,04 E-05	4,12E-11	41,2

Среднее по 4 определениям

5 2.2. ВИАcore-анализ кинетики связывания A26 Fab-dsFv (645gH5gL4) с альбумином

ВИА (молекулярный анализ взаимодействия, разработанный фирмой ВИАcore) осуществляли с помощью устройства ВИАcore T200 (фирма GE Healthcare). Affinipure F(ab')₂-фрагмент козьего антитела к человеческому IgG, специфический в отношении F(ab')₂-фрагмента (фирма Jackson ImmunoResearch), иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 посредством аминного сочетания до достижения уровня захвата ≈5000 единиц ответа (RU). В качестве подвижного буфера применяли HBS-EP-буфер (10мМ HEPES, pH 7,4, 0,15М NaCl, 3мМ ЭДТК, 0,05% сурфактанта P20, фирма GE Healthcare) со скоростью потока 10 мкл/мин. Для захвата иммобилизованным антителом к человеческому IgG-F(ab')₂ инъецировали 10 мкл Fab-Fv в концентрации 0,75 мкг/мл. Человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), мышинный сывороточный альбумин (МСА) и сывороточный альбумин обезьян циномоглус (ЦСА) титровали относительно захваченного Fab-Fv в различных концентрациях (от 50 до 6,25нМ) со скоростью потока 30 мкл/мин. Поверхность регенерировали, используя инъекции 2 × 10 мкл 50мМ HCl с последующей инъекцией 5 мкл 5мМ NaOH со скоростью потока 10 мкл/мин. Кривые связывания после вычитания фона анализировали с помощью программы T200evaluation (версия 1.0) согласно стандартным процедурам. Кинетические параметры определяли, используя алгоритм аппроксимации.

Образец	Ka (1/Мс)	Kd (1/с)	KD (М)	KD (нМ)
ЧСА	5,84 E+04	1,63 E-04	2,93E-09	2,93
МСА	8,86 E+04	3,68 E-04	4,16E-09	4,16
ЦСА	7,1 E+04	1,89 E-04	2,66E-09	2,66

25

Среднее по 3 определениям

2.3 Демонстрация одновременного связывания A26 Fab-dsFv(645gH5gL4) с ОХ40 и альбумином

Оценивали одновременное связывание человеческого ОХ40 и человеческого сывороточного альбумина с A26 Fab-dsFv. Конструкцию A26 Fab-dsFv иммобилизовали на поверхности сенсорного чипа согласно методу Biacore-анализа кинетики связывания A26 Fab-dsFv с альбумином. 50нМ ЧСА, 25нМ ОХ40 или содержащий смесь раствор с конечной концентрацией ЧСА 50нМ и ОХ40 25нМ титровали по отдельности относительно захваченной конструкции A26 Fab-dsFv. Результат связывания при использовании раствора, содержащего комбинацию ЧСА/ОХ40, оказался эквивалентным сумме результатов, полученных при независимых инъекциях. Это подтверждает, что Fab-dsFv обладает способностью одновременно связываться как с человеческим ОХ40, так и с ЧСА.

Образец	Аналит	Связывание (RU)	
A26 Fab-Fv	hOX40	25	
	ЧСА	9	
	hOX40 + ЧСА	35	(34)

2.4 Проведенный на клетках анализ аффинности A26 Fab-dsFv (645gH5gL4)

Методы:

Связывание A26 Fab-Fv с человеческими активированными CD4⁺OX40⁺-Т-клетками

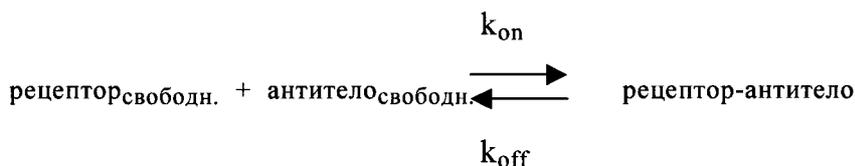
РВМС выделяли путем разделения в градиенте фикола и активировали с помощью 4 мкг/мл ФГА-L в течение 3 дней при 37°C, 5% CO₂, 100% относительной влажности. CD4⁺-Т-клетки выделяли методом негативной селекции, используя магнитные гранулы (набор II для выделения CD4⁺-Т-клеток человека; фирма Miltenyi Biotec). Приблизительно 1×10^5 клеток инкубировали в присутствии антитела либо в Facs-буфере (ЗФР/0,2% БСА/0,09% NaN₃), либо в Facs-буфере, дополненном 5% ЧСА, при 4°C. Конечная концентрация антитела составляла от 48 до 0,0005нМ. Клетки отмывали в ЗФР перед анализом на основе проточной цитометрии, которую осуществляли с помощью устройства FACScalibur (фирма Becton Dickinson). Два набора данных по титрованию получали с использованием обеих буферных сред, для одного применяли A26 Fab-dsFv, а для другого - служащее в качестве несоответствующего контроля

Fab-Fv для определения неспецифического связывания. Количество связанного антитела (в молях) рассчитывали, используя интерполированные величины, полученные с помощью стандартной кривой, которую создавали с применением гранул, содержащих различные, но известные количества флуоресцентного красителя. Геометрические средние величины флуоресценции определяли в проведенных методом проточной цитометрии анализах клеток и гранул. Величину неспецифического связывания вычитали из величин, полученных с использованием A26 Fab-dsFv, и таким образом получали кривую, описывающую специфическое связывание, анализируя нелинейную регрессию с использованием уравнения односайтового связывания (Graphpad Prism®) для определения K_D .

Для определения аффинности A26 Fab-dsFv к экспрессируемому на клеточной поверхности антигену осуществляли эксперименты по связыванию в условиях насыщения с использованием активированных $CD4^+OX40^+$ -Т-клеток и меченной с помощью Alexa Fluor 488 конструкции A26 Fab-dsFv.

Специфическое связывание антитела с рецептором в условиях равновесия при использовании диапазона концентраций антитела применяли для определения K_D , считая, что лишь очень незначительная фракция антитела связывалась с рецептором в любой точке на кривой связывания.

Для описания равновесного связывания применяли следующее уравнение:



Скорость реакции ассоциации антитела с рецептором = $k_{\text{on}} \times$
[рецептора_{свободн.}] × [антитело_{свободн.}]

Скорость реакции диссоциации комплекса рецептор-антитело = k_{off}
× [рецептор-антитело]

Равновесие, скорости реакции ассоциации и диссоциации являются одинаковыми, и можно выводить уравнение, описывающее изотерму связывания; на полулогарифмической кривой связывание является сигмовидным. Величину K_D определяют как $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$, и ее можно рассчитывать из

кривой связывания в виде концентрации, при которой имеет место связывание, составляющее половину от максимального.

Связывание меченой с помощью AlexaFluor488 конструкции A26 Fab-Fv с активированными человеческими CD4⁺OX40⁺-Т-клетками измеряли с помощью
5 проточной цитометрии с использованием диапазона концентраций, охватывающего 5-log-единиц.

Репрезентативная кривая связывания для A26 Fab-Fv представлена на фиг. 4.

Средняя величина K_D, полученная с использованием активированных
10 клеток, взятых от 5 различных доноров составляла 145пМ.

Пример 3

Экспрессия 645gL4gH5 в виде scFv

Конструирование плазмид

scFv экспрессировали из одной из двух близкородственных
15 модифицированных экспрессионных плазмид млекопитающих фирмы UCB; pVKΔPvuII применяли для клонирования и экспрессии scFv в HL-ориентации, а pKHΔEcoRV применяли для клонирования и экспрессии scFv в LH-ориентации. Все scFv создавали так, чтобы они содержали состоящий из 20 аминокислот линкерный пептид, т.е. (GGGGS)₄ (SEQ ID NO: 17), и С-концевую метку 10×His.
20 Акцепторные плазмиды scFv 362HL и 240LH кодировали уникальные сайты рестрикции с пограничными последовательностями FW1-FW4 vH (PvuII и XhoI) и vL (EcoRV и BsiWI), что позволяло осуществлять последующее клонирование с применением рестриктаз переменных областей scFv с использованием двух стадий лигирования. Гены, кодирующие 645gH5 vH и 645gL4 vL, синтезировали
25 с помощью DNA2.0 с неоднозначными («качающимися») остатками цистеина в положениях vH44 и vL100 согласно нумерации Кэбота для создания стабилизированного дисульфидными мостиками (ds) scFv. Указанные гены V-областей клонировали в акцепторных плаزمидках scFv, используя PvuII и XhoI (vH) или EcoRV и BsiWI (vL), и для подтверждения успешного лигирования
30 применяли секвенирование ДНК.

Экспрессия и очистка

Клетки линии HEK293F (культуры объемом 50 мл, 10⁶ клеток\мл) трансфектировали 50 мкг плазмидной ДНК и культивировали при 37°C в среде

FreeStyle™. Супернатанты собирали через 6 дней после трансфекции и scFv очищали путем серий очистки на Ni²⁺-НТА. Очищенный белок концентрировали и осуществляли замену буфера на ЗФР для последующей биофизической характеристики.

5 Анализ термостабильности

ThermoFluor-анализ осуществляли для оценки термостабильности очищенных молекул. Очищенные белки (0,1 мг/мл) смешивали с оранжевым красителем SYPRO® (фирма Invitrogen) и смесь вносили в четырех повторностях в 384-луночный планшет для ПЦР с оптическим дном. Образцы анализируют с помощью системы для быстрой ПЦР в реальном времени 7900HT (фирма Agilent Technologies) в диапазоне температур от 20 до 99°C при скорости повышения температуры 1,1°C/мин. Строили график зависимости изменения интенсивности флуоресценции в каждой лунке от температуры и величины T_m определяли по точкам излома.

15 ЖХВР-гель-фильтрация

Очищенные белки (10 и 50 мг) анализировали с помощью ЖХВР-гель-фильтрации на колонке Супердекс 200 10/300 GL Tricorn (фирма GE Healthcare). Изократический градиент ЗФР, рН 7,4 применяли со скоростью потока 1 мл/мин с УФ-детекцией при 214 и 280 нм.

20 Обобщение результатов

Для конструкции 645gH5gL4 HLds содержание мономеров составляло 97% и величина T_m (в °C) составляла 75,6.

Для конструкции 645gH5gL4 HL содержание мономеров составляло 86% и величина T_m (в °C) составляла 75,6.

25 Пример 4

Конструирование слияний FabA-dsscFv

Плазмиды для экспрессии в клетках млекопитающих

Одноцепочечный Fv (scFv) конструировали путем сцепления переменных доменов легких и тяжелых цепей антитела к человеческому сывороточному альбумину (SEQ ID NO: 1 и 3 или 2 и 4) через гибкий линкер (SEQ ID NO: 17) в HL-ориентации. Интродуцировали точечные мутации в последовательности ДНК в отобранных остатках в каркасном участке, как тяжелой цепи, так и легкой цепи Fv. Мутации интродуцировали для создания межцепочечного

дисульфидного мостика между тяжелыми и легкими цепями Fv, при этом замена G44C в тяжелой цепи и замена G100C в легкой цепи позволяли получать связанный дисульфидным мостиком scFv (dsscFv). Слитые белки FabA-dsscFv конструировали путем слияния dsscFv с С-концом константной области либо легкой цепи (с Km3-аллотипом константной области каппа-цепи), либо тяжелой цепи FabA (человеческий константный участок CH1 гамма-1, γ 1-изотип). Гибкий линкер (SEQ ID NO: 18 и 5) применяли для сцепления scFv с С-каппа-участком (SEQ ID NO: 19) или CH1-участком (SEQ ID NO: 20) соответственно. FabA-dsscFv (CL-dsscFv), FabA-dsscFv (CH1-dsscFv), легкую цепь FabA и тяжелую цепь FabA получали химическим путем и затем клонировали в экспрессионных векторах млекопитающих под контролем промотора HCMV-MIE и полиА-последовательности SV40E.

Различные результаты, полученные для этих конструкций, представлены на фиг. 7-13. Опыты по оценке термостабильности этих конструкций позволили установить, что величина Tm для каждой из них составляла примерно 82°C.

Следует иметь в виду, что в контексте настоящего описания понятие «содержащий» обозначает также «включающий».

Варианты осуществления изобретения можно объединять, если это технически возможно.

Указанные в настоящем описании варианты осуществления изобретения содержат определенные отличительные признаки/элементы. Описание распространяется также на отдельные варианты осуществления изобретения, которые состоят или практически состоят из указанных отличительных признаков/элементов.

Должно быть очевидно, что приведенные примеры даны только с целью лучшего понимания настоящего изобретения и не направлены на его ограничение, и что под объем приведенной ниже формулы изобретения подпадают модификации деталей. Предпочтительные признаки каждого варианта осуществления изобретения распространяются на каждый из других вариантов осуществления изобретения с учетом соответствующих изменений. Все публикации, включая (но, не ограничиваясь только ими) патенты и заявки на патент, процитированные в настоящем описании, включены в него в качестве ссылки в той степени, как если бы было указано, что каждая индивидуальная

публикация или заявка на патент была специально и индивидуально полностью включена в качестве ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

- <110> ЮСБ Фарма С.А.
- 5 <120> Альбуминсвязывающие антитела и их связывающие фрагменты
- <130> G0161-W001
- <150> US61/558,599
- 10 <151> 2011-11-11
- <160> 71
- <170> PatentIn, версия 3.5
- 15 <210> 1
- <211> 121
- <212> PRT
- <213> Искусственная
- 20 <220>
- <223> Вариабельный домен тяжелой цепи антитела к альбумину (без ds)
- <400> 1
- 25
- Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
- 30 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr
20 25 30
- 35 Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
- 40 Gly Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
50 55 60
- Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80
- 45 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
- 50 Arg Thr Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

5

<210> 2
<211> 121
<212> PRT
<213> Искусственная

10

<220>
<223> Вариабельный домен тяжелой цепи антитела к альбумину (ds)

<400> 2

15

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

20

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr
20 25 30

25

Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile
35 40 45

30

Gly Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
50 55 60

35

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

40

Arg Thr Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
100 105 110

45

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

50

<210> 3
<211> 112
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>

<223> Вариабельный домен легкой цепи антитела к альбумину (без ds)

<400> 3

5

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

10

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn
20 25 30

15

Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

20

Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

25

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile
85 90 95

30

Ser Asp Thr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110

<210> 4

35

<211> 112

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

40

<223> Вариабельный домен легкой цепи антитела к альбумину (ds)

<400> 4

45

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

50

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn
20 25 30

Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu

35

40

45

5 Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

10 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

15 Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile
85 90 95

Ser Asp Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110

20 <210> 5
<211> 16
<212> PRT
<213> Искусственная

25 <220>
<223> Линкер 1

<400> 5

30 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

35 <210> 6
<211> 15
<212> PRT
<213> Искусственная

40 <220>
<223> Линкер 2

<400> 6

45 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

50 <210> 7
<211> 357
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>

<223> Тяжелая цепь Fab A26- (G4S, G4T, G4S) -645dsFv (gH5)

<400> 7

5

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

10

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

15

Gly Ile His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

20

Ala Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Pro Tyr
65 70 75 80

25

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

30

Ala Thr Gly Gly Glu Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

35

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

40

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

45

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

50

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

5

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Ser Gly Gly Gly
210 215 220

10

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
225 230 235 240

15

Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
245 250 255

20

Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn Trp
260 265 270

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Trp
275 280 285

25

Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr
290 295 300

30

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser
305 310 315 320

35

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Val Pro
325 330 335

40

Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu
340 345 350

Val Thr Val Ser Ser
355

45

<210> 8
<211> 341
<212> PRT
<213> Искусственная

50

<220>
<223> Легкая цепь Fab A26-(3xG4S)-645dsFv(gL4)

<400> 8

5 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

10 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Thr Gln Ser Ile Tyr Asn Ala
20 25 30

15 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

20 Tyr Asn Ala Asn Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ala
50 55 60

25 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ser Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

30 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Leu
85 90 95

35 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

40 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

45 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

50 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

55 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

60 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

65 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195

200

205

5 Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
210 215 220

10 Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val
225 230 235 240

15 Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro
245 250 255

20 Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
260 265 270

25 Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val
275 280 285

30 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
290 295 300

35 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly
305 310 315 320

40 Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val
325 330 335

45 Glu Ile Lys Arg Thr
340

40 <210> 9
<211> 119
<212> PRT
<213> Искусственная

45 <220>
<223> Вариабельный домен тяжелой цепи 645gH1
<400> 9

50 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr
20 25 30

5 Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile
35 40 45

10 Gly Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
50 55 60

15 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Thr Thr Val Tyr Leu Gln Met
65 70 75 80

20 Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr
85 90 95

25 Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly
100 105 110

30 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 10
<211> 110
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
35 <223> Вариабельный домен легкой цепи 645gL1

<400> 10

40 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

45 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn
20 25 30

50 Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys
50 55 60

5 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

10 Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile
85 90 95

15 Ser Asp Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

15 <210> 11
<211> 355
<212> PRT
<213> Искусственная

20 <220>
<223> Тяжелая цепь Fab A26-(3×G4S)-645dsFv(gH1)
<400> 11

25 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

30 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

35 Gly Ile His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

40 Ala Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

45 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Pro Tyr
65 70 75 80

50 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

50 Ala Thr Gly Gly Glu Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

5 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

10 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

15 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

20 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

25 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

30 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Ser Gly Gly Gly
210 215 220

35 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
225 230 235 240

40 Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
245 250 255

45 Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn Trp
260 265 270

50 Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Trp
275 280 285

55 Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr
290 295 300

60 Ile Ser Arg Asp Ser Thr Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
305 310 315 320

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Val Pro Gly Tyr
325 330 335

5 Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
340 345 350

10 Val Ser Ser
355

<210> 12
<211> 340
15 <212> PRT
<213> Искусственная

<220>
20 <223> Легкая цепь Fab A26-(3×G4S)-645dsFv(gL1)
<400> 12

25 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

30 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Thr Gln Ser Ile Tyr Asn Ala
20 25 30

35 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

40 Tyr Asn Ala Asn Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ala
50 55 60

45 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ser Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

50 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

55 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

5 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

10 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

15 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

20 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

25 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

30 Phe Asn Arg Gly Glu Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
210 215 220

35 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
225 230 235 240

40 Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser
245 250 255

45 Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
260 265 270

50 Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly
275 280 285

55 Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
290 295 300

60 Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly
305 310 315 320

65 Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys
325 330 335

Val Glu Ile Lys
340

5

<210> 13
<211> 789
<212> ДНК

10 <213> Искусственная

<220>
<223> 645 гH5gL4

15 <400> 13

gaggttcagc tgctggagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggagggag cctgctctc 60

tcttgtgcag taagcggcat cgacctgtcc aactacgcga ttaactgggt acgtcaggca 120

20 ccgggtaaag gtctggaatg gatcggcatc atctgggcct ctggtagcag cttctacgct 180

acttgggcca aaggtcgttt caccatctcc cgtgacaact ctaaaaacac cgtgtacctg 240

cagatgaact ctctgcgtgc ggaagacact gcggtttact attgcgcgcg taccgttccg 300

25 ggctattcta ctgcaccgta cttcgacctg tggggtcagg gtactctggt taccgtctcg 360

agtggagggtg gcggttcttg cggtgccggt tccggtggcg gtggatcggg aggtggcgg 420

30 tctgatatcc agatgacca gagtccaagc agtgtttccg ccagcgtagg cgatcgtgtg 480

actattacct gtcagtcctc tccgagcgtt tggccaact tctgagctg gtaccagcag 540

aaaccgggta aagccccgaa actgctgac tacgaggcgt ctaaactgac ctctgggtgta 600

35 ccgtcccgtt tctctggctc tggctctggt acggacttca ctctgacct ctctctctg 660

cagccggaag actttgcaac gtactactgc ggtggtggtt actcttccat ctctgacacc 720

40 acgttcgggtg gaggcacca agttgaaatc aaacgtacgc atcaccatca ccaccaccat 780

caccatcac 789

45 <210> 14
<211> 263
<212> PRT
<213> Искусственная

50 <220>
<223> 645 гH5gL4

<400> 14

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

5

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr
20 25 30

10

Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

15

Gly Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
50 55 60

20

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

25

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Thr Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
100 105 110

30

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

35

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln
130 135 140

40

Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
145 150 155 160

45

Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser
165 170 175

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu
180 185 190

50

Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
195 200 205

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
210 215 220

5

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr
225 230 235 240

10

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr His His His
245 250 255

15

His His His His His His His
260

<210> 15
20 <211> 789
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
25 <223> 645 gH5gL4ds

<400> 15
gaggttcagc tgctggagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggagggag cctgcgtctc 60

30 tcttgtgcag taagcggcat cgacctgtcc aactacgcga ttaactgggt acgtcaggca 120

ccgggtaaata gcctggaatg gatcggcatc atctgggcct ctggtagcac cttctacgct 180

acttgggcca aaggtcgttt caccatctcc cgtgacaact ctaaaaacac cgtgtacctg 240

35 cagatgaact ctctgcgtgc ggaagacact gcggtttact attgcgcgcg taccgttccg 300

ggctattcta ctgcaccgta cttcgacctg tggggtcagg gtactctggt taccgtctcg 360

40 agtggaggtg gcggttctgg cggtggcggt tccggtggcg gtggatcggg aggtggcggt 420

tctgatatcc agatgacca gagtccaagc agtgtttccg ccagcgtagg cgatcgtgtg 480

actattacct gtcagtcctc tccgagcgtt tgggtccaact tcctgagctg gtaccagcag 540

45 aaaccgggta aagccccgaa actgctgata tacgaggcgt ctaaactgac ctctgggtgta 600

ccgtcccgtt tctctggctc tggctctggt acggacttca ctctgacct ctcctctctg 660

50 cagccggaag actttgcaac gtactactgc ggtgggtggtt actcttccat ctctgacacc 720

acgttcgggtt gtggcaccaa agttgaaatc aaacgtacgc atcaccatca ccatcacat 780

cacatcac

789

5 <210> 16
<211> 263
<212> PRT
<213> Искусственная

10 <220>
<223> 645 gH5gL4ds

<400> 16

15 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

20 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr
20 25 30

25 Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile
35 40 45

30 Gly Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
50 55 60

35 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

40 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

45 Arg Thr Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
100 105 110

50 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln
130 135 140

55 Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
145 150 155 160

Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser
165 170 175

5

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu
180 185 190

10

Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
195 200 205

15

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
210 215 220

20

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr
225 230 235 240

25

Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr His His His
245 250 255

His His His His His His His
260

30

<210> 17
<211> 20
<212> PRT
<213> Искусственная

35

<220>
<223> Линкер

40

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

45

Gly Gly Gly Ser
20

50

<210> 18
<211> 16
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>

<223> Линкер

5 <400> 18

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

10

<210> 19

<211> 105

<212> PRT

<213> Искусственная

15

<220>

<223> сКаппа

<400> 19

20

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
1 5 10 15

25

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
20 25 30

30

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
35 40 45

35

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
50 55 60

40

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
65 70 75 80

45

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
85 90 95

50

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 20

<211> 103

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> CH1

5 <400> 20

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

10

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

15

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

20

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

25

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

30

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

35

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> Искусственная

40

<220>

<223> Линкер

<400> 21

45

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
1 5

50

<210> 22

<211> 6

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Линкер

5 <400> 22

Asp Lys Thr His Thr Ser

1 5

10

<210> 23

<211> 5

<212> PRT

<213> Искусственная

15

<220>

<223> Линкер

<400> 23

20

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

25

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> Искусственная

30

<220>

<223> Линкер

<400> 24

35

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

40

<210> 25

<211> 15

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

45

<223> Линкер

<400> 25

50

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 26
<211> 21
<212> PRT
<213> Искусственная

5

<220>
<223> Линкер

<400> 26

10

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

15

Gly Gly Gly Gly Ser
20

20

<210> 27
<211> 25
<212> PRT
<213> Искусственная

25

<220>
<223> Линкер

<400> 27

30

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

35

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25

40

<210> 28
<211> 11
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> Линкер

45

<400> 28

Ala Ala Ala Gly Ser Gly Gly Ala Ser Ala Ser
1 5 10

50

<210> 29
<211> 16

<212> PRT
<213> Искусственная

5 <220>
<223> Линкер

10 <220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях аминокислоту

15 <400> 29
Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Ala Ser
1 5 10 15

20 <210> 30
<211> 21
<212> PRT
<213> Искусственная

25 <220>
<223> Линкер

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях аминокислоту

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях аминокислоту

40 <400> 30
Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

45 Gly Ala Ser Ala Ser
20

50 <210> 31
<211> 26

<212> PRT
<213> Искусственная

5 <220>
<223> Линкер

<220>
10 <221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях аминокислоту

<220>
15 <221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях аминокислоту

<220>
20 <221> misc_feature
<222> (17)..(17)
<223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях аминокислоту

25 <400> 31

Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

30 Xaa Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Ala Ser
20 25

<210> 32
<211> 31
<212> PRT
<213> Искусственная

40 <220>
<223> Линкер

<220>
45 <221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях аминокислоту

50 <220>
<221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях аминокислоту

5 <220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях аминокислоту

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (22)..(22)

<223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях аминокислоту

15

<400> 32

20

Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Ala Ser
20 25 30

25

<210> 33

<211> 13

<212> PRT

30

<213> Искусственная

<220>

<223> Линкер

35

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> Хаа может обозначать любую встречающуюся в естественных условиях аминокислоту

40

<400> 33

45

Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Ser Gly Ala Ser Ala Ser
1 5 10

<210> 34

<211> 56

50

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Линкер

<400> 34

5

Pro Gly Gly Asn Arg Gly Thr Thr Thr Thr Arg Arg Pro Ala Thr Thr
1 5 10 15

10

Thr Gly Ser Ser Pro Gly Pro Thr Gln Ser His Tyr Pro Gly Gly Asn
20 25 30

15

Arg Gly Thr Thr Thr Thr Arg Arg Pro Ala Thr Thr Thr Gly Ser Ser
35 40 45

20

Pro Gly Pro Thr Gln Ser His Tyr
50 55

<210> 35

<211> 11

<212> PRT

25

<213> Искусственная

<220>

<223> Линкер

30

<400> 35

Ala Thr Thr Thr Gly Ser Ser Pro Gly Pro Thr
1 5 10

35

<210> 36

<211> 6

<212> PRT

<213> Искусственная

40

<220>

<223> Линкер

<400> 36

45

Ala Thr Thr Thr Gly Ser
1 5

50

<210> 37

<211> 21

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Линкер

5

<400> 37

Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile Asn Ser Pro Pro Ser Lys Glu
1 5 10 15

10

Ser His Lys Ser Pro
20

15

<210> 38

<211> 15

<212> PRT

<213> Искусственная

20

<220>

<223> Линкер

<400> 38

25

Gly Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
1 5 10 15

30

<210> 39

<211> 15

<212> PRT

<213> Искусственная

35

<220>

<223> Линкер

<400> 39

40

Gly Gly Gly Gly Ile Ala Pro Ser Met Val Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

45

<210> 40

<211> 15

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

50

<223> Линкер

<400> 40

Gly Gly Gly Gly Lys Val Glu Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

5

<210> 41
<211> 15
<212> PRT
<213> Искусственная

10

<220>
<223> Линкер

15

<400> 41

Gly Gly Gly Gly Ser Met Lys Ser His Asp Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

20

<210> 42
<211> 15
<212> PRT
<213> Искусственная

25

<220>
<223> Линкер

<400> 42

30

Gly Gly Gly Gly Asn Leu Ile Thr Ile Val Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

35

<210> 43
<211> 15
<212> PRT
<213> Искусственная

40

<220>
<223> Линкер

<400> 43

45

Gly Gly Gly Gly Val Val Pro Ser Leu Pro Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

50

<210> 44
<211> 12
<212> PRT
<213> Искусственная

<400> 47

5 Thr Pro Ser His Leu Ser His Ile Leu Pro Ser Phe Gly Leu Pro Thr
1 5 10 15

Phe Asn

10

<210> 48

<211> 18

<212> PRT

15 <213> Искусственная

<220>

<223> Линкер

20 <400> 48

Arg Pro Val Ser Pro Phe Thr Phe Pro Arg Leu Ser Asn Ser Trp Leu
1 5 10 15

25

Pro Ala

30 <210> 49

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

35 <220>

<223> Линкер

<400> 49

40 Ser Pro Ala Ala His Phe Pro Arg Ser Ile Pro Arg Pro Gly Pro Ile
1 5 10 15

Arg Thr

45

<210> 50

<211> 18

50 <212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Линкер

<400> 50

5

Ala Pro Gly Pro Ser Ala Pro Ser His Arg Ser Leu Pro Ser Arg Ala
1 5 10 15

10

Phe Gly

<210> 51

15

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

20

<223> Линкер

<400> 51

25

Pro Arg Asn Ser Ile His Phe Leu His Pro Leu Leu Val Ala Pro Leu
1 5 10 15

Gly Ala

30

<210> 52

<211> 18

<212> PRT

35

<213> Искусственная

<220>

<223> Линкер

40

<400> 52

Met Pro Ser Leu Ser Gly Val Leu Gln Val Arg Tyr Leu Ser Pro Pro
1 5 10 15

45

Asp Leu

50

<210> 53

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Линкер

5

<400> 53

Ser Pro Gln Tyr Pro Ser Pro Leu Thr Leu Thr Leu Pro Pro His Pro
1 5 10 15

10

Ser Leu

15

<210> 54

<211> 18

<212> PRT

<213> Искусственная

20

<220>

<223> Линкер

<400> 54

25

Asn Pro Ser Leu Asn Pro Pro Ser Tyr Leu His Arg Ala Pro Ser Arg
1 5 10 15

30

Ile Ser

<210> 55

35

<211> 17

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

40

<223> Линкер

<400> 55

Leu Pro Trp Arg Thr Ser Leu Leu Pro Ser Leu Pro Leu Arg Arg Arg
1 5 10 15

45

Pro

50

<210> 56

<211> 18
<212> PRT
<213> Искусственная

5 <220>
<223> Линкер

<400> 56

10 Pro Pro Leu Phe Ala Lys Gly Pro Val Gly Leu Leu Ser Arg Ser Phe
1 5 10 15

Pro Pro

15

<210> 57
<211> 18
20 <212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> Линкер

25

<400> 57

Val Pro Pro Ala Pro Val Val Ser Leu Arg Ser Ala His Ala Arg Pro
1 5 10 15

30

Pro Tyr

35

<210> 58
<211> 17
<212> PRT
<213> Искусственная

40

<220>
<223> Линкер

<400> 58

45

Leu Arg Pro Thr Pro Pro Arg Val Arg Ser Tyr Thr Cys Cys Pro Thr
1 5 10 15

50

Pro

<211> 4
<212> PRT
<213> Искусственная

5 <220>
<223> Линкер

<400> 62

10 Pro Pro Pro Pro
1

15 <210> 63
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная

20 <220>
<223> Линкер

<400> 63

25 Asp Lys Thr His Thr Cys Ala Ala
1 5

30 <210> 64
<211> 11
<212> PRT
<213> Искусственная

35 <220>
<223> Линкер

<400> 64

40 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10

45 <210> 65
<211> 18
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> Линкер

50 <400> 65

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys

1 5 10 15

Pro Ala

5

<210> 66

<211> 25

10 <212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Линкер

15

<400> 66

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys

1 5 10 15

20

Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

20 25

25

<210> 67

<211> 30

<212> PRT

<213> Искусственная

30

<220>

<223> Линкер

<400> 67

35

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Gly Lys Pro Thr Leu

1 5 10 15

40

Tyr Asn Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr

20 25 30

45

<210> 68

<211> 31

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Линкер

50

<400> 68

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Gly Lys Pro Thr His
1 5 10 15

5

Val Asn Val Ser Val Val Met Ala Glu Val Asp Gly Thr Cys Tyr
20 25 30

10

<210> 69
<211> 15
<212> PRT
<213> Искусственная

15

<220>
<223> Линкер

<400> 69

20

Asp Lys Thr His Thr Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

25

<210> 70
<211> 26
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>

30

<223> Линкер

<400> 70

35

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp
1 5 10 15

Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala
20 25

40

<210> 71
<211> 11
<212> PRT
<213> Искусственная

45

<220>
<223> Линкер

<400> 71

50

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Ser Cys Pro Ala
1 5 10

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Связывающее сывороточный альбумин антитело или его фрагмент,
содержащее/содержащий переменный домен тяжелой цепи, который имеет
5 последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2

2. Связывающее сывороточный альбумин антитело или его фрагмент,
содержащее/содержащий переменный домен легкой цепи, который имеет
10 последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4

3. Связывающее сывороточный альбумин антитело или его фрагмент,
содержащее/содержащий переменный домен тяжелой цепи, который имеет
последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, и переменный домен
15 легкой цепи, который имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:
3.

4. Связывающее сывороточный альбумин антитело или его фрагмент,
содержащее/содержащий переменный домен тяжелой цепи, который имеет
последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, и переменный домен
20 легкой цепи, который имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:
4.

5. Связывающее сывороточный альбумин антитело или его фрагмент по
одному из п.п. 1-4, где антитело или его фрагмент выбирают из группы,
состоящей из Fab, модифицированного Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, антитела из
25 единичных переменных доменов, scFv, двух-, трех- или четырехвалентных
антител, бис-scFv, димерных (диабоди), тримерных (триабоди), трибоди, DVD-Ig
и ViTE

6. Представляющий собой биспецифическое антитело слитый белок,
30 содержащий:

тяжелую цепь, которая содержит в направлении от N-конца первый
переменный домен тяжелой цепи (VH1), CH1-домен и второй переменный
домен тяжелой цепи (VH2),

легкую цепь, которая содержит в направлении от N-конца первый
вариабельный домен легкой цепи (VL1), CL-домен и второй вариабельный домен
легкой цепи (VL2),

5 в котором указанные тяжелые и легкие цепи расположены так, что VH1 и
VL1 образуют первый антигенсвязывающий сайт, а VH2 и VL2 образуют второй
антигенсвязывающий сайт,

где антиген, связывающийся со вторым антигенсвязывающим сайтом,
представляет собой человеческий сывороточный альбумин и второй
вариабельный домен тяжелой цепи (VH2) имеет последовательность,
10 представленную в SEQ ID NO:1, а второй вариабельный домен легкой цепи
(VL2) имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3,

и второй вариабельный домен тяжелой цепи (VH2) и второй вариабельный
домен легкой цепи (VL2) необязательно связаны дисульфидным мостиком.

15 7. Представляющий собой биспецифическое антитело слитый белок,
содержащий:

тяжелую цепь, которая содержит в направлении от N-конца первый
вариабельный домен тяжелой цепи (VH1), CH1-домен и второй вариабельный
домен тяжелой цепи (VH2),

20 легкую цепь, которая содержит в направлении от N-конца первый
вариабельный домен легкой цепи (VL1), CL-домен и второй вариабельный домен
легкой цепи (VL2),

25 в котором указанные тяжелые и легкие цепи расположены так, что VH1 и
VL1 образуют первый антигенсвязывающий сайт, а VH2 и VL2 образуют второй
антигенсвязывающий сайт,

где антиген, связывающийся со вторым антигенсвязывающим сайтом,
представляет собой человеческий сывороточный альбумин,

30 в котором второй вариабельный домен тяжелой цепи (VH2) имеет
последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, а второй вариабельный
домен легкой цепи (VL2) имеет последовательность, представленную в SEQ ID
NO: 4,

и второй вариабельный домен тяжелой цепи (VH2) и второй вариабельный
домен легкой цепи (VL2) необязательно связаны дисульфидным мостиком.

8. Полинуклеотид, кодирующий антитело или его фрагмент по одному из п.п. 1-7.

5 9. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 8.

10. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по п. 8 или вектор по п. 9.

10 11. Способ получения антитела или фрагмента по одному из п.п. 1-7, включающий экспрессию их из клетки-хозяина по п. 10.

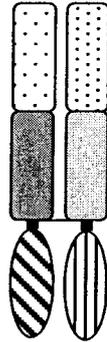
12. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или фрагмент по одному из п.п. 1-7.

15 13. Применение антитела или фрагмента по одному из п.п. 1-7 для приготовления лекарственного средства.

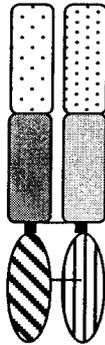
14. Антитело или фрагмент по одному из п.п. 1-7 для применения при лечении.

20 15. Способ лечения пациента, который нуждается в этом, включающий стадию введения терапевтически эффективного количества молекулы антитела, представляющей собой антитело или фрагмент по одному из п.п. 1-7.

ФИГ. 1А



ФИГ. 1Б



Первый переменный домен легкой цепи VL1



Первый переменный домен тяжелой цепи VH1



Константные области сКарра и CH1



Второй переменный домен легкой цепи VL2



Второй переменный домен тяжелой цепи VH2



Дисульфидный мостик



ФИГ. 2

(а) Вариабельный домен тяжелой цепи антитела к альбумину (без ds) (SEQ ID NO: 1)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGIIWASGTTFYATWAKGRFTISRDNKNTVYVYLMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLVTVSS

(б) Вариабельный домен тяжелой цепи антитела к альбумину (ds) (SEQ ID NO: 2)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGIIWASGTTFYATWAKGRFTISRDNKNTVYVYLMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLVTVSS

(в) Вариабельный домен легкой цепи антитела к альбумину (без ds) (SEQ ID NO: 3)

DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSQVPSRFRSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCGGGYSSISDTTFGGGKVEIKRT

(г) Вариабельный домен легкой цепи антитела к альбумину (ds) (SEQ ID NO: 4)

DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSQVPSRFRSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCGGGYSSISDTTFGGGKVEIKRT

(д) Линкер 1 (SEQ ID NO: 5)

SGGGSGGGGTGGGS

(е) Линкер 2 (SEQ ID NO: 6)

GGGSGGGSGGGGS

(ж) Тяжелая цепь Fab A26-(G4S,G4T,G4S)-645dsFv(gH5) (SEQ ID NO: 7)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASISPSGGLTYRDSVKGRFTISRDDAKNSPYLQMNLSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKQVPEPKSCSGGGSGGGGTGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGIIWASGTTFYATWAKGRFTISRDNKNTVYVYLMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLVTVSS

(з) Легкая цепь Fab A26-(3×G4S)-645dsFv(gL4) (SEQ ID NO: 8)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRATQSIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNANTLHTGVPSRFRSAGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQYDYPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSQVPSRFRSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCGGGYSSISDTTFGGGKVEIKRT

ФИГ. 3**Вариабельный домен тяжелой цепи 645gH1 (SEQ ID NO: 9)**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWICIIWASCTTFYATWAKGRFTI
SRDSTTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLVTVSS

Вариабельный домен легкой цепи 645gL1 (SEQ ID NO: 10)

DIVMTQSPSSVSASVGDRVTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFRKGS
GSDFTLTISLQPEDFATYYCGGGYSSISDITTFGCGTKVEIK

Тяжелая цепь Fab A26-(3×G4S)-645dsFv(gH1) (SEQ ID NO: 11)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASISPSGGLTYRDSVKGRFT
ISRDDAKNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKEPKKCSGGGGSGGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQA
PGKCLEWIGI I WASGTTFYATWAKGRFTISRSTTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLW
GQGLVTVSS

Легкая цепь Fab A26-(3×G4S)-645dsFv(gL1) (SEQ ID NO: 12)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRATQSIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNANTLHTGVPSRFRSASGSGT
DSTLTISLQPEDFATYYCQQYYDYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGECSSGGGGSGGGGGSDIVMTQSPSSVSASVGDRVTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPK
LLIYEASKLTSGVPSRFRKGS GSDFTLTISLQPEDFATYYCGGGYSSISDITTFGCGTKVEIK

ФИГ. 4**645 gH5gL4 (SEQ ID NO: 13)**

GAGGTTTCAGCTGCTGGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTCTTGTGCA
 GTAAGCGGCATCGACCTGTCCAACCTACGCGATTAAGTGGGTACGTCAGGCACCGGGTAAAGGTCTGGAA
 TGGATCGGCATCATCTGGGCCTCTGGTACGACCTTCTACGCTACTTGGGCCAAAGGTCGTTTCACCATC
 TCCCGTGACAACCTATAAAAACACCGTGTACCTGCAGATGAACTCTCTGCGTGCGGAAGACACTGCGGTT
 TACTATTGCGCGCGTACCGTTCCGGGCTATTCTACTGCACCGTACTTCGACCTGTGGGGTCAGGGTACT
 CTGGTTACCGTCTCGAGTGGAGGTGGCGGTTCTGGCGGTGGCGGTTCCGGTGGCGGTGGATCGGGAGGT
 GGCGGTTCTGATATCCAGATGACCCAGAGTCCAAGCAGTGTTCGCGCAGCGTAGGCGATCGTGTGACT
 ATTACCTGTCACTCCTCTCCGAGCGTTTGGTCCAACCTCCTGAGCTGGTACCAGCAGAAACCGGGTAAA
 GCCCCGAAACTGCTGATCTACGAGGCGTCTAAACTGACCTCTGGTGTACCGTCCCGTTTTCTCTGGCTCT
 GGCTCTGGTACGGACTTCACTCTGACCATCTCCTCTCTGCAGCCGGAAGACTTTGCAACGTACTACTGC
 GGTGGTGGTTACTCTTCCATCTCTGACACCACGTTCCGGTGGAGGCACCAAAGTTGAAATCAAACGTACG
 CATCACCATCACCATCACCATCACCATCAC

645 gH5gL4 (SEQ ID NO: 14)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGI IWASGTTFYATWAKGRFTI
 SRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG
 GGGDIQMTQSPSSVSASVGDRTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPKAPKLLIYEASKLTSVPSRFSGS
 GSGTDFTLTISLQPEDFATYYCGGYSISDITTFGGGKVEIKRTHHHHHHHHHH

645 gH5gL4ds (SEQ ID NO: 15)

GAGGTTTCAGCTGCTGGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTCTTGTGCA
 GTAAGCGGCATCGACCTGTCCAACCTACGCGATTAAGTGGGTACGTCAGGCACCGGGTAAATGCCTGGAA
 TGGATCGGCATCATCTGGGCCTCTGGTACGACCTTCTACGCTACTTGGGCCAAAGGTCGTTTCACCATC
 TCCCGTGACAACCTATAAAAACACCGTGTACCTGCAGATGAACTCTCTGCGTGCGGAAGACACTGCGGTT
 TACTATTGCGCGCGTACCGTTCCGGGCTATTCTACTGCACCGTACTTCGACCTGTGGGGTCAGGGTACT
 CTGGTTACCGTCTCGAGTGGAGGTGGCGGTTCTGGCGGTGGCGGTTCCGGTGGCGGTGGATCGGGAGGT
 GGCGGTTCTGATATCCAGATGACCCAGAGTCCAAGCAGTGTTCGCGCAGCGTAGGCGATCGTGTGACT
 ATTACCTGTCACTCCTCTCCGAGCGTTTGGTCCAACCTCCTGAGCTGGTACCAGCAGAAACCGGGTAAA
 GCCCCGAAACTGCTGATCTACGAGGCGTCTAAACTGACCTCTGGTGTACCGTCCCGTTTTCTCTGGCTCT
 GGCTCTGGTACGGACTTCACTCTGACCATCTCCTCTCTGCAGCCGGAAGACTTTGCAACGTACTACTGC
 GGTGGTGGTTACTCTTCCATCTCTGACACCACGTTCCGGTGTGGCACCACCAAAGTTGAAATCAAACGTACG
 CATCACCATCACCATCACCATCACCATCAC

645 gH5gL4ds (SEQ ID NO: 16)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGI IWASGTTFYATWAKGRFTI
 SRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG
 GGGDIQMTQSPSSVSASVGDRTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPKAPKLLIYEASKLTSVPSRFSGS
 GSGTDFTLTISLQPEDFATYYCGGYSISDITTFGCGTKVEIKRTHHHHHHHHHH

ФИГ. 5**Линкер (SEQ ID NO: 17)**

GGGGSGGGSGGGGSGGGG

Линкер (SEQ ID NO: 18)

SGGGSGGGSGGGG

сКappa (SEQ ID NO: 19)

VAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST
 LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

CH1 (SEQ ID NO: 20)

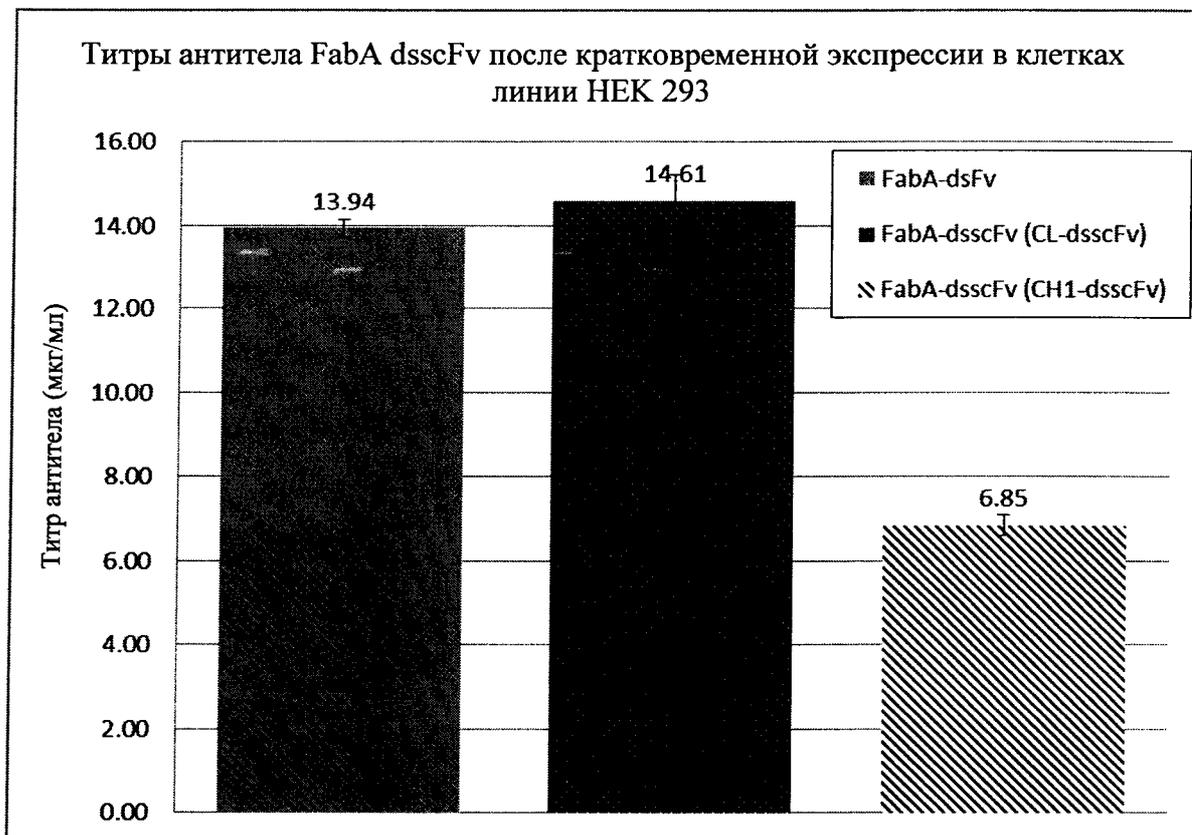
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV
 TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC

ФИГ. 6



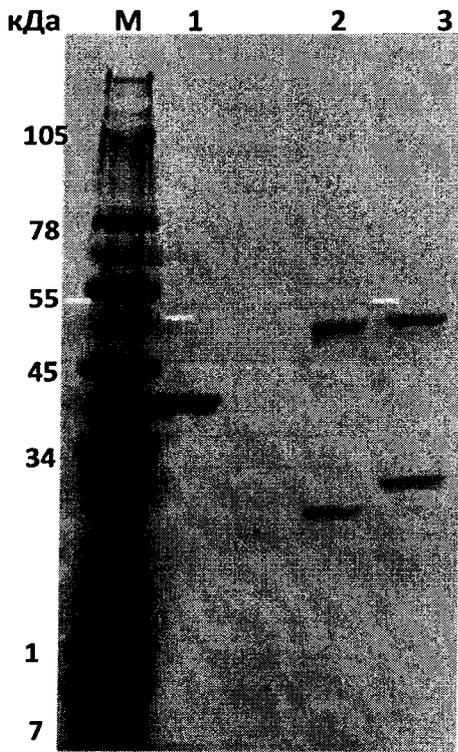
ФИГ. 7

Кратковременная экспрессия FabA-dsscFv A26-645gH5gL4 в клетках линии HEK293



ФИГ. 8

Результаты анализа методом ДСН-ПААГ очищенного FabA-dsscFv (НЕК293)



М стандартный маркер

1 FabA-dsFv

FabA-dsscFv

2 FabA-dsscFv (CL-dsscFv)

3 FabA-dsscFv (CH1-dsscFv)

Рассчитанная величина Mr кДа

FabA-dsFv

CL-vL 36,3

CH1-vH 37,3

FabA-dsscFv (CL-dsscFv)

CL-dssFv 50,5

HC 23,1

FabA-dsscFv (CH1-dsscFv)

CHI-dsscFv 50,2

LC 25,6

Фиг. 9

Аффинность к ЧСА и связывание антигена А (НЕК293)

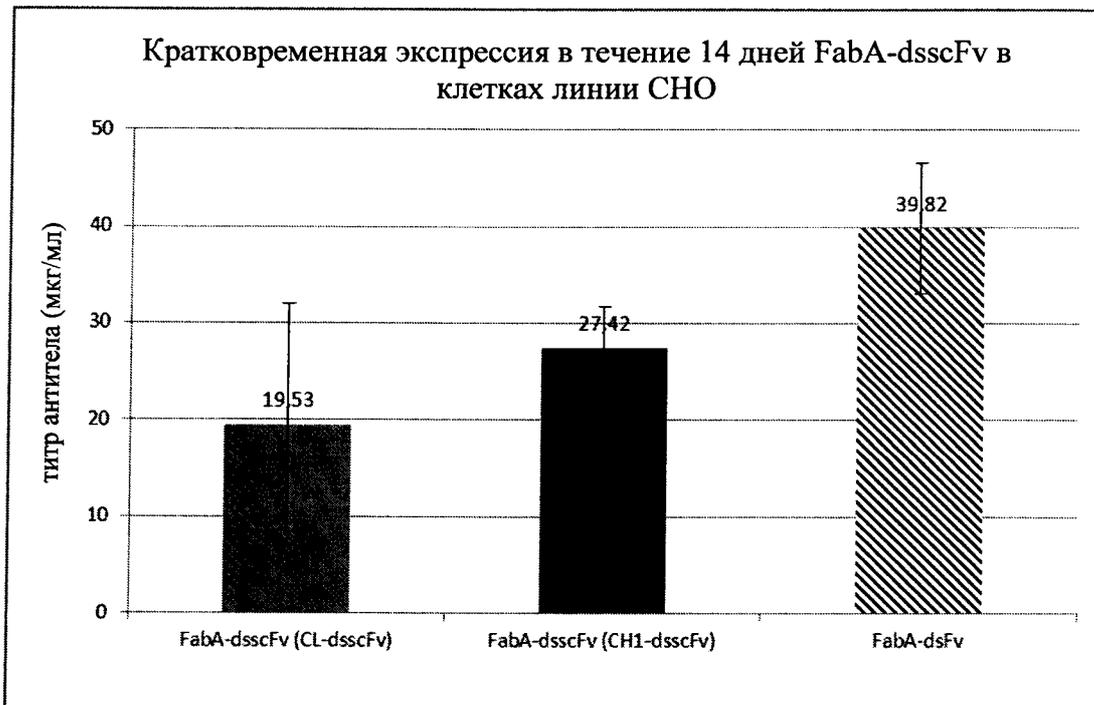
	Аналит		Применяемая концентрация	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (М)	KD (нМ)
FabA-dsscFv (CL-dsscFv)	ЧСА	титрование	50нМ, 25нМ, 12,5нМ, 6,25нМ	1,83E+05	2,40E-04	1,31E-09	1,31
		одна концентрация	50нМ	1,65E+05	2,11E-04	1,28E-09	1,28
FabA-dsscFv (CH1-dsscFv)	ЧСА	титрование	50нМ, 25нМ, 12,5нМ, 6,25нМ	1,72E+05	2,22E-04	1,29E-09	1,29
		одна концентрация	50нМ	1,60E+05	1,99E-04	1,25E-09	1,25
FabA-dsFv	ЧСА	титрование	50нМ, 25нМ, 12,5нМ, 6,25нМ	7,51E+04	1,51E-04	2,01E-09	2,01
		одна концентрация	50нМ	6,06E+04	1,19E-04	1,96E-09	1,96

Фиг. 10

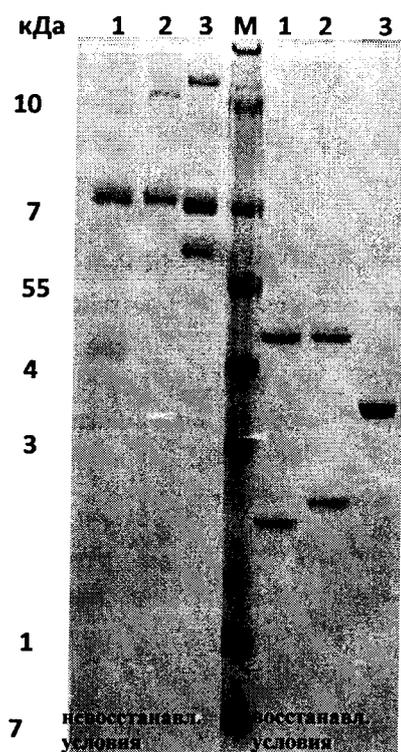
	Аналит		Концентрация	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (М)	KD (пМ)
FabA-dsscFv (CH1-dsscFv)	Антиген А	Одна конц.	25нМ	1,66E+05	2,34E-05	1,41E-10	141
FabA-dsscFv (CL-dsscFv)	Антиген А	Одна конц.	25нМ	1,78E+05	1,82E-05	1,02E-10	102
FabA-dsFv	Антиген А	Одна конц.	25нМ	1,70E+05	1,53E-05	9,00E-11	90

Фиг. 11

FabA-dsscFv (CHO)



Фиг. 12



- 1 FabA-dsscFv (CL-dsscFv)
 2 FabA-dsscFv (CH1-dsscFv)
 3 FabA-dsFv

Рассчитанная величина Mr кДа

FabA-dsscFv (CL-dsscFv)		
CL-dsscFv		50,5
HC		23,1
FabA-dsscFv (CH1-dsscFv)		
CH1-dsscFv		50,2
LC		25,6
FabA-dsFv		
CL-vL		36,3
CH1-vH		37,3

Фиг. 13

Термостабильность FabA-dsscFv (CHO)

	Tm 1	станд. откл. Tm 1	Tm 2	станд. откл. Tm 2	Tm 3	станд. откл. Tm 3
FabA-dsscFv (CL-dsscFv)	83,8	0,2	73,6	0,5	52,4	0,7
FabA-dsscFv (CH1-dsscFv)	84,6	0,3	75,5	0,5	57,8	0,6
FabA-dsFv	84	0,2	73,9	0,3	ND	ND