

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202290279 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.05.25

(22) Дата подачи заявки
2020.08.14

(51) Int. Cl. C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01)

(54) МАТЕРИАЛЫ И СПОСОБЫ ДЛЯ УЛУЧШЕННЫХ ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫХ
ВАРИАБЕЛЬНЫХ ФРАГМЕНТОВ

(31) 62/887,524; 62/887,514; 62/887,519;
62/887,529; 62/887,527; 62/946,877;
62/946,882; 62/946,865; 62/946,897;
62/946,886

(32) 2019.08.15; 2019.08.15; 2019.08.15;
2019.08.15; 2019.08.15; 2019.12.11;
2019.12.11; 2019.12.11; 2019.12.11;
2019.12.11

(33) US

(86) PCT/US2020/046303

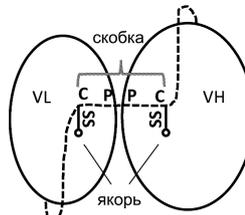
(87) WO 2021/030657 2021.02.18

(71) Заявитель:
ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Ло Цзиньцюань, Баучер Лорен,
Фельдкамп Майкл, Дим Майкл,
Армстронг Энтони А., Тепляков
Алексей, Хуан Чичи (US)

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

(57) Описаны материалы и способы для улучшенных одноцепочечных переменных фрагментов.



202290279 A1

202290279 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-572827EA/022

МАТЕРИАЛЫ И СПОСОБЫ ДЛЯ УЛУЧШЕННЫХ ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫХ ВАРИАБЕЛЬНЫХ ФРАГМЕНТОВ

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА СМЕЖНЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка испрашивает преимущество предварительной заявки на патент США № 62/946,897, поданной 11 декабря 2019 г., предварительной заявки на патент США № 62/946,886, поданной 11 декабря 2019 г., предварительной заявки на патент США № 62/946,882, поданной 11 декабря 2019 г., предварительной заявки на патент США № 62/946,877, поданной 11 декабря 2019 г., предварительной заявки на патент США № 62/946,865, поданной 11 декабря 2019 г., предварительной заявки на патент США № 62/887,529, поданной 15 августа 2019 г., предварительной заявки на патент США № 62/887,527, поданной 15 августа 2019 г., предварительной заявки на патент США № 62/887,524, поданной 15 августа 2019 г., предварительной заявки на патент США № 62/887,519, поданной 15 августа 2019 г., и предварительной заявки на патент США № 62/887,514, поданной 15 августа 2019 г., каждая из которых полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Данная заявка включает в себя путем ссылки перечень последовательностей, поданный с данной заявкой в виде текстового формата, озаглавленный «14620-227-228_SL.txt», созданный 5 августа 2020 г., имеющий размер 258 724 байта.

1. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Описаны материалы и способы для улучшенных одноцепочечных переменных фрагментов.

2. ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Антигенсвязывающие одноцепочечные переменные фрагменты (scFv) представляют собой модули, которые можно использовать в широком смысле в качестве терапевтических средств, агентов для визуализации, агентов для диагностики или в виде частей гетерологичных молекул, таких как мультиспецифические молекулы. Одной из проблем, связанных с scFv, является низкая стабильность и склонность к агрегированию (см. Worn and Pluckthun (2001) *J Mol Biol* 305: 989-1010; Rothlisberger *et al.*, (2005) *J Mol Biol* 347: 773-789; Gross *et al.*, (1989) *Transplant Proc* 21(1 Pt 1): 127-130, Porter *et al.*, (2011) *J Cancer* 2: 331-332; Porter *et al.*, (2011) *N Engl J Med* 365: 725-733). Следовательно, существует потребность в улучшенных конструкциях scFv, которые могут быть необязательно включены в мультиспецифические молекулы и гетерологичные молекулы.

3. СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] В одном аспекте в описании предложен выделенный одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), содержащий переменную область тяжелой цепи (VH), линкер (L) и переменную область легкой цепи (VL), причем scFv содержит:

первую дисульфидную связь между цистеином (Cys) VH на структурно

консервативной поверхности и первым Cys L;

вторую дисульфидную связь между Cys VL на структурно консервативной поверхности и вторым Cys L; или

первую дисульфидную связь между Cys VH на структурно консервативной поверхности и первым Cys L, и вторую дисульфидную связь между Cys VL на структурно консервативной поверхности и вторым Cys L.

[0006] В настоящем описании также предложен выделенный scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys VH в положении каркасного остатка на структурно консервативной поверхности VH, а L содержит первый Cys L;

VL содержит Cys VL в положении каркасного остатка на структурно консервативной поверхности VL, а L содержит второй Cys L; или

VH содержит Cys VH в положении каркасного остатка на структурно консервативной поверхности VH, VL содержит Cys VL в положении каркасного остатка на структурно консервативной поверхности VL, и L содержит первый Cys L и второй Cys L, причем Cys VH и первый Cys L способны образовывать дисульфидную связь, и Cys VL и второй Cys L способны образовывать дисульфидную связь.

[0007] В настоящем описании также предложен scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H105;

VL содержит Cys в L42;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0008] В настоящем описании также предложен scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H105;

VL содержит Cys в L45;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0009] В настоящем описании также предложен scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H105;

VL содержит Cys в L39;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0010] В настоящем описании также предложен scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H5;

VL содержит Cys в L42;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и

scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0011] В настоящем описании также предложен scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H5;

VL содержит Cys в L45;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0012] В настоящем описании также предложен scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H5;

VL содержит Cys в L39;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0013] В настоящем описании также предложен scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H3;

VL содержит Cys в L42;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0014] В настоящем описании также предложен scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H3;

VL содержит Cys в L45;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0015] В настоящем описании также предложен scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H3;

VL содержит Cys в L39;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0016] В настоящем описании также предложен scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H43;

VL содержит Cys в L100;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0017] В настоящем описании также предложен scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H43;

VL содержит Cys в L102;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0018] В настоящем описании также предложен scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H43;

VL содержит Cys в L5;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0019] В настоящем описании также предложен scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H43;

VL содержит Cys в L3;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0020] В настоящем описании также предложен scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H40;

VL содержит Cys в L100;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0021] В настоящем описании также предложен scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H40;

VL содержит Cys в L102;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0022] В настоящем описании также предложен scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H40;

VL содержит Cys в L5;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0023] В настоящем описании также предложен scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H40;

VL содержит Cys в L3;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0024] В настоящем описании также предложен scFv, содержащий VH, L и VL, в

котором

VH содержит Cys в H46;

VL содержит Cys в L100;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0025] В настоящем описании также предложен scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H46;

VL содержит Cys в L102;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0026] В настоящем описании также предложен scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H46;

VL содержит Cys в L5;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0027] В настоящем описании также предложен scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H46;

VL содержит Cys в L3;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0028] В настоящем описании также предложена фармацевтическая композиция, содержащая spFv в соответствии с настоящим описанием и фармацевтически приемлемый носитель.

[0029] В настоящем описании также предложен полинуклеотид, кодирующий spFv в соответствии с настоящим описанием.

[0030] В настоящем описании также предложен вектор, содержащий полинуклеотид в соответствии с настоящим описанием.

[0031] В настоящем описании также предложена клетка-хозяин, содержащая вектор в соответствии с настоящим описанием.

[0032] В настоящем описании также предложен способ формирования spFv в соответствии с настоящим описанием, включающий культивирование клетки-хозяина в соответствии с настоящим описанием в условиях формирования spFv и очистку spFv.

[0033] В настоящем описании также предложено антиидиотипическое антитело, которое связывается с spFv в соответствии с настоящим описанием.

[0034] В настоящем описании также предложен набор, содержащий spFv в соответствии с настоящим описанием.

[0035] В другом аспекте в изобретении предложена мультиспецифическая молекула,

содержащая одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий вариабельную область тяжелой цепи (VH), линкер (L) и вариабельную область легкой цепи (VL), причем scFv содержит:

первую дисульфидную связь между цистеином (Cys) VH на структурно консервативной поверхности и первым Cys L;

вторую дисульфидную связь между Cys VL на структурно консервативной поверхности и вторым Cys L; или

первую дисульфидную связь между Cys VH на структурно консервативной поверхности и первым Cys L, и вторую дисульфидную связь между Cys VL на структурно консервативной поверхности и вторым Cys L.

[0036] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys VH в положении каркасного остатка на структурно консервативной поверхности VH, а L содержит первый Cys L;

VL содержит Cys VL в положении каркасного остатка на структурно консервативной поверхности VL, а L содержит второй Cys L; или

VH содержит Cys VH в положении каркасного остатка на структурно консервативной поверхности VH, VL содержит Cys VL в положении каркасного остатка на структурно консервативной поверхности VL, и L содержит первый Cys L и второй Cys L, причем Cys VH и первый Cys L способны образовывать дисульфидную связь, и Cys VL и второй Cys L способны образовывать дисульфидную связь.

[0037] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H105;

VL содержит Cys в L42;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0038] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H105;

VL содержит Cys в L45;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0039] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H105;

VL содержит Cys в L39;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0040] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула,

содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H5;

VL содержит Cys в L42;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0041] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H5;

VL содержит Cys в L45;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0042] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H5;

VL содержит Cys в L39;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0043] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H3;

VL содержит Cys в L42;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0044] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H3;

VL содержит Cys в L45;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0045] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H3;

VL содержит Cys в L39;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0046] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H43;

VL содержит Cys в L100;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и

scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0047] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H43;

VL содержит Cys в L102;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0048] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H43;

VL содержит Cys в L5;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0049] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H43;

VL содержит Cys в L3;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0050] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H40;

VL содержит Cys в L100;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0051] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H40;

VL содержит Cys в L102;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0052] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H40;

VL содержит Cys в L5;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0053] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H40;

VL содержит Cys в L3;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0054] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H46;

VL содержит Cys в L100;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0055] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H46;

VL содержит Cys в L102;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0056] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H46;

VL содержит Cys в L5;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0057] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H46;

VL содержит Cys в L3;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0058] В настоящем описании также предложена фармацевтическая композиция, содержащая мультиспецифическую молекулу, предложенную в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

[0059] В еще одном аспекте в изобретении предложена гетерологичная молекула, содержащая одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), содержащий переменную область тяжелой цепи (VH), линкер (L) и переменную область легкой цепи (VL), причем scFv содержит:

первую дисульфидную связь между цистеином (Cys) VH на структурно консервативной поверхности и первым Cys L;

вторую дисульфидную связь между Cys VL на структурно консервативной поверхности и вторым Cys L; или

первую дисульфидную связь между Cys VH на структурно консервативной поверхности и первым Cys L, и вторую дисульфидную связь между Cys VL на структурно

консервативной поверхности и вторым Cys L.

[0060] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys VH в положении каркасного остатка на структурно консервативной поверхности VH, а L содержит первый Cys L;

VL содержит Cys VL в положении каркасного остатка на структурно консервативной поверхности VL, а L содержит второй Cys L; или

VH содержит Cys VH в положении каркасного остатка на структурно консервативной поверхности VH, VL содержит Cys VL в положении каркасного остатка на структурно консервативной поверхности VL, и L содержит первый Cys L и второй Cys L, причем Cys VH и первый Cys L способны образовывать дисульфидную связь, и Cys VL и второй Cys L способны образовывать дисульфидную связь.

[0061] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys в H105;

VL содержит Cys в L42;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0062] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys в H105;

VL содержит Cys в L45;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0063] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys в H105;

VL содержит Cys в L39;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0064] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys в H5;

VL содержит Cys в L42;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0065] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys в H5;

VL содержит Cys в L45;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0066] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys в H5;

VL содержит Cys в L39;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0067] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys в H3;

VL содержит Cys в L42;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0068] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys в H3;

VL содержит Cys в L45;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0069] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys в H3;

VL содержит Cys в L39;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0070] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys в H43;

VL содержит Cys в L100;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0071] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys в H43;

VL содержит Cys в L102;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0072] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys в H43;

VL содержит Cys в L5;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0073] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys в H43;

VL содержит Cys в L3;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0074] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys в H40;

VL содержит Cys в L100;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0075] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys в H40;

VL содержит Cys в L102;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0076] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys в H40;

VL содержит Cys в L5;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0077] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys в H40;

VL содержит Cys в L3;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0078] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys в H46;

VL содержит Cys в L100;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0079] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys в H46;

VL содержит Cys в L102;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0080] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys в H46;

VL содержит Cys в L5;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0081] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys в H46;

VL содержит Cys в L3;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0082] В настоящем описании также предложена фармацевтическая композиция, содержащая гетерологичную молекулу в соответствии с настоящим описанием и фармацевтически приемлемый носитель.

[0083] В еще одном аспекте в описании предложен способ получения стабилизированного scFv, включающий:

обеспечение вариабельной области тяжелой цепи (VH) и вариабельной области легкой цепи (VL), которые образуют антигенсвязывающий домен;

обеспечение линкера (L), который содержит или сконструирован таким образом, чтобы содержать первый Cys L;

конструирование VH таким образом, чтобы содержать Cys VH в положении каркасного остатка на структурно консервативной поверхности VH; и

образование дисульфидной связи между Cys VH и первым Cys L для получения стабилизированного scFv.

[0084] В описании также предложен способ получения стабилизированного scFv, включающий:

обеспечение VH и VL, которые образуют антигенсвязывающий домен;

обеспечение L, который содержит или сконструирован таким образом, чтобы содержать второй Cys L;

конструирование VL таким образом, чтобы содержать Cys VL в положении каркасного остатка на структурно консервативной поверхности VL; и

образование дисульфидной связи между Cys VL и вторым Cys L для получения стабилизированного scFv.

[0085] В описании также предложен способ получения стабилизированного scFv, включающий:

обеспечение VH и VL, которые образуют антигенсвязывающий домен;

обеспечение L, который содержит или сконструирован таким образом, чтобы содержать первый Cys L и второй Cys L;

конструирование VH таким образом, чтобы содержать Cys VH в положении каркасного остатка на структурно консервативной поверхности VH;

конструирование VL таким образом, чтобы содержать Cys VL в положении каркасного остатка на структурно консервативной поверхности VL; и

образование дисульфидной связи между Cys VH и первым Cys L и дисульфидной связи между Cys VL и вторым Cys L для получения стабилизированного scFv.

[0086] В описании также предложен способ получения стабилизированного scFv, включающий:

обеспечение полинуклеотида, кодирующего VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys в H105, а VL содержит Cys в L42;

VH содержит Cys в H43, а VL содержит Cys в L100;

VH содержит Cys в H3, а VL содержит Cys в L3;

VH содержит Cys в H3, а VL содержит Cys в L5;

VH содержит Cys в H3, а VL содержит Cys в L39;

VH содержит Cys в H3, а VL содержит Cys в L42;

VH содержит Cys в H3, а VL содержит Cys в L45;

VH содержит Cys в H3, а VL содержит Cys в L100;

VH содержит Cys в H3, а VL содержит Cys в L102;

VH содержит Cys в H5, а VL содержит Cys в L3;

VH содержит Cys в H5, а VL содержит Cys в L5;

VH содержит Cys в H5, а VL содержит Cys в L39;

VH содержит Cys в H5, а VL содержит Cys в L42;

VH содержит Cys в H5, а VL содержит Cys в L45;

VH содержит Cys в H5, а VL содержит Cys в L100;

VH содержит Cys в H5, а VL содержит Cys в L102;

VH содержит Cys в H40, а VL содержит Cys в L3;

VH содержит Cys в H40, а VL содержит Cys в L5;

VH содержит Cys в H40, а VL содержит Cys в L39;

VH содержит Cys в H40, а VL содержит Cys в L42;

VH содержит Cys в H40, а VL содержит Cys в L45;

VH содержит Cys в H40, а VL содержит Cys в L100;

VH содержит Cys в H40, а VL содержит Cys в L102;

VH содержит Cys в H43, а VL содержит Cys в L3;

VH содержит Cys в H43, а VL содержит Cys в L5;

VH содержит Cys в H43, а VL содержит Cys в L39;

VH содержит Cys в H43, а VL содержит Cys в L42;
VH содержит Cys в H43, а VL содержит Cys в L45;
VH содержит Cys в H43, а VL содержит Cys в L102;
VH содержит Cys в H46, а VL содержит Cys в L3;
VH содержит Cys в H46, а VL содержит Cys в L5;
VH содержит Cys в H46, а VL содержит Cys в L39;
VH содержит Cys в H46, а VL содержит Cys в L42;
VH содержит Cys в H46, а VL содержит Cys в L45;
VH содержит Cys в H46, а VL содержит Cys в L100;
VH содержит Cys в H46, а VL содержит Cys в L102;
VH содержит Cys в H105, а VL содержит Cys в L3;
VH содержит Cys в H105, а VL содержит Cys в L5;
VH содержит Cys в H105, а VL содержит Cys в L39;
VH содержит Cys в H105, а VL содержит Cys в L45;
VH содержит Cys в H105, а VL содержит Cys в L100; или
VH содержит Cys в H105, а VL содержит Cys в L102, где остатки нумеруются по системе Чотиа.

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и экспрессию полинуклеотида в клетке-хозяине для получения стабилизированного scFv.

[0087] В еще одном аспекте в изобретении предложен выделенный одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), содержащий переменную область тяжелой цепи (VH), средство для связывания (L) и переменную область легкой цепи (VL), причем scFv содержит:

первую дисульфидную связь между цистеином (Cys) VH на структурно консервативной поверхности и первым Cys L;

вторую дисульфидную связь между Cys VL на структурно консервативной поверхности и вторым Cys L; или

первую дисульфидную связь между Cys VH на структурно консервативной поверхности и первым Cys L, и вторую дисульфидную связь между Cys VL на структурно консервативной поверхности и вторым Cys L.

[0088] В настоящем описании также предложен выделенный одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), содержащий средство для связывания антигена, линкер (L) и переменную область легкой цепи (VL), причем scFv содержит:

первую дисульфидную связь между цистеином (Cys) на структурно консервативной поверхности, предназначенным для связывания антигена, и первым Cys L;

вторую дисульфидную связь между Cys VL на структурно консервативной поверхности и вторым Cys L; или

первую дисульфидную связь между Cys на структурно консервативной поверхности, предназначенным для связывания антигена, и первым Cys L, и вторую

дисульфидную связь между Cys VL на структурно консервативной поверхности и вторым Cys L.

[0089] В настоящем описании также предложен выделенный одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), содержащий переменную область тяжелой цепи (VH), линкер (L) и средство для связывания антигена, причем scFv содержит:

первую дисульфидную связь между цистеином (Cys) VH на структурно консервативной поверхности и первым Cys L;

вторую дисульфидную связь между Cys на структурно консервативной поверхности, предназначенным для связывания антигена, и вторым Cys L; или

первую дисульфидную связь между Cys VH на структурно консервативной поверхности и первым Cys L, и вторую дисульфидную связь между Cys на структурно консервативной поверхности, предназначенным для связывания антигена, и вторым Cys L.

[0090] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), содержащий переменную область тяжелой цепи (VH), средство для связывания (L) и переменную область легкой цепи (VL), причем scFv содержит:

первую дисульфидную связь между цистеином (Cys) VH на структурно консервативной поверхности и первым Cys L;

вторую дисульфидную связь между Cys VL на структурно консервативной поверхности и вторым Cys L; или

первую дисульфидную связь между Cys VH на структурно консервативной поверхности и первым Cys L, и вторую дисульфидную связь между Cys VL на структурно консервативной поверхности и вторым Cys L.

[0091] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), содержащий средство для связывания антигена, линкер (L) и переменную область легкой цепи (VL), причем scFv содержит:

первую дисульфидную связь между цистеином (Cys) на структурно консервативной поверхности, предназначенным для связывания антигена, и первым Cys L;

вторую дисульфидную связь между Cys VL на структурно консервативной поверхности и вторым Cys L; или

первую дисульфидную связь между Cys на структурно консервативной поверхности, предназначенным для связывания антигена, и первым Cys L, и вторую дисульфидную связь между Cys VL на структурно консервативной поверхности и вторым Cys L.

[0092] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), содержащий переменную область тяжелой цепи (VH), линкер (L) и средство для связывания антигена (VL), причем scFv содержит:

первую дисульфидную связь между цистеином (Cys) VH на структурно

консервативной поверхности и первым Cys L;

вторую дисульфидную связь между Cys на структурно консервативной поверхности, предназначенным для связывания антигена, и вторым Cys L; или

первую дисульфидную связь между Cys VH на структурно консервативной поверхности и первым Cys L, и вторую дисульфидную связь между Cys на структурно консервативной поверхности, предназначенным для связывания антигена, и вторым Cys L.

[0093] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), содержащий переменную область тяжелой цепи (VH), средство для связывания (L) и переменную область легкой цепи (VL), причем scFv содержит:

первую дисульфидную связь между цистеином (Cys) VH на структурно консервативной поверхности и первым Cys L;

вторую дисульфидную связь между Cys VL на структурно консервативной поверхности и вторым Cys L; или

первую дисульфидную связь между Cys VH на структурно консервативной поверхности и первым Cys L, и вторую дисульфидную связь между Cys VL на структурно консервативной поверхности и вторым Cys L.

[0094] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), содержащий средство для связывания антигена, линкер (L) и переменную область легкой цепи (VL), причем scFv содержит:

первую дисульфидную связь между цистеином (Cys) на структурно консервативной поверхности, предназначенным для связывания антигена, и первым Cys L;

вторую дисульфидную связь между Cys VL на структурно консервативной поверхности и вторым Cys L; или

первую дисульфидную связь между Cys на структурно консервативной поверхности, предназначенным для связывания антигена, и первым Cys L, и вторую дисульфидную связь между Cys VL на структурно консервативной поверхности и вторым Cys L.

[0095] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), содержащий переменную область тяжелой цепи (VH), линкер (L) и средство для связывания антигена, причем scFv содержит:

первую дисульфидную связь между цистеином (Cys) VH на структурно консервативной поверхности и первым Cys L;

вторую дисульфидную связь между Cys на структурно консервативной поверхности, предназначенным для связывания антигена, и вторым Cys L; или

первую дисульфидную связь между Cys VH на структурно консервативной поверхности и первым Cys L, и вторую дисульфидную связь между Cys на структурно консервативной поверхности, предназначенным для связывания антигена, и вторым Cys L.

[0096] В настоящем описании также предложено средство для кодирования scFv, предложенного в настоящем документе.

[0097] В настоящем описании также предложено средство для репликации вектора, предложенного в настоящем документе.

[0098] В настоящем описании также предложена композиция, содержащая средство для стабилизации scFv.

[0099] В настоящем описании также предложена композиция, содержащая средство для повышения термостабильности scFv.

[0100] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая средство для стабилизации scFv.

[0101] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая средство для повышения термостабильности scFv.

[0102] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая средство для стабилизации scFv.

[0103] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая средство для повышения термостабильности scFv.

4. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0104] На **ФИГ. 1** показан пример конструкции стабилизированного scFv (spFv). VL и VH соединены гибким линкером, показанным как пунктирная линия на фигуре, содержащей последовательность скобок CPPC (**SEQ ID NO: 1**) «SS» обозначает дисульфидные связи между последовательностью скобки в линкере и якорными точками.

[0105] На **ФИГ. 2** показана графическая иллюстрация выбора якорной точки для spFv в ориентации VL-линкер-VH. Fv человеческого антитела зародышевой линии (pdb id 5I19, GLk1) использовали для графических изображений и иллюстративных измерений расстояния. Расстояние, показанные пунктирными линиями, находятся между атомами C β остатков и выражены в Å. Структурно консервативные каркасные положения с требуемыми расстояниями были выбраны в качестве якорных точек для мутации в Cys. Якорные точки для ориентации VL-линкер-VH представляли собой положение 42 в по Чотиа для VL (K42 на фигуре) и положение 105 для VH (Q105 на фигуре). Также показаны С-концевой остаток VL (K107) и N-концевой остаток VH (Q1).

[0106] На **ФИГ. 3** показана графическая иллюстрация выбора якорной точки для spFv в ориентации VH-линкер-VL. Fv человеческого антитела зародышевой линии (pdb id 5I19, GLk1) использовали для графических изображений и иллюстративных измерений расстояния. Расстояние, показанные пунктирными линиями, находятся между атомами C β остатков и выражены в Å. Структурно консервативные каркасные положения с требуемыми расстояниями были выбраны в качестве якорных точек для мутации в Cys. Якорные точки для ориентации VH-линкер-VL представляли собой положение 43 по Чотиа для VH (K43 на фигуре) и положение 100 для VL (Q100 на фигуре). Также показаны С-концевой остаток VH (S114) и N-концевой остаток VL (D1).

[0107] На **ФИГ. 4** показана графическая иллюстрация расстояния C β (Cys1)-C β (Cys2)

между двумя остатками Cys в шарнире CPPC двух тяжелых цепей IgG2a мыши (pdb id 1igt) (**SEQ ID NO: 1**). Расстояния на фигуре показаны в ангстремах.

[0108] На **ФИГ. 5** показана графическая иллюстрация расстояния C β (Cys1)-C β (Cys2) между двумя остатками Cys в шарнире CPPC двух тяжелых цепей IgG человека (pdb id 5dk3) (**SEQ ID NO: 1**). Расстояния на фигуре показаны в ангстремах.

[0109] На **ФИГ. 6** показаны выбранные якорные точки VL, выделенные серым и пронумерованные как 1 и 2 ниже выравнивания аминокислот. Последовательности VL пронумерованы в соответствии со схемой нумерации Чотиа. Якорная точка 1 VL (положение 42 по Чотиа) использовали в spFv в ориентации VL-линкер-VH, а якорную точку 2 VL (положение 100 по Чотиа) использовали в spFv в ориентации VH-линкер-VL. GLk1VL: **SEQ ID NO: 56**, GLk2VL: **SEQ ID NO: 57**, CAT2200VL: **SEQ ID NO: 58**; CAT2200bVL: **SEQ ID NO: 59**.

[0110] На **ФИГ. 7** показаны выбранные якорные точки VH, выделенные серым и пронумерованные как 1 и 2 ниже выравнивания аминокислот. Последовательности VH пронумерованы в соответствии со схемой нумерации Чотиа. Якорная точка 1 VH (положение 105 по Чотиа) использовали в spFv в ориентации VL-линкер-VH, а якорную точку 2 VH (положение 43 по Чотиа) использовали в spFv в ориентации VH-линкер-VL. GLk1VH: **SEQ ID NO: 60**; GLk2VH: **SEQ ID NO: 61**, CAT2200aVH: **SEQ ID NO: 62**.

[0111] На **ФИГ. 8** показана структура GLk1 spFv VL-VH. Образование скобки между якорными точками VH и VL и линкером очевидно из структуры.

[0112] На **ФИГ. 9** показана структура GLk1 spFv VH-VL. Образование скобки между якорными точками VH и VL и линкером очевидно из структуры.

[0113] На **ФИГ. 10** показана структура GLk2 spFv VH-VL. Образование скобки между якорными точками VH и VL и линкером очевидно из структуры.

[0114] На **ФИГ. 11** показана структура CAT2200b spFv VH-VL. Образование скобки между якорными точками VH и VL и линкером очевидно из структуры.

[0115] На **ФИГ. 12** показано сравнение несвязанной CAT2200b spFv VH-VL (верхняя часть) по сравнению с CC2200a scFv VL-VH, связанной с IL-17A (нижняя часть).

[0116] На **ФИГ. 13** показано сравнение вида спереди структур несвязанной CAT2200b spFv VH-VL (верхняя часть) по сравнению с CAT2200a spFv VL-VH, связанной с IL-17A (нижняя часть).

[0117] На **ФИГ. 14** показано сравнение вида сзади структур несвязанной CAT2200b spFv VH-VL (верхняя часть) по сравнению с CAT2200a spFv VL-VH, связанной с IL-17A (нижняя часть).

[0118] На **ФИГ. 15A-15M** показаны схематические представления антител, слитых со сшитым scFv. На **ФИГ. 15A-15D** показаны гетеродимеры 2:1, изотопическое контрольное антитело, слитое со сшитым scFv, полученным из LTBRmAb1. На **ФИГ. 15E-15H** показаны гетеродимеры 2:1, EDBmAb1, слитый со сшитым scFv, полученным из LTBRmAb1. На **ФИГ. 15I-15J** показаны гетеродимеры 2:1, EDBmAb1, слитый со сшитым scFv, полученным из вариантов более низкой аффинности LTBRmAb1. На **ФИГ. 15K-15L**

показаны гетеродимеры 2:1, EDBmAb1 или B21M, слитые со шшитым scFv, полученным из LTBRmAb1, без мутаций белка A в Fc-области. На **ФИГ. 15M** показан гетеродимер 2:1, MSLNmAb1, слитый со шшитым scFv, полученным из LTBRmAb1.

[0119] На **ФИГ. 16A-16C** показаны графики, демонстрирующие результаты анализа A549 репортерного гена NF-κB с использованием биспецифических антител 2:1. **ФИГ. 16A:** Сравнение TAA-зависимой активации LTBR с помощью COVA1456 с COVA1482, их соответствующих контрольных молекул COV1462 и COVA1486 и рекомбинантного человеческого LIGHT; **ФИГ. 16B:** Сравнение TAA-зависимой активации LTBR с помощью COVA1482 и биспецифических, содержащих варианты более низкой аффинности LTBRmAb1 COV14107 и COVA14108, и COVA1486; **ФИГ. 16C:** Сравнение TAA-зависимой активации LTBR с помощью COVA1482 и COVA14133 (конструкт без мутаций белка A) и их соответствующих контрольных молекул COV1486 и COVA14136.

[0120] На **ФИГ. 17** показаны результаты окрашивания при проточной цитометрии ICAM-1 на клетках A375 после эксперимента совместного культивирования. COVA1482 и его контрольную молекулу COV1486 сравнивают с рекомбинантным человеческим LIGHT.

[0121] На **ФИГ. 18A-18D** показаны графики, демонстрирующие измерения цитокинов в супернатантах совместных культур, обработанных анти-EDB/анти-LTBR биспецифическими антителами COV14133 по сравнению с COVA14136 и COVA1440; Анализы выполняли с использованием платформы MSD. **ФИГ. 18A:** Концентрации RANTES человека; **ФИГ. 18B:** Концентрации IL-6 человека; **ФИГ. 18C:** Концентрации IL-8 человека; **ФИГ. 18D:** Концентрации MIP-3b человека.

[0122] На **ФИГ. 19A-19B** показана активация LTBR с помощью биспецифических антител MSLN/LTBR в анализе совместного культивирования A549 репортерного гена NF-κB/CHOK1MSLN или A549 репортерного гена NF-κB/H226. **ФИГ. 19A:** Активация LTBR в анализе совместного культивирования A549 репортерного гена NF-κB/H226. COVA14146 (2:1 MSLNmAb1 x LTBRmAb1) по сравнению с LIGHT и для конструктов COV1486 изотипического контроля 2:1; **ФИГ. 19B:** Концентрация секретируемых RANTES после активации LTBR в анализе совместного культивирования A549 репортерного гена NF-κB/H226. COVA14146 (2:1 MSLNmAb1 x LTBRmAb1) по сравнению с LIGHT и для конструктов COV1486 изотипического контроля 2:1.

5. ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0123] Раскрываемые способы будут более понятны со ссылкой на приведенное ниже подробное описание в сочетании с прилагаемыми фигурами, которые являются частью настоящего описания. Следует понимать, что описанные способы не ограничены конкретными способами, описанными и/или приведенными в настоящем документе, и что терминология, используемая в настоящем документе, имеет своей целью описание определенных вариантов осуществления исключительно в качестве примера и не призвана носить ограничивающий характер.

[0124] Все патенты, опубликованные заявки на патенты и публикации, процитированные в настоящем документе, включены в него путем ссылки, как если бы они

были полностью изложены в настоящем документе.

[0125] В случае представления списка, если не указано иное, следует понимать, что каждый отдельный элемент этого списка и каждая комбинация из этого списка является отдельным вариантом осуществления. Например, список вариантов осуществления, представленный в виде «**А, В или С**», следует интерпретировать как список, включающий варианты осуществления «А», «В», «С», «А или В», «А или С», «В или С» или «А, В или С».

[0126] При использовании в этом описании и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают и множественное число, если содержание текста четко не указывает на иное. Так, например, ссылка на «клетку» включает комбинацию двух или более клеток и т. п.

[0127] Переходные термины «**содержащий**», «**состоящий по существу из**» и «**состоящий из**» предназначены для обозначения их по существу общепринятых патентных значений; т. е. (i) термин «содержащий», который является синонимом терминам «включающий», «содержащий» или «характеризующийся», является включающим или неограниченным и не исключает дополнительные, неуказанные элементы или стадии способа; (ii) «состоящий из» исключает любой элемент, стадию или ингредиент, не указанный в формуле изобретения; и (iii) «состоящий по существу из» ограничивает объем формулы изобретения конкретными материалами или стадиями «и тем, что не оказывает существенного влияния на основную (-ые) и новую (-ые) характеристику (-и)» заявленного изобретения. Варианты осуществления, описанные в отношении фразы «содержащий» (или его эквивалентов), обеспечивают такое же значение, как варианты осуществления, описанные независимо друг от друга в отношении фразы «состоящий из» и «состоящий по существу из».

[0128] Термин «**около**» означает «в пределах приемлемого диапазона ошибки» для конкретного значения, определенного обычным специалистом в данной области, причем ошибка отчасти зависит от того, каким образом измерено или определено это значение, т. е. от ограничений системы измерения. Если в примерах или в других разделах настоящего описания в контексте конкретного анализа, результата или варианта осуществления явным образом не указано иное, термин «около» означает «в пределах одного среднеквадратичного отклонения» в соответствии с практикой, принятой в данной области, или «в диапазоне до 5%», в зависимости от того, что больше.

[0129] Термин «**альтернативный каркас**» относится к одноцепочечному белковому каркасу, который содержит структурированную сердцевину, связанную с переменными доменами с высокой конформационной толерантностью. Переменные домены допускают изменение, внесенное без ущерба для целостности каркаса, и, следовательно, переменные домены можно конструировать и выбирать для связывания со специфическим антигеном.

[0130] Термин «**антителозависимая клеточная цитотоксичность**», «**антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность**» или «**ADCC**»

относится к механизму индукции гибели клеток, который зависит от взаимодействия покрытых антителами клеток-мишеней с эффекторными клетками, обладающими литической активностью, например естественными клетками-киллерами (NK), моноцитами, макрофагами и нейтрофилами, посредством гамма-рецепторов Fc (Fc γ R), экспрессирующихся на эффекторных клетках.

[0131] Термин «**антителозависимый клеточный фагоцитоз**» или «**ADCP**» относится к механизму уничтожения покрытых антителами клеток-мишеней путем интернализации фагоцитарными клетками, такими как макрофаги или дендритные клетки.

[0132] Термин «**антиген**» относится к любой молекуле (например, белок, пептид, полисахарид, гликопротеин, гликолипид, нуклеиновая кислота, их части или их комбинации), которая способна опосредовать иммунный ответ. Примеры иммунных ответов включают в себя выработку антител и активацию иммунных клеток, таких как Т-клетки, В-клетки или NK-клетки.

[0133] Термин «**антигенсвязывающий фрагмент**» или «**антигенсвязывающий домен**» относится к части белка, которая связывает антиген. Антигенсвязывающие фрагменты могут представлять собой синтетические, ферментативно получаемые или модифицированные методами генной инженерии полипептиды, и они включают части иммуноглобулина, которые связывают антиген, такой как VH, VL, VH и VL, фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂, Fd и Fv, доменные антитела (dAb), состоящие из одного домена VH или одного домена VL, адаптированные к верблюду VH-домены, VHH-домены, минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, имитирующих CDR-области антитела, например участки FR3-CDR3-FR4, HCDR1, HCDR2 и/или HCDR3, а также LCDR1, LCDR2 и/или LCDR3, альтернативные каркасы, которые связывают антиген, и мультиспецифические белки, содержащие антигенсвязывающие фрагменты. Антигенсвязывающие фрагменты (такие как VH и VL) могут быть связаны вместе посредством синтетического линкера с образованием различных типов конструкций одноцепочечных антител, в которых домены VH/VL могут соединяться в пару внутримолекулярно или межмолекулярно в тех случаях, когда домены VH и VL экспрессируются в виде отдельных одиночных цепей с образованием одновалентного антигенсвязывающего домена, например одноцепочечного Fv (scFv) или диатела. Антигенсвязывающие фрагменты также могут быть конъюгированы с другими антителами, белками, антигенсвязывающими фрагментами или альтернативными каркасом, которые могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими для конструирования биспецифических и мультиспецифических белков.

[0134] Термин «**антитела**» подразумевается в широком значении и включает молекулы иммуноглобулинов, в том числе моноклональные антитела, включая мышинные, человеческие, гуманизированные и химерные моноклональные антитела, антигенсвязывающие фрагменты, мультиспецифические антитела, например биспецифические, триспецифические, тетраспецифические и т. п. антитела, димерные, тетрамерные или мультимерные антитела, одноцепочечные антитела, доменные антитела и

любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая содержит антигенсвязывающий сайт требуемой специфичности. «Полноразмерные антитела» содержат две тяжелые цепи (HC) и две легкие цепи (LC), соединенные между собой дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь состоит из варибельной области тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи (состоящей из доменов CH1, шарнирной области, CH2 и CH3). Каждая легкая цепь состоит из варибельной области (VL) легкой цепи и константной области (CL) легкой цепи. Области VH и VL можно дополнительно подразделять на области гиперварибельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), между которыми расположены каркасные области (FR). Каждая из VH и VL состоит из трех CDR и четырех сегментов FR, расположенных в направлении от amino- к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи иммуноглобулины могут относиться к пяти основным классам - IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. IgA и IgG дополнительно подразделяются на изоформы IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Легкие цепи антител любых видов позвоночных в зависимости от аминокислотных последовательностей их константных доменов можно отнести к одному из двух четко отличающихся типов, а именно, каппа (κ) и лямбда (λ).

[0135] Термин «**биспецифический**» относится к молекуле (такой как антитело), которая специфически связывается с двумя разными антигенами или двумя разными эпитопами в пределах одного антигена. Биспецифическая молекула может иметь перекрестную реактивность с другими родственными антигенами, например, таким же антигеном от других видов (гомологов), таких как человек или обезьяна, например, *Macaca cynomolgus* (яванский макак, крабоед) или *Pan troglodytes*, или может связывать эпитоп, который имеется в двух или более разных антигенах.

[0136] Термин «**химерный антигенный рецептор**», или «**CAR**», относится к сконструированным Т-клеточным рецепторам, которые прививают лиганд или антигенную специфичность на Т-клетки (например, интактные Т-клетки, центральные Т-клетки памяти, эффекторные Т-клетки памяти или их комбинации). CAR также известны как искусственные Т-клеточные рецепторы, химерные Т-клеточные рецепторы или химерные иммунорецепторы. CAR содержат внеклеточный домен, способный связываться с антигеном, трансмембранный домен и по меньшей мере один внутриклеточный домен. Внутриклеточный домен CAR содержит полипептид, который, как известно, выполняет функцию домена, передающего сигнал для активации или ингибирования биологического процесса в клетке. Трансмембранный домен содержит любой пептид или полипептид, который, как известно, охватывает клеточную мембрану и может выполнять функцию связывания внеклеточного и сигнального доменов. Химерный антигенный рецептор может дополнительно содержать шарнирный домен, который служит в качестве линкера между внеклеточным и трансмембранным доменами.

[0137] Термин «**комплемент-зависимая цитотоксичность**», или «**CDC**»,

относится к механизму индукции гибели клеток, в рамках которого эффекторный домен Fc связанного с мишенью белка связывает и активирует компонент комплемента C1q, который, в свою очередь, активирует каскад комплемента, приводящий к гибели клетки-мишени. Активация комплемента может также приводить к осаждению компонентов комплемента на поверхности клеток-мишеней, что способствует CDC посредством связывания на лейкоцитах рецепторов комплемента (например, CR3).

[0138] Термин «**определяющие комплементарность области**» (CDR) относится к области антител, которые связывают антиген. Существуют три CDR в области VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3) и три CDR в области VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3). CDR можно определить с помощью различных схем, например, по Кэбот (Wu *et al.* (1970) *J Exp Med* 132: 211-250; Kabat *et al* Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991), Chothia (Chothia *et al.*, (1987) *J Mol Biol* 196: 901-17), IMGT (Lefranc *et al.*, (2003) *Dev Comp Immunol* 27: 55-77) и AbM (Martin and Thornton (1996) *J Bmol Biol* 263: 800-815). Описано соответствие между различными схемами и нумерациями переменных областей (см., например, Lefranc *et al.* (2003) *Dev Comp Immunol* 27: 55-77; Honegger and Pluckthun, *J Mol Biol* (2001) 309:657-670; база данных International ImMunoGeneTics (IMGT); веб-ресурсы, [http://www_imgt_org](http://www.imgt.org)). Для разметки CDR можно использовать доступные программы, такие как abYsis от UCL Business PLC. Используемые в настоящем документе термины «CDR», «HCDR1», «HCDR2», «HCDR3», «LCDR1», «LCDR2» и «LCDR3» включают в себя CDR, определенные любым из способов, описанных выше, по Кабат, Чотиа, IMGT или AbM, если в описании явным образом не указано иное.

[0139] Термин «**уменьшать**», «**ослаблять**» или «**снижать**» относится по существу к способности исследуемой молекулы опосредовать сниженный ответ (т. е., воздействие сверху вниз) по сравнению с ответом, опосредованным контрольным образцом или несущей средой. Примеры ответов включают в себя связывание белка с его антигеном или рецептором, усиленное связывание с Fc γ R или улучшенные эффекторные функции Fc, такие как улучшенная ADCC, CDC и/или ADCP. Уменьшение может быть статистически значимым различием в измеренном ответе между исследуемой молекулой и контрольным образцом (или несущей средой) или уменьшением измеренного ответа, например уменьшением в около 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или 30 раз или более, например 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 раз или более.

[0140] Термин «**усиливать**», «**стимулировать**» или «**увеличивать**» относится по существу к способности исследуемой молекулы опосредовать более высокий ответ (т. е., эффект на последующих этапах) по сравнению с ответом, опосредованным контрольным образцом или несущей средой. Примеры ответов представляют собой связывание белка с его антигеном или рецептором, усиленное связывание с Fc γ R или улучшенные эффекторные функции Fc, такие как улучшенная ADCC, CDC и/или ADCP. Усиление может быть статистически значимым различием в измеренном ответе между исследуемой молекулой и контрольным образцом (или несущей средой) или увеличением измеренного

ответа, например увеличением в около 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или 30 раз или более, например 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 раз или более.

[0141] Термин **«экспрессионный вектор»** относится к вектору, который можно использовать в биологической системе или реконструированной биологической системе для управления трансляцией полипептида, кодируемого полинуклеотидной последовательностью, присутствующей в экспрессионном векторе.

[0142] Термин **«гетерологичный»** относится к полипептиду или полинуклеотиду, который содержит два или более полипептида или два или более полинуклеотида, которые не находятся в одинаковых отношениях друг к другу в природе.

[0143] Термин **«гетерологичный полинуклеотид»** относится к полинуклеотиду, который содержит два или более полинуклеотида, которые не находятся в одинаковых отношениях друг к другу в природе.

[0144] Термин **«гетерологичный полипептид»** относится к полипептиду, который содержит два или более полипептида, которые не находятся в одинаковых отношениях друг к другу в природе.

[0145] Термин **«человеческое антитело»** относится к антителу, которое оптимизировано для обеспечения минимального иммунного ответа при введении человеческому индивиду. Варибельные области человеческого антитела получают из последовательностей иммуноглобулинов человека. Если антитело содержит константную область или часть константной области, константную область также получают из последовательностей иммуноглобулинов человека. Человеческое антитело содержит варибельные области тяжелой и легкой цепи, которые «получены из» последовательностей человеческого происхождения, если варибельные области человеческого антитела получены из системы, в которой используют иммуноглобулин зародышевой линии человека или перестроенные гены иммуноглобулина. Такими примерами систем являются библиотеки генов человеческих иммуноглобулинов, отображаемые на фаге, и трансгенные животные, отличные от человека, такие как мыши или крысы, несущие локусы человеческих иммуноглобулинов. «Человеческое антитело», как правило, содержит аминокислотные отличия по сравнению с иммуноглобулинами, экспрессируемыми у людей, из-за различий между системами, используемыми для получения человеческих антител и локусов человеческих иммуноглобулинов, внедрения соматических мутаций, намеренного введения замен в каркасные участки и/или CDR, или и то и другое. Как правило, «человеческое антитело» по аминокислотной последовательности на по меньшей мере около 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентично аминокислотной последовательности, кодируемой генами иммуноглобулина зародышевой линии человека или перестроенными генами иммуноглобулина. В некоторых случаях «человеческое антитело» может содержать консенсусные каркасные последовательности, полученные в результате анализов каркасных последовательностей человека, например, как описано в Knappik *et al.*, (2000) *J Mol Biol* 296:57-86, или синтетическую HCDR3,

включенную в библиотеки генов иммуноглобулинов человека, отображаемых на фаге, например, как описано в публикации Shi *et al.*, (2010) *J Mol Biol* 397:385-396 и международной патентной публикации № WO2009/085462. Антитела, в которых по меньшей мере один CDR получен из биологического вида, отличного от человека, не подходят под определение антитела человека.

[0146] Термин «**гуманизированное антитело**» относится к антителу, в котором по меньшей мере один CDR получен из биологического вида, отличного от человека, а по меньшей мере один каркас получен из последовательностей человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело может включать замены в каркасных областях, в результате чего каркасы могут не быть точной копией экспрессированного человеческого иммуноглобулина или человеческих генных последовательностей зародышевой линии.

[0147] Термин «**выделенный**» относится к однородной популяции молекул (таких как spFv в соответствии с настоящим описанием или гетерологичные белки, содержащие spFv в соответствии с настоящим описанием), которые были по существу отделены и/или очищены от других компонентов той системы, в которой данные молекулы формировались, такой как рекомбинантная клетка, а также к белку, который был подвергнут по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. Термин «выделенное» относится к антителу, которое по существу не содержит иных клеточных материалов и/или химических веществ, и охватывает молекулы, которые выделены с большей чистотой, такой как 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% чистотой.

[0148] Термин «модулировать» относится либо к повышенной, либо пониженной способности исследуемой молекулы опосредовать усиленный или сниженный ответ (т. е., эффект на последующих стадиях) по сравнению с ответом, опосредованным контрольным образцом или несущей средой.

[0149] Термин «**моноклональное антитело**» относится к антителу, полученному из по существу гомогенной популяции молекул антител, т. е. индивидуальных антител, составляющих популяцию, идентичных за исключением возможных хорошо известных изменений, таких как удаление С-концевого лизина из тяжелой цепи антитела или посттрансляционные модификации, такие как изомеризация или дезамидирование аминокислот, окисление метионина или аспарагина или дезамидирование глутамин. Моноклональные антитела обычно связывают один антигенный эпитоп. Биспецифические моноклональные антитела связываются с двумя разными антигенными эпитопами. В пределах популяции антител моноклональные антитела могут иметь гетерогенное гликозилирование. Моноклональное антитело может быть моноспецифическим или мультиспецифическим, например биспецифическим, моновалентным, двухвалентным или мультивалентным.

[0150] Термин «**мультиспецифическая**» относится к молекуле, которая связывает два или более разных антигенов или два или более разных эпитопов в пределах одного

антигена. Мультиспецифическая молекула может иметь перекрестную реактивность с другими родственными антигенами, например, таким же антигеном от других видов (гомологов), таких как человек или обезьяна, например, *Macaca fascicularis* (яванский макак, макак) или *Pan troglodytes*, или может связывать эпитоп, который имеется в двух или более разных антигенах.

[0151] Термин «**полинуклеотид**» относится к молекуле, содержащей цепь нуклеотидов, ковалентно связанных через сахарофосфатную основную цепь или другую эквивалентную ковалентную химическую структуру. кДНК является типичным примером полинуклеотида.

[0152] Термин «**белок**» или «**полипептид**» используется взаимозаменяемо и в настоящем документе относится к молекуле, которая содержит один или более полипептидов, каждый из которых состоит из по меньшей мере двух аминокислотных остатков, связанных пептидной связью. Белок может представлять собой мономер или может представлять собой белковый комплекс двух или более субъединиц, причем субъединицы идентичны или отличаются друг от друга. Малые полипептиды, содержащие менее 50 аминокислотных остатков, могут называться «пептидами». Белок может представлять собой гетерологичный слитый белок, гликопротеин или белок, модифицированный посттрансляционными модификациями, такими как фосфорилирование, ацетилирование, миристотилирование, пальмитоилирование, гликозилирование, окисление, формилирование, амидирование, цитруллинирование, полиглутамилирование, АДФ-рибозилирование, пегилирование или биотинилирование.

[0153] Термин «**рекомбинантный**» относится к полинуклеотидам, полипептидам, векторам, вирусам и другим макромолекулам, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными средствами.

[0154] Термин «**одноцепочечный Fv**» или «**scFv**» относится к одноцепочечному белку, содержащему VH, VL и линкер между VH и VL. ScFv может иметь переменные области VL и VH в любой ориентации, например, по отношению к порядку от N- к C-концу VH и VL. Таким образом, scFv может находиться в ориентации VL-линкер-VH или VH-линкер-VL. scFv может быть сконструирован таким образом, чтобы содержать дисульфидные связи между VH, VL и линкером.

[0155] Термин «**специфически связывает**», «**специфическое связывание**» или «**связывает**» относится к связыванию белка, такого как scFv, с антигеном или эпитопом в пределах антигена с большей аффинностью, чем с другими антигенами. Как правило, белок, такой как scFv, связывается с антигеном или эпитопом в пределах антигена с равновесной константой диссоциации (K_D) около 1×10^{-6} М или менее, около 1×10^{-7} М или менее, около 5×10^{-8} М или менее, около 1×10^{-8} М или менее, около 1×10^{-9} М или менее, около 1×10^{-10} М или менее, около 1×10^{-11} М или менее или около 1×10^{-12} М или менее, как правило, со значением K_D , которое по меньшей мере в сто раз ниже его значения K_D связывания с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеином).

[0156] Термин «**сшитый одноцепочечный Fv**» или «**spFv**» «относится к scFv,

который содержит одну или более дисульфидных связей между VH и линкером или VL и линкером. Как правило, spFv может содержать одну дисульфидную связь между VH и линкером, одну дисульфидную связь между VL и линкером или две дисульфидные связи между VH и линкером и VL и линкером. Молекулы scFv, которые содержат дисульфидные связи между VH и VL, не входят в термин «spFv».

[0157] Термин «**субъект**» включает любого человека или не относящееся к человеку животное. Термин «не относящееся к человеку животное» включает в себя всех позвоночных, например, млекопитающих и немлекопитающих, таких как приматы, овцы, собаки, кошки, лошади, коровы, куры, амфибии, рептилии и т. д. Термины «испытуемый» и «пациент» в настоящем документе могут применяться взаимозаменяемо.

[0158] Термин «**терапевтически эффективное количество**» относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество может изменяться в зависимости от таких факторов, как течение заболевания, возраст, пол и масса тела субъекта, а также от способности терапевтического средства или комбинации терапевтических средств вызывать у субъекта желаемый ответ.

[0159] Термины «**лечить**», «**лечение**» или «**терапия**» заболевания или расстройства относятся к достижению одной или более следующих целей: уменьшение тяжести и/или продолжительности расстройства, замедление нарастания выраженности симптомов, характерных для этого расстройства, ограничение или предотвращение рецидива расстройства у субъектов, которые ранее страдали расстройством, либо ограничение или предотвращение рецидива симптомов у субъектов с ранее проявлявшимися симптомами расстройства.

[0160] Термин «**триспецифический**» относится к молекуле (такой как антитело), которая специфически связывается с тремя разными антигенами или тремя разными эпитопами в пределах одного антигена. Триспецифическая молекула может иметь перекрестную реактивность с другими родственными антигенами, например, таким же антигеном от других видов (гомологов), таких как человек или обезьяна, например, *Macaca cynomolgus* (яванский макак, крабоед) или *Pan troglodytes*, или может связывать эпитоп, который имеется в трех или более разных антигенах.

[0161] Термины «**вариант**», «**мутант**» или «**измененный**» относятся к полипептиду или полинуклеотиду, который отличается от эталонного полипептида или эталонного полинуклеотида одной или более модификациями, например одной или более заменами, вставками или делециями.

[0162] Нумерация аминокислотных остатков константной области антитела в тексте описания приведена в соответствии с индексом EU, как описано в публикации Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991), если явно не указано иное.

[0163] Мутации в константных областях Ig называются следующим образом: L351Y_F405A_Y407V относятся к мутациям L351Y, F405A и Y407V в одной константной

области иммуноглобулина. L351Y_F405A_Y407V/T394W относится к мутациям F405A и Y407V в первой константной области Ig и мутации T394W во второй константной области Ig, присутствующей в молекуле.

[0164] Нумерация переменных областей соответствует системе Чотиа, если явным образом не указано иное.

[0165] Термин «**цистеин VH**» или «**Cys VH**» относится к остатку Cys, который находится в каркасе VH.

[0166] Термин «**цистеин VL**» или «**Cys VL**» относится к остатку Cys, который находится в каркасе VL.

[0167] Термин «**стабилизированный**» относится к scFv, сохраняющему сравнимое связывание с hK2, по сравнению с не нагретым образцом scFv, называемым термостабильным.

[0168] Термин «**улучшенная стабильность**» относится к spFv в соответствии с настоящим описанием, имеющему повышенную температуру плавления (T_m), по сравнению с исходным scFv, который не содержит дисульфидных связей и остатков Cys, введенных в spFv. Повышенная T_m может представлять собой повышение на 2 °C или более, например, на 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C, 10 °C, 11 °C, 12 °C, 13 °C, 14 °C или 15 °C.

[0169] Термин «**якорная точка**» относится к остатку Cys каркаса VH или VL scFv, который может быть подвергнут мутагенезу с Cys без неблагоприятного воздействия на общую структуру scFv и способен образовывать дисульфидную связь с Cys, находящимися в линкере scFv.

[0170] Термин «**скобка**» относится к линкеру scFv, который содержит один или два остатка Cys, которые способны образовывать дисульфидную связь с якорной точкой Cys.

[0171] Термин «**находящийся на поверхности**» относится к аминокислотному остатку, который по меньшей мере частично находится на поверхности белка и доступен для растворителя, например, доступен для дейтерирования. Алгоритмы хорошо известны в данной области для прогнозирования доступности остатков на поверхности на основании первичной последовательности или белка. В альтернативном варианте осуществления находящиеся на поверхности остатки могут быть идентифицированы из кристаллической структуры белка.

[0172] Термин «**LTBR**» относится к полипептиду, который представляет собой рецептор клеточной поверхности для лимфотоксина, участвующего в апоптозе и высвобождении цитокинов, который является членом суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли. LTBR также может называться членом 3 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF3) LTBR экспрессируется на поверхности многих типов клеток, включая клетки линии эпителиальных и миелоидных линий. LTBR может специфически связывать мембранную форму лимфотоксина (комплекс лимфотоксин-альфа и лимфотоксин-бета). Активация LTBR может инициировать апоптоз посредством TRAF3 и TRAF5 и может приводить к высвобождению интерлейкина 8. Если не указано иное,

LTBR предпочтительно представляет собой LTBR человека. Аминокислотная последовательность человеческого LTBR представлена в UniProt под номером P36941.

[0173] Термин «EDB» или «**дополнительный домен В**» относится к домену фибронектина, который может быть включен в молекулы фибронектина на основе паттерна сплайсинга пре-мРНК фибронектина. Дополнительный домен В представляет собой полный повтор фибронектина (FN) типа III, который содержит 91 аминокислотный остаток. Как правило, EDB не обнаруживается в нормальных взрослых тканях, но демонстрирует большую экспрессию в эмбриональной и опухолевой тканях во внеклеточном матриксе и накапливается вокруг новообразованных сосудов во время ангиогенных процессов, что делает EDB потенциальным маркером и мишенью ангиогенеза. Если не указано иное, EDB предпочтительно представляет собой EDB человека. Аминокислотная последовательность человеческого EDB, содержащего изоформу фибронектина, представлена в UniProt под номером P02751.

[0174] Термин «**фибронектин**» относится к полипептиду, который представляет собой высокомолекулярный гликопротеин внеклеточного матрикса. Фибронектин может связываться с трансмембранными белками рецептора, называемыми интегринами. Фибронектин может также связывать другие внеклеточные матричные белки, такие как коллаген, фибрин и гепаран-сульфат протеогликаны. Фибронектин может существовать в виде белкового димера, состоящего из двух почти идентичных мономеров, связанных парой дисульфидных связей. Фибронектин получают из одного гена, но альтернативное сплайсирование молекулы пре-мРНК фибронектина приводит к созданию нескольких изоформ фибронектина, одна из которых представляет собой фибронектин EDB. Фибронектин может играть роль в адгезии клеток, росте, миграции и дифференциации и он может быть важным для процессов, таких как заживление ран и эмбриональное развитие. Аминокислотная последовательность фибронектина человека представлена номером UniProt P02751, которая содержит дополнительный домен В, и номерами доступа NP_001263337 (изоформа В), NP_001263338 (изоформа с), NP_001263339 (изоформа d), NP_001263340 (изоформа е), и NP_001263341 (изоформа f), NP_001293058 (изоформа 8), NP_001293059 (изоформа 9), NP_001293060 (изоформа 10), NP_001293061 (изоформа 11) и NP_002017 (изоформа 3).

5.1 Соединения

[0175] В настоящем описании предложены стабилизированные молекулы scFv (в данном документе называемые spFv (сшитый Fv), гетерологичные и мультиспецифические молекулы, содержащие spFv, кодирующие их полинуклеотиды, векторы, клетки-хозяева и способы их получения и применения. Настоящее описание основано по меньшей мере частично на идентификации подходящих положений остатков в VH и/или VL (в настоящем документе обозначается как якорная точка VH или якорная точка VL) и в гибком линкере (в настоящем документе называемом скобкой), которые могут быть сконструированы в остатки цистеина, что приводит к образованию дисульфидных связей между линкером и вариабельными доменами в scFv. Описанная в настоящем документе стратегия «сшивания»

широко применима ко всем доменам VH/VL, при этом ранее существующие молекулы scFv обеспечивают структурную идентичность scFv с улучшенной стабильностью. spFv, описанный в настоящем документе, может быть конъюгирован с любым гетерологичным белком, в биспецифическом или мультиспецифическом формате, включая химерные антигенные рецепторы (CAR), молекулы для перенаправления Т-клеток, би- и мультиспецифические молекулы и его можно применять в качестве терапевтических, диагностических молекул и молекул обнаружения.

spFv в соответствии с настоящим описанием

[0176] В настоящем описании предложен выделенный одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), содержащий переменную область тяжелой цепи (VH), линкер (L) и переменную область легкой цепи (VL), причем scFv содержит:

первую дисульфидную связь между цистеином (Cys) VH на структурно консервативной поверхности и первым Cys L;

вторую дисульфидную связь между Cys VL на структурно консервативной поверхности и вторым Cys L; или

первую дисульфидную связь между Cys VH на структурно консервативной поверхности и первым Cys L, и вторую дисульфидную связь между Cys VL на структурно консервативной поверхности и вторым Cys L.

[0177] В настоящем описании также предложен выделенный scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys VH в положении каркасного остатка на структурно консервативной поверхности VH, а L содержит первый Cys L;

VL содержит Cys VL в положении каркасного остатка на структурно консервативной поверхности VL, а L содержит второй Cys L; или

VH содержит Cys VH в положении каркасного остатка на структурно консервативной поверхности VH, VL содержит Cys VL в положении каркасного остатка на структурно консервативной поверхности VL, и L содержит первый Cys L и второй Cys L, причем Cys VH и первый Cys L способны образовывать дисульфидную связь, и Cys VL и второй Cys L способны образовывать дисульфидную связь. Дисульфидная связь, как правило, образуется во время экспрессии scFv согласно настоящему описанию.

[0178] Хотя конкретные примеры описывают spFv с двумя дисульфидными связями, легко предположить, что spFv с одной дисульфидной связью, образованной между линкером Cys и либо Cys VH, либо Cys VL, можно получить и применять, получая «полузакрепленные» молекулы. Положения якоря одинаковы в spFv, имеющей одну или две дисульфидные связи. Положение линкера Cys может варьироваться в полузакрепленной молекуле при условии, что она удовлетворяет требованиям к расстоянию и геометрии для образования дисульфидной связи с якорной точкой. Ожидается, что полузакрепленный spFv будет ограничивать относительное перемещение VL/VH, аналогично паре VL/VH, стабилизированной двумя дисульфидными связями, и, таким образом, также стабилизируется.

[0179] spFv согласно настоящему описанию демонстрировал повышенную термостабильность по сравнению с родительским scFv, не содержащим дисульфидных связей. Как правило, T_m spFv была примерно на 10 °C выше по сравнению с родительским scFv, не содержащим дисульфидных связей, независимо от T_m исходного scFv. Стабильность в целом может представлять собой термостабильность или механическую стабильность. Термостабильность может быть оценена с использованием дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC), в которой сканирование DSC проводят с использованием образцов нагретого белка (таких как образцы, нагретые до 60 °C) с последующим анализом полученных профилей теплового плавления с использованием переходов с 2 состояниями или без 2 состояний. Для перехода без 2 состояний два перехода (T_{m1} и T_{m2}) записывают, что соответствует плавлению T_m VL и VH доменов соответственно.

[0180] В некоторых вариантах осуществления расстояние между Cys VH и Cys VL составляет от около 7 Å до около 9 Å. В некоторых вариантах осуществления расстояние между Cys VH и Cys VL составляет около 7 Å. В некоторых вариантах осуществления расстояние между Cys VH и Cys VL составляет от около 8 Å. В некоторых вариантах осуществления расстояние между Cys VH и Cys VL составляет от около 9 Å.

[0181] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H3, H5, H40, H43, H46 или H105, при этом остатки нумеруются по системе Чотиа.

[0182] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H3.

[0183] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H5.

[0184] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H40.

[0185] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H43.

[0186] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H46.

[0187] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H105.

[0188] В некоторых вариантах осуществления Cys VL находятся в L3, L5, L39, L42, L45, L100 или L102, где остатки нумеруются по системе Чотиа.

[0189] В некоторых вариантах осуществления Cys VL находится в L3.

[0190] В некоторых вариантах осуществления Cys VL находится в L5.

[0191] В некоторых вариантах осуществления Cys VL находится в L39.

[0192] В некоторых вариантах осуществления Cys VL находится в L42.

[0193] В некоторых вариантах осуществления Cys VL находится в L45.

[0194] В некоторых вариантах осуществления Cys VL находится в L100.

[0195] В некоторых вариантах осуществления Cys VL находится в L102.

[0196] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H105, а Cys VL находится в L42.

[0197] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H43, а Cys VL находится в L100.

[0198] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H3, а Cys VL находится на L3.

[0199] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H3, а Cys VL находится в L5.

[0200] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H3, а Cys VL находится в L39.

[0201] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H3, а Cys VL находится в L42.

[0202] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H3, а Cys VL находится в L45.

[0203] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H3, а Cys VL находится в L100.

[0204] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H3, а Cys VL находится в L102.

[0205] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H5, а Cys VL находится в L3.

[0206] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H5, а Cys VL находится в L5.

[0207] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H5, а Cys VL находится в L39.

[0208] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H5, а Cys VL находится в L42.

[0209] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H5, а Cys VL находится в L45.

[0210] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H5, а Cys VL находится в L100.

[0211] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H5, а Cys VL находится в L102.

[0212] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H40, а Cys VL находится в L3.

[0213] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H40, а Cys VL находится в L5.

[0214] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H40, а Cys VL находится в L39.

[0215] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H40, а Cys VL находится в L42.

[0216] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H40, а Cys VL находится в L45.

[0217] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H40, а Cys VL находится в L100.

[0218] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H40, а Cys VL находится в L102.

[0219] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H43, а Cys VL находится в L3.

[0220] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H43, а Cys VL находится в L5.

[0221] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H43, а Cys VL находится в L39.

[0222] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H43, а Cys VL находится в L42.

[0223] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H43, а Cys VL находится в L45.

[0224] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H43, а Cys VL находится в L102.

[0225] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H46, а Cys VL находится в L3.

[0226] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H46, а Cys VL находится в L5.

[0227] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H46, а Cys VL находится в L39.

[0228] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H46, а Cys VL находится в L42.

[0229] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H46, а Cys VL находится в L45.

[0230] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H46, а Cys VL находится в L100.

[0231] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H46, а Cys VL находится в L102.

[0232] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H105, а Cys VL находится в L3.

[0233] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H105, а Cys VL находится в L5.

[0234] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H105, а Cys VL находится в L39.

[0235] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H105, а Cys VL находится в L45.

[0236] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H105, а Cys VL находится в L100.

[0237] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H105, а Cys VL находится в L102.

[0238] Нумерация остатков областей VH и VL по системе Чотиа.

[0239] Нумерация по системе Чотиа является хорошо известной. Другие системы

нумерации, такие как нумерация по Кэботу или IMGТ, или последовательная нумерация, также могут использоваться для нумерации положений остатков VH и VL. В **таблице 1** показано соответствие между нумерацией по системе Чотиа, Кэбота и последовательной нумерацией для примера VH, GLk1 VH (**SEQ ID NO: 60**). В **таблице 2** показано соответствие между нумерацией по системе Чотиа, Кэбота и последовательной нумерацией для примера VL, GLk1 VL (**SEQ ID NO: 56**).

Таблица 1.

Нумерация по Чотиа	Нумерация по Кэботу	Последовательная нумерация	Аминокислотный остаток в положении	Нумерация по Чотиа	Нумерация по Кэботу	Последовательная нумерация	Аминокислотный остаток в положении
H1	H1	1	E	H60	H60	61	A
H2	H2	2	V	H61	H61	62	D
H3	H3	3	Q	H62	H62	63	S
H4	H4	4	L	H63	H63	64	V
H5	H5	5	L	H64	H64	65	K
H6	H6	6	E	H65	H65	66	G
H7	H7	7	S	H66	H66	67	R
H8	H8	8	G	H67	H67	68	F
H9	H9	9	G	H68	H68	69	T
H10	H10	10	G	H69	H69	70	I
H11	H11	11	L	H70	H70	71	S
H12	H12	12	V	H71	H71	72	R
H13	H13	13	Q	H72	H72	73	D
H14	H14	14	P	H73	H73	74	N
H15	H15	15	G	H74	H74	75	S
H16	H16	16	G	H75	H75	76	K
H17	H17	17	S	H76	H76	77	N
H18	H18	18	L	H77	H77	78	T
H19	H19	19	R	H78	H78	79	L
H20	H20	20	L	H79	H79	80	Y
H21	H21	21	S	H80	H80	81	L
H22	H22	22	C	H81	H81	82	Q
H23	H23	23	A	H82	H82	83	M
H24	H24	24	A	H82A	H82A	84	N
H25	H25	25	S	H82B	H82B	85	S

H26	H26	26	G		H82C	H82C	86	L
H27	H27	27	F		H83	H83	87	R
H28	H28	28	T		H84	H84	88	A
H29	H29	29	F		H85	H85	89	E
H30	H30	30	S		H86	H86	90	D
H31	H31	31	S		H87	H87	91	T
H32	H32	32	Y		H88	H88	92	A
H33	H33	33	A		H89	H89	93	V
H34	H34	34	M		H90	H90	94	Y
H35	H35	35	S		H91	H91	95	Y
H36	H36	36	W		H92	H92	96	C
H37	H37	37	V		H93	H93	97	A
H38	H38	38	R		H94	H94	98	K
H39	H39	39	Q		H95	H95	99	Y
H40	H40	40	A		H96	H96	100	D
H41	H41	41	P		H97	H97	101	G
H42	H42	42	G		H98	H98	102	I
H43	H43	43	K		H99	H99	103	Y
H44	H44	44	G		H100	H100	104	G
H45	H45	45	L		H100A	H100A	105	E
H46	H46	46	E		H100B	H100B	106	L
H47	H47	47	W		H101	H101	107	D
H48	H48	48	V		H102	H102	108	F
H49	H49	49	S		H103	H103	109	W
H50	H50	50	A		H104	H104	110	G
H51	H51	51	I		H105	H105	111	Q
H52	H52	52	S		H106	H106	112	G
H52A	H52A	53	G		H107	H107	113	T
H53	H53	54	S		H108	H108	114	L
H54	H54	55	G		H109	H109	115	V
H55	H55	56	G		H110	H110	116	T
H56	H56	57	S		H111	H111	117	V
H57	H57	58	T		H112	H112	118	S
H58	H58	59	Y		H113	H113	119	S

H59	H59	60	Y				
-----	-----	----	---	--	--	--	--

Таблица 2.

Нумерац ия по Чотиа	Нумерац ия по Кэботу	Последо- вательна я нумерац ия	Аминокис- лотный остаток в положении		Нумерац ия по Чотиа	Нумерац ия по Кэботу	Последо- вательна я нумерац ия	Аминокис- лотный остаток в положении
L1	L1	1	D		L55	L55	55	Q
L2	L2	2	I		L56	L56	56	S
L3	L3	3	Q		L57	L57	57	G
L4	L4	4	M		L58	L58	58	V
L5	L5	5	T		L59	L59	59	P
L6	L6	6	Q		L60	L60	60	S
L7	L7	7	S		L61	L61	61	R
L8	L8	8	P		L62	L62	62	F
L9	L9	9	S		L63	L63	63	S
L10	L10	10	S		L64	L64	64	G
L11	L11	11	L		L65	L65	65	S
L12	L12	12	S		L66	L66	66	G
L13	L13	13	A		L67	L67	67	S
L14	L14	14	S		L68	L68	68	G
L15	L15	15	V		L69	L69	69	T
L16	L16	16	G		L70	L70	70	D
L17	L17	17	D		L71	L71	71	F
L18	L18	18	R		L72	L72	72	T
L19	L19	19	V		L73	L73	73	L
L20	L20	20	T		L74	L74	74	T
L21	L21	21	I		L75	L75	75	I
L22	L22	22	T		L76	L76	76	S
L23	L23	23	C		L77	L77	77	S
L24	L24	24	R		L78	L78	78	L
L25	L25	25	A		L79	L79	79	Q
L26	L26	26	S		L80	L80	80	P
L27	L27	27	Q		L81	L81	81	E
L28	L28	28	S		L82	L82	82	D

L29	L29	29	I	L83	L83	83	F
L30	L30	30	S	L84	L84	84	A
L31	L31	31	S	L85	L85	85	T
L32	L32	32	Y	L86	L86	86	Y
L33	L33	33	L	L87	L87	87	Y
L34	L34	34	N	L88	L88	88	C
L35	L35	35	W	L89	L89	89	Q
L36	L36	36	Y	L90	L90	90	Q
L37	L37	37	Q	L91	L91	91	S
L38	L38	38	Q	L92	L92	92	Y
L39	L39	39	K	L93	L93	93	S
L40	L40	40	P	L94	L94	94	T
L41	L41	41	G	L95	L95	95	P
L42	L42	42	K	L96	L96	96	L
L43	L43	43	A	L97	L97	97	T
L44	L44	44	P	L98	L98	98	F
L45	L45	45	K	L99	L99	99	G
L46	L46	46	L	L100	L100	100	Q
L47	L47	47	L	L101	L101	101	G
L48	L48	48	I	L102	L102	102	T
L49	L49	49	Y	L103	L103	103	K
L50	L50	50	A	L104	L104	104	V
L51	L51	51	A	L105	L105	105	E
L52	L52	52	S	L106	L106	106	I
L53	L53	53	S	L107	L107	107	K
L54	L54	54	L	L108	L108	108	R

[0240] В некоторых вариантах осуществления L содержит непрерывную аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной области иммуноглобулина (Ig).

[0241] В некоторых вариантах осуществления шарнирная область Ig получена из шарнирной области человеческого или нечеловеческого Ig. Примеры шарнирных областей нечеловеческого Ig представляют собой шарнирные области Ig мыши, крысы, собаки, курицы и приматов, таких как обезьяны.

[0242] В некоторых вариантах осуществления шарнирная область Ig получена из шарнирной области Ig человека.

[0243] В некоторых вариантах осуществления шарнирная область Ig человека представляет собой изотип IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA или IgE.

[0244] Шарнирная область Ig в целом определена как включающая остаток 216 и заканчивающийся в остатке 230 IgG человека, причем нумерация остатков соответствует каталогу ЕС. В некоторых случаях в шарнир также может быть включена нижняя шарнирная область от около остатка 231 до около остатка 237. Таким образом, шарнирная область IgG1 может содержать аминокислотную последовательность EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 63), или когда включен нижний шарнир, - аминокислотную последовательность EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 64). Шарнирные области других изотипов Ig хорошо известны, и их аминокислотные последовательности могут быть получены, например, на веб-сайте ImMunoGeneTics. Например, шарнир IgG2, содержит аминокислотную последовательность ERKCCVECPCPPCP (SEQ ID NO: 65).

[0245] L содержит непрерывную аминокислотную последовательность, которая «получена из» шарнирной области Ig в тех случаях, когда L содержит по меньшей мере часть аминокислотной последовательности шарнирной области Ig или по меньшей мере часть сконструированной шарнирной области Ig. Сконструированная шарнирная область Ig содержит одну или более мутаций по сравнению с шарниром Ig дикого типа. Примеры мутаций, которые могут быть введены, представляют собой замены остатков Cys для уменьшения количества Cys в L на один или два, замены остатков Pro или любых консервативных модификаций, таких как консервативные замены.

[0246] Термин «консервативные модификации» означает модификации аминокислот, которые незначительно изменяют или влияют на характеристики связывания антитела, содержащего такие модификации аминокислот. Консервативные модификации включают замены, добавления и делеции аминокислот. Консервативные аминокислотные замены представляют собой замены, в которых аминокислота заменена аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. Классы аминокислотных остатков, имеющие аналогичные боковые цепи, четко определены и включают аминокислоты с кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту), основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин, триптофан), ароматическими боковыми цепями (например, фенилаланин, триптофан, гистидин, тирозин), алифатическими боковыми цепями (например, глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, серин, треонин), амидами (например, аспарагин, глутамин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и серосодержащими боковыми цепями (цистеин, метионин). Дополнительно любой нативный остаток в полипептиде может быть замещен аланином, согласно способу, описанному ранее как аланин-сканирующий мутагенез (MacLennan *et al.*, (1988) *Acta Physiol Scand Suppl* 643:55-67; Sasaki *et al.*, (1988) *Adv Biophys* 35:1-24).

Аминокислотные замены могут быть выполнены известными способами, например методом ПЦР-опосредованного мутагенеза (патент США № 4,683,195). Полученные варианты шарниры могут быть включены в конструкторы spFv в соответствии с настоящим описанием и испытаны на их характеристики, такие как стабильность и связывание с антигеном, с использованием известных анализов и анализов, описанных в настоящем документе.

[0247] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность C(X)_yC (**SEQ ID NO: 23**), где X представляет собой глицин (Gly), серин (Ser), пролин (Pro), аланин (Ala), аргинин (Arg), аспарагин (Asn), аспарагиновую кислоту (Asp), глутаминовую кислоту (Glu), глутамин (Gln), гистидин (His), изолейцин (Ile), лейцин (Leu), лизин (Lys), фенилаланин (Phe), треонин (Thr), триптофан (Trp) или тирозин (Tyr), а y представляет собой целое число от 1 до 3. Pro может быть включен в линкер для обеспечения жесткости. Gly может быть включен в линкер для обеспечения максимальной гибкости. Также в L может быть использована любая другая аминокислота, кроме Cys и Met.

[0248] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность C(X)_yC (**SEQ ID NO: 24**), где X представляет собой Gly, Ser или Pro, а y представляет собой целое число от 1 до 3.

[0249] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность CPC, CGC, CSC, CPPC (**SEQ ID NO: 1**), CGPC (**SEQ ID NO: 28**), CPGC (**SEQ ID NO: 29**), CGGC (**SEQ ID NO: 30**), CSPG (**SEQ ID NO: 31**), CPSC (**SEQ ID NO: 32**), CSSC (**SEQ ID NO: 33**), CGSC (**SEQ ID NO: 34**), CSGC (**SEQ ID NO: 35**), CPPPC (**SEQ ID NO: 36**), CGPPC (**SEQ ID NO: 37**), CPGPC (**SEQ ID NO: 38**), CPPGC (**SEQ ID NO: 39**), CGGPC (**SEQ ID NO: 40**), CPGGC (**SEQ ID NO: 41**), CGGGC (**SEQ ID NO: 42**), CSPPC (**SEQ ID NO: 43**), CPSPC (**SEQ ID NO: 44**), CPPSC (**SEQ ID NO: 45**), CSSPC (**SEQ ID NO: 46**), CPSSC (**SEQ ID NO: 47**), CSSSC (**SEQ ID NO: 48**), CGSPC (**SEQ ID NO: 49**), CPGSC (**SEQ ID NO: 50**), CSGPC (**SEQ ID NO: 51**) или CPSGC (**SEQ ID NO: 52**).

[0250] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность CPC.

[0251] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность CGC.

[0252] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность CSC.

[0253] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность CPPC (**SEQ ID NO: 1**).

[0254] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность CGPC (**SEQ ID NO: 28**).

[0255] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность CPGC (**SEQ ID NO: 29**).

[0256] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную

последовательность CPGSC (**SEQ ID NO: 50**).

[0277] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность CSGPC (**SEQ ID NO: 51**).

[0278] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность CPSGC (**SEQ ID NO: 52**).

[0279] В некоторых вариантах осуществления L содержит от около 14 до около 19 аминокислот.

[0280] В некоторых вариантах осуществления L содержит около 14 аминокислот.

[0281] В некоторых вариантах осуществления L содержит около 15 аминокислот.

[0282] В некоторых вариантах осуществления L содержит около 16 аминокислот.

[0283] В некоторых вариантах осуществления L содержит около 17 аминокислот.

[0284] В некоторых вариантах осуществления L содержит около 18 аминокислот.

[0285] В некоторых вариантах осуществления L содержит около 19 аминокислот.

[0286] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность $(X)_mC(X)_yC(X)_n$ (**SEQ ID NO: 25**), где X представляет собой Gly, Ser, Pro, Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Thr, Trp или Tyr, m представляет собой целое число от 6 до 9, y представляет собой целое число от 1 до 3, а n представляет собой целое число от 4 до 6.

[0287] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность $(X)_mC(X)_yC(X)_n$ (**SEQ ID NO: 26**), где X представляет собой Gly, Ser, Pro, Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Thr или Tyr, m представляет собой целое число от 6 до 9, y представляет собой целое число от 1 до 3, а n представляет собой целое число от 4 до 6.

[0288] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность $(X)_mC(X)_yC(X)_n$ (**SEQ ID NO: 27**); где X представляет собой Gly или Pro, m представляет собой целое число от 6 до 9, y представляет собой целое число от 1 до 3, а n представляет собой целое число от 4 до 6.

[0289] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7.

[0290] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO: 2**.

[0291] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO: 3**.

[0292] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO: 4**.

[0293] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO: 5**.

[0294] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO: 6**.

[0295] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную

последовательность **SEQ ID NO: 7**.

[0296] В некоторых вариантах осуществления spFv в соответствии с настоящим описанием находится в ориентации VL-L-VH.

[0297] В некоторых вариантах осуществления spFv в соответствии с настоящим описанием находится в ориентации VH-L-VL.

[0298] В настоящем описании также предложен scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H105;

VL содержит Cys в L42;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и

scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0299] В настоящем описании также предложен scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H105;

VL содержит Cys в L45;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и

scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0300] В настоящем описании также предложен scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H105;

VL содержит Cys в L39;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и

scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0301] В настоящем описании также предложен scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H5;

VL содержит Cys в L42;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и

scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0302] В настоящем описании также предложен scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H5;

VL содержит Cys в L45;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и

scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0303] В настоящем описании также предложен scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H5;

VL содержит Cys в L39;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и

scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0304] В настоящем описании также предложен scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H3;

VL содержит Cys в L42;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0305] В настоящем описании также предложен scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H3;

VL содержит Cys в L45;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0306] В настоящем описании также предложен scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H3;

VL содержит Cys в L39;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0307] В настоящем описании также предложен scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H43;

VL содержит Cys в L100;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0308] В настоящем описании также предложен scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H43;

VL содержит Cys в L102;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0309] В настоящем описании также предложен scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H43;

VL содержит Cys в L5;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0310] В настоящем описании также предложен scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H43;

VL содержит Cys в L3;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0311] В настоящем описании также предложен scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H40;

VL содержит Cys в L100;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0312] В настоящем описании также предложен scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H40;

VL содержит Cys в L102;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0313] В настоящем описании также предложен scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H40;

VL содержит Cys в L5;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0314] В настоящем описании также предложен scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H40;

VL содержит Cys в L3;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0315] В настоящем описании также предложен scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H46;

VL содержит Cys в L100;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0316] В настоящем описании также предложен scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H46;

VL содержит Cys в L102;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0317] В настоящем описании также предложен scFv, содержащий VH, L и VL, в

котором

VH содержит Cys в H46;

VL содержит Cys в L5;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0318] В настоящем описании также предложен scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H46;

VL содержит Cys в L3;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0319] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO: 3**.

[0320] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO: 4**.

[0321] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO: 5**.

[0322] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO: 6**.

[0323] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO: 7**.

Гетерологичные молекулы, содержащие spFv в соответствии с настоящим описанием

[0324] spFv в соответствии с настоящим описанием может быть конъюгирован со второй молекулой аналогично нестабилизированному scFv, не содержащему дисульфидных связей, как известно в данной области. Примеры вторых молекул описаны в настоящем документе и включают в себя фрагменты, увеличивающие время полувыведения, агенты для визуализации, терапевтические агенты, антитела, содержащие различные форматы и фрагменты антител, антигенсвязывающие домены, области Fc, тяжелые/легкие цепи иммуноглобулина или их фрагменты, мультиспецифические молекулы и химерные антигенные рецепторы (CAR).

[0325] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), содержащий переменную область тяжелой цепи (VH), линкер (L) и переменную область легкой цепи (VL), причем scFv содержит:

первую дисульфидную связь между цистеином (Cys) VH на структурно консервативной поверхности и первым Cys L;

вторую дисульфидную связь между Cys VL на структурно консервативной поверхности и вторым Cys L; или

первую дисульфидную связь между Cys VH на структурно консервативной

поверхности и первым Cys L, и вторую дисульфидную связь между Cys VL на структурно консервативной поверхности и вторым Cys L.

[0326] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys VH в положении каркасного остатка на структурно консервативной поверхности VH, а L содержит первый Cys L;

VL содержит Cys VL в положении каркасного остатка на структурно консервативной поверхности VL, а L содержит второй Cys L; или

VH содержит Cys VH в положении каркасного остатка на структурно консервативной поверхности VH, VL содержит Cys VL в положении каркасного остатка на структурно консервативной поверхности VL, и L содержит первый Cys L и второй Cys L, причем Cys VH и первый Cys L способны образовывать дисульфидную связь, и Cys VL и второй Cys L способны образовывать дисульфидную связь.

[0327] В некоторых вариантах осуществления расстояние между Cys VH и Cys VL составляет от около 7 Å до около 9 Å.

[0328] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H3, H5, H40, H43, H46 или H105, при этом остатки нумеруются по системе Чотиа.

[0329] В некоторых вариантах осуществления Cys VL находятся в L3, L5, L39, L42, L45, L100 или L102, где остатки нумеруются по системе Чотиа.

[0330] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H105, а Cys VL находится в L42.

[0331] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H43, а Cys VL находится в L100.

[0332] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H3, а Cys VL находится на L3.

[0333] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H3, а Cys VL находится в L5.

[0334] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H3, а Cys VL находится в L39.

[0335] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H3, а Cys VL находится в L42.

[0336] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H3, а Cys VL находится в L45.

[0337] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H3, а Cys VL находится в L100.

[0338] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H3, а Cys VL находится в L102.

[0339] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H5, а Cys VL находится в L3.

[0340] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H5, а Cys VL

находится в L5.

[0341] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H5, а Cys VL находится в L39.

[0342] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H5, а Cys VL находится в L42.

[0343] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H5, а Cys VL находится в L45.

[0344] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H5, а Cys VL находится в L100.

[0345] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H5, а Cys VL находится в L102.

[0346] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H40, а Cys VL находится в L3.

[0347] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H40, а Cys VL находится в L5.

[0348] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H40, а Cys VL находится в L39.

[0349] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H40, а Cys VL находится в L42.

[0350] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H40, а Cys VL находится в L45.

[0351] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H40, а Cys VL находится в L100.

[0352] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H40, а Cys VL находится в L102.

[0353] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H43, а Cys VL находится в L3.

[0354] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H43, а Cys VL находится в L5.

[0355] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H43, а Cys VL находится в L39.

[0356] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H43, а Cys VL находится в L42.

[0357] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H43, а Cys VL находится в L45.

[0358] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H43, а Cys VL находится в L100.

[0359] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H43, а Cys VL находится в L102.

[0360] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H46, а Cys VL

находится в L3.

[0361] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H46, а Cys VL находится в L5.

[0362] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H46, а Cys VL находится в L39.

[0363] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H46, а Cys VL находится в L42.

[0364] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H46, а Cys VL находится в L45.

[0365] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H46, а Cys VL находится в L100.

[0366] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H46, а Cys VL находится в L102.

[0367] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H105, а Cys VL находится в L3.

[0368] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H105, а Cys VL находится в L5.

[0369] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H105, а Cys VL находится в L39.

[0370] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H105, а Cys VL находится в L42.

[0371] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H105, а Cys VL находится в L45.

[0372] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H105, а Cys VL находится в L100.

[0373] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H105, а Cys VL находится в L102.

[0374] Нумерация остатков областей VH и VL по системе Чотиа.

[0375] В некоторых вариантах осуществления L содержит непрерывную аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной области иммуноглобулина (Ig).

[0376] В некоторых вариантах осуществления шарнирная область Ig получена из шарнирной области человеческого или нечеловеческого Ig. Примеры шарнирных областей нечеловеческого Ig представляют собой шарнирные области Ig мыши, крысы, собаки, курицы и приматов, таких как обезьяны.

[0377] В некоторых вариантах осуществления шарнирная область Ig получена из шарнирной области Ig человека.

[0378] В некоторых вариантах осуществления шарнирная область Ig человека представляет собой изотип IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA или IgE.

[0379] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную

последовательность $C(X)_yC$ (**SEQ ID NO: 23**), где X представляет собой Gly, Ser, Pro, Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Thr, Trp или Tyr, а y представляет собой целое число от 1 до 3. Pro может быть включен в линкер для обеспечения жесткости. Gly может быть включен в линкер для обеспечения максимальной гибкости. Также в L может быть использована любая другая аминокислота, кроме Cys и Met.

[0380] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность $C(X)_yC$ (**SEQ ID NO: 24**), где X представляет собой Gly, Ser или Pro, а y представляет собой целое число от 1 до 3.

[0381] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность CPC, CGC, CSC, CPPC (**SEQ ID NO: 1**), CGPC (**SEQ ID NO: 28**), CPGC (**SEQ ID NO: 29**), CGGC (**SEQ ID NO: 30**), CSPG (**SEQ ID NO: 31**), CPSC (**SEQ ID NO: 32**), CSSC (**SEQ ID NO: 33**), CGSC (**SEQ ID NO: 34**), CSGC (**SEQ ID NO: 35**), CPPPC (**SEQ ID NO: 36**), CGPPC (**SEQ ID NO: 37**), CPGPC (**SEQ ID NO: 38**), CPPGC (**SEQ ID NO: 39**), CGGPC (**SEQ ID NO: 40**), CPGGC (**SEQ ID NO: 41**), CGGGC (**SEQ ID NO: 42**), CSPPC (**SEQ ID NO: 43**), CPSPC (**SEQ ID NO: 44**), CPPSC (**SEQ ID NO: 45**), CSSPC (**SEQ ID NO: 46**), CPSSC (**SEQ ID NO: 47**), CSSSC (**SEQ ID NO: 48**), CGSPC (**SEQ ID NO: 49**), CPGSC (**SEQ ID NO: 50**), CSGPC (**SEQ ID NO: 51**) или CPSGC (**SEQ ID NO: 52**).

[0382] В некоторых вариантах осуществления L содержит от около 14 до около 19 аминокислот.

[0383] В некоторых вариантах осуществления L содержит около 14 аминокислот.

[0384] В некоторых вариантах осуществления L содержит около 15 аминокислот.

[0385] В некоторых вариантах осуществления L содержит около 16 аминокислот.

[0386] В некоторых вариантах осуществления L содержит около 17 аминокислот.

[0387] В некоторых вариантах осуществления L содержит около 18 аминокислот.

[0388] В некоторых вариантах осуществления L содержит около 19 аминокислот.

[0389] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность $(X)_mC(X)_yC(X)_n$ (**SEQ ID NO: 25**); где X представляет собой Gly, Ser, Pro, Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Thr, Trp или Tyr, m представляет собой целое число от 6 до 9, y представляет собой целое число от 1 до 3, а n представляет собой целое число от 4 до 6.

[0390] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность $(X)_mC(X)_yC(X)_n$ (**SEQ ID NO: 26**); где X представляет собой Gly, Ser или Pro, Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Thr или Tyr, m представляет собой целое число от 6 до 9, y представляет собой целое число от 1 до 3, а n представляет собой целое число от 4 до 6.

[0391] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность $(X)_mC(X)_yC(X)_n$ (**SEQ ID NO: 27**); где X представляет собой Gly или Pro, m представляет собой целое число от 6 до 9, y представляет собой целое число от 1 до 3, а n представляет собой целое число от 4 до 6.

[0392] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7.

[0393] В некоторых вариантах осуществления spFv в соответствии с настоящим описанием находится в ориентации VL-L-VH.

[0394] В некоторых вариантах осуществления spFv в соответствии с настоящим описанием находится в ориентации VH-L-VL.

[0395] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys в H105;

VL содержит Cys в L42;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0396] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys в H105;

VL содержит Cys в L45;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0397] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys в H105;

VL содержит Cys в L39;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0398] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys в H5;

VL содержит Cys в L42;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0399] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys в H5;

VL содержит Cys в L45;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0400] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys в H5;

VL содержит Cys в L39;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и

scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0401] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys в H3;

VL содержит Cys в L42;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0402] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys в H3;

VL содержит Cys в L45;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0403] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys в H3;

VL содержит Cys в L39;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0404] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys в H43;

VL содержит Cys в L100;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0405] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys в H43;

VL содержит Cys в L102;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0406] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys в H43;

VL содержит Cys в L5;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0407] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys в H43;

VL содержит Cys в L3;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0408] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys в H40;

VL содержит Cys в L100;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0409] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys в H40;

VL содержит Cys в L102;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0410] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys в H40;

VL содержит Cys в L5;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0411] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys в H40;

VL содержит Cys в L3;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0412] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys в H46;

VL содержит Cys в L100;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0413] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys в H46;

VL содержит Cys в L102;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0414] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула,

содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys в H46;

VL содержит Cys в L5;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0415] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys в H46;

VL содержит Cys в L3;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0416] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO: 3**.

[0417] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO: 4**.

[0418] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO: 5**.

[0419] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO: 6**.

[0420] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO: 7**.

[0421] В некоторых вариантах осуществления scFv в соответствии с настоящим описанием конъюгирован со вторым белком, полинуклеотидом, терапевтическим агентом, цитотоксическим агентом или обнаруживаемой меткой.

[0422] В некоторых вариантах осуществления второй белок представляет собой фрагмент, увеличивающий время полувыведения.

[0423] В некоторых вариантах осуществления второй белок представляет собой антитело или его фрагмент.

[0424] В некоторых вариантах осуществления второй белок представляет собой антигенсвязывающий фрагмент.

[0425] В некоторых вариантах осуществления второй белок представляет собой терапевтическую молекулу.

Гетерологичные молекулы, содержащие spFv в соответствии с настоящим описанием и фрагмент, увеличивающий время полувыведения

[0426] В некоторых вариантах осуществления spFv в соответствии с настоящим описанием конъюгирован с фрагментом, увеличивающим время полувыведения.

[0427] Пример фрагмента, увеличивающего время полувыведения, представляет собой иммуноглобулин (Ig), фрагмент Ig, константную область Ig, фрагмент константной области Ig, область Fc, трансферрин, альбумин, варианты альбумина, альбумин-связывающий домен или полиэтиленгликоль. Аминокислотные последовательности Ig

человека хорошо известны и включают IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA и IgE.

[0428] В некоторых вариантах осуществления spFv в соответствии с настоящим описанием конъюгирован с Ig или фрагментом Ig.

[0429] В некоторых вариантах осуществления spFv в соответствии с настоящим описанием конъюгирован с областью Fc.

[0430] В некоторых вариантах осуществления spFv в соответствии с настоящим описанием конъюгирован с трансферрином.

[0431] В некоторых вариантах осуществления spFv в соответствии с настоящим описанием конъюгирован с альбумином.

[0432] В некоторых вариантах осуществления spFv в соответствии с настоящим описанием конъюгирован с альбумином связывающего белка.

[0433] В некоторых вариантах осуществления spFv в соответствии с настоящим описанием конъюгирован с полиэтиленгликолем (PEG). Примеры молекул PEG представляют собой PEG5000 или PEG20000.

[0434] В некоторых вариантах осуществления изобретения spFv в соответствии с настоящим описанием конъюгирован с жирной кислотой или сложным эфиром жирной кислоты. Примеры жирных кислот и сложных эфиров жирных кислот представляют собой лаурат, мирилат, стеарат, арахидат, бегенат, олеат, арахидонат, октандиокарбоновую кислоту, тетрадекандиоковую кислоту, октадекандиоковую кислоту, докозандиоковую кислоту и т. п., полилизин, октан, углеводы (декстран, целлюлозу, олиго- или полисахариды) для желаемых свойств.

[0435] Фрагмент, увеличивающий время полувыведения, может представлять собой прямое слияние с spFv в соответствии с настоящим описанием и может быть получен с помощью стандартных методов клонирования и экспрессии. В альтернативном варианте осуществления для прикрепления фрагментов к полученным путем рекомбинации spFv в соответствии с настоящим описанием можно использовать хорошо известные способы химического связывания.

Гетерологичные молекулы, содержащие spFv в соответствии с настоящим описанием, и цитотоксический агент или обнаруживаемую метку

[0436] В настоящем описании также предложена гетерологичная молекула, содержащая spFv в соответствии с настоящим описанием, в которой spFv в соответствии с настоящим описанием конъюгирован со вторым белком, полинуклеотидом, терапевтическим агентом, цитотоксическим агентом или обнаруживаемой меткой.

[0437] Гетерологичную молекулу, содержащую spFv в соответствии с настоящим описанием, можно использовать для управления терапевтическими средствами, опосредованным уничтожением, визуализацией, идентификацией или очисткой клеток, которые экспрессируют антиген, с которым связывается spFv, *in vitro* or *in vivo*.

[0438] В некоторых вариантах осуществления обнаруживаемая метка также является цитотоксическим агентом.

[0439] Обнаруживаемые метки включают композиции, которые при

конъюгировании с $spFv$ в соответствии с настоящим описанием делают его обнаружимым посредством спектроскопических, фотохимических, биохимических, иммунохимических или химических средств.

[0440] Примеры обнаруживаемых меток включают в себя радиоактивные изотопы, магнитные гранулы, металлические гранулы, коллоидные частицы, флуоресцентные красители, электроноплотные реагенты, ферменты (например, широко используемые в иммуноферментном анализе (ИФА)), биотин, дигоксигенин, гаптены, люминисцентные молекулы, хемилюминесцентные молекулы, флуорохромы, флуорофоры, гасящие флуоресценцию агенты, цветные молекулы, радиоактивные изотопы, сцинтиллирующие средства, авидин, стрептавидин, белок А, белок G, антитела или их фрагменты, полигистидин, Ni^{2+} , Flag-маркеры, тус-маркеры, тяжелые металлы, ферменты, щелочная фосфатаза, пероксидаза, люцифераза, доноры/акцепторы электронов, сложные эфиры акридиния и колориметрические субстраты.

[0441] Обнаруживаемая метка может испускать сигнал спонтанно, например, когда обнаруживаемая метка представляет собой радиоактивный изотоп. В других случаях обнаруживаемая метка испускает сигнал в результате стимуляции внешним полем.

[0442] Примерами радиоактивных изотопов могут быть γ -излучающие, Оже-электрон-излучающие, β -излучающие, альфа-излучающие или позитрон-излучающие радиоактивные изотопы. К примерам радиоактивных изотопов относятся 3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{15}N , ^{18}F , ^{19}F , ^{55}Co , ^{57}Co , ^{60}Co , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{68}Ga , ^{72}As , ^{75}Br , ^{86}Y , ^{89}Zr , ^{90}Sr , ^{94m}Tc , ^{99m}Tc , ^{115}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{211}At , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{223}Ra , ^{226}Ra , ^{225}Ac и ^{227}Ac .

[0443] Иллюстративные атомы металлов представляют собой металлы с атомным числом более 20, такие как атомы кальция, скандия, титана, ванадия, хрома, марганца, железа, кобальта, никеля, меди, цинка, галлия, германия, мышьяка, селена, брома, криптона, рубидия, стронция, иттрия, циркония, ниобия, молибдена, технеция, рутения, родия, палладия, серебра, кадмия, индия, олова, сурьмы, теллурия, йода, ксенона, цезия, бария, лантана, гафния, тантала, вольфрама, рения, осмия, иридия, платины, золота, ртути, таллия, свинца, висмута, франция, радия, актиния, церия, празеодима, неодима, прометия, самария, европия, гадолиния, тербия, диспрозия, гольмия, эрбия, тулия, иттербия, лютеция, тория, протактиния, урана, нептуния, плутония, америция, кюрия, берклия, калифорния, эйнштейния, фермия, менделевия, нобелия или лоуренсия.

[0444] В некоторых вариантах осуществления атомы металла могут представлять собой щелочноземельные металлы с атомным номером более двадцати.

[0445] В некоторых вариантах осуществления атомы металлов могут представлять собой лантаниды.

[0446] В некоторых вариантах осуществления атомы металлов могут представлять собой актиниды.

[0447] В некоторых вариантах осуществления атомы металла могут представлять собой переходные металлы.

[0448] В некоторых вариантах осуществления атомы металла могут представлять

собой постпереходные металлы.

[0449] В некоторых вариантах осуществления атомы металла могут представлять собой атомы золота, атомы висмута, атомы тантала и атомы гадолиния.

[0450] В некоторых вариантах осуществления атомы металла могут представлять собой металлы с атомным номером от 53 (т. е. йод) до 83 (т. е. висмут).

[0451] В некоторых вариантах осуществления атомы металла могут представлять собой атомы, приемлемые для магнитно-резонансной томографии.

[0452] Атомы металлов могут представлять собой ионы металлов со степенью окисления +1, +2, +3, например Ba^{2+} , Bi^{3+} , Cs^{+} , Ca^{2+} , Cr^{2+} , Cr^{3+} , Cr^{6+} , Co^{2+} , Co^{3+} , Cu^{+} , Cu^{2+} , Cu^{3+} , Ga^{3+} , Gd^{3+} , Au^{+} , Au^{3+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , F^{3+} , Pb^{2+} , Mn^{2+} , Mn^{3+} , Mn^{4+} , Mn^{7+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Ni^{3+} , Ag^{+} , Sr^{2+} , Sn^{2+} , Sn^{4+} и Zn^{2+} . Атомы металлов могут включать в себя оксид металла, такой как оксид железа, оксид марганца или оксид гадолиния.

[0453] Приемлемые красители включают в себя любые присутствующие на рынке красители, такие как, например, 5(6)-карбоксихлорофлуоресцеин, малеимид IRDye 680RD или IRDye 800CW, красители на основе комплекса рутений/полипиридил и т. п.

[0454] К приемлемым флуорофорам относятся флуоресцеина изотиоцианат (FITC), флуоресцеина тиосемикарбазид, родамин, Texas Red, красители CyDye (например, Cy3, Cy5, Cy5.5), красители Alexa Fluor (например, Alexa488, Alexa555, Alexa594; Alexa647), флуоресцентные красители ближнего ИК-диапазона (NIR) (700-900 нм) и карбоцианиновые и аминотирильные красители.

[0455] Гетерологичная молекула, содержащая scFv в соответствии с настоящим описанием, конъюгированная с обнаруживаемой меткой, может быть использована в качестве агента визуализации.

[0456] В некоторых вариантах осуществления цитотоксический агент представляет собой химиотерапевтический препарат, лекарственное средство, ингибирующий рост агент, токсин (например, токсин бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, обладающий ферментативной активностью, или его фрагменты) или радиоактивный изотоп (т. е. радиоактивный конъюгат).

[0457] В некоторых вариантах осуществления цитотоксический агент представляет собой дауномицин, доксорубицин, метотрексат, виндезин, бактериальные токсины, такие как дифтерийный токсин, рицин, гелданамицин, мейтансиноиды или калихеамицин. Цитотоксический агент может индуцировать цитотоксический и цитостатический эффекты посредством механизмов, включающих связывание с тубулином, связывание с ДНК или ингибирование топоизомеразы.

[0458] В некоторых вариантах осуществления цитотоксический агент представляет собой токсин с ферментативной активностью, такой как А-цепь дифтерийного токсина, несвязывающие активные фрагменты дифтерийного токсина, А-цепь экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), А-цепь рицина, А-цепь абрина, А-цепь модецина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, диантиновые белки, белки *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII и PAPI-S), ингибитор *momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *sapaonaria officinali*,

гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трикотецены.

[0459] В некоторых вариантах осуществления цитотоксический агент представляет собой радионуклид, такой как ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y и ^{186}Re .

[0460] В некоторых вариантах осуществления цитотоксический агент представляет собой долостатины или пептидные аналоги и производные долостатина, ауристатин или монометилауристатин фенилаланин. Примеры молекул описаны в патентах США № 5,635,483 и № 5,780,588. Показано, что долостатины и ауристатины блокируют динамику микротрубочек, гидролиз ГТФ и деление ядра и клетки и имеют противораковую и противогрибковую активность. Функциональная группа лекарственного средства долостатина или ауристатина может быть присоединена к антители по изобретению, посредством N (амино) конца или C (карбоксыльного) конца функциональной группы пептидного лекарственного средства (см., например, WO02/088172) или посредством любого цистеина, искусственно внедренного в белок.

[0461] Конъюгация с обнаруживаемой меткой может быть выполнена с использованием известных способов.

[0462] В некоторых вариантах осуществления обнаруживаемая метка находится в комплексе с хелатирующим агентом.

[0463] В некоторых вариантах осуществления обнаруживаемая метка конъюгирована с spFv в соответствии с настоящим описанием посредством линкера.

[0464] Обнаруживаемая метка или цитотоксический фрагмент могут быть связаны прямо или косвенно с spFv в соответствии с настоящим описанием с использованием известных способов. К подходящим линкерам, известным в данной области, относятся, например, простетические группы, нефенольные линкеры (производные N-сукцинимидилбензоатов; додекарборат), хелатирующие группы как макролитических, так и ациклических хелаторов, например производные 1,4,7,10-тетраазаацклододекан-1,4,7,10-тетрауксусной кислоты (DOTA), производные диэтилентриаминпентауксусной кислоты (DTPA), производные S-2-(4-изотиоцианатобензил)-1,4,7-триазаацклононан-1,4,7-триуксусной кислоты (NOTA) и производные 1,4,8,11-тетраазаацклододекан-1,4,8,11-тетрауксусной кислоты (TETA), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиол) пропионат (SPDP), иминотиолан (IT), дифункциональные производные сложных имидоэфиров (такие как диметиладипимидат HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидил суберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидные соединения (такие как бис-(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(п-диазонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол 2,6-диизоцианат) и бис-активные фтористые соединения (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол) и другие хелатирующие группы. Подходящие пептидные линкеры хорошо известны.

Гетерологичные молекулы, содержащие spFv в соответствии с настоящим описанием и константную область иммуноглобулина (Ig) или их фрагменты

[0465] SpFv в соответствии с настоящим описанием может быть конъюгирован с константной областью Ig или фрагментом константной области Ig для придания

антителоподобных свойств, включая эффекторные функции Fc связывания C1q, комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC), связывание рецептора Fc, антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC), фагоцитоз или угнетение рецепторов клеточной поверхности (например, рецептор В-клеток; BCR). Константная область Ig или фрагмент константной области Ig также функционируют в качестве фрагмента, увеличивающий время полувыведения, как описано в настоящем документе. spFv в соответствии с настоящим описанием также может быть сконструирован в полноразмерные антитела с использованием стандартных способов. Полноразмерные антитела, содержащие spFv настоящего изобретения, могут быть дополнительно сконструированы, как описано в настоящем документе.

[0466] Константная область тяжелой цепи иммуноглобулина состоит из субдоменов CH1, шарнира, CH2 и CH3. Домен CH1 охватывает остатки 118-215, домен CH2 - остатки 231-340 и домен CH3 - остатки 341-447 на тяжелой цепи, причем нумерация остатков соответствует каталогу ЕС. В некоторых случаях остаток 341 называется остатком домена CH2. Шарнир по существу определен как включающий остаток 216 и заканчивающийся остатком 230 IgG1 человека, но может также включать в себя нижнюю шарнирную область от остатка примерно 231 до остатка примерно 237, как описано в настоящем документе. Область Fc Ig содержит по меньшей мере CH2 и CH3 домены константной области Ig и, следовательно, содержит по меньшей мере область от около 231 до 447 константной области тяжелой цепи Ig.

[0467] В изобретении также предложен spFv в соответствии с настоящим описанием, конъюгированный с константной областью иммуноглобулина (Ig) или фрагментом константной области Ig.

[0468] В некоторых вариантах осуществления константная область Ig представляет собой константную область тяжелой цепи

[0469] В некоторых вариантах осуществления константная область Ig представляет собой константную область легкой цепи.

[0470] В некоторых вариантах осуществления фрагмент константной области Ig содержит область Fc.

[0471] В некоторых вариантах осуществления фрагмент константной области Ig содержит домен CH2.

[0472] В некоторых вариантах осуществления фрагмент константной области Ig содержит домен CH3.

[0473] В некоторых вариантах осуществления фрагмент константной области Ig содержит домен CH2 и домен CH3.

[0474] В некоторых вариантах осуществления фрагмент константной области Ig содержит по меньшей мере часть шарнира, домена CH2 и домена CH3. Часть шарнира относится к одному или более аминокислотным остаткам шарнира Ig.

[0475] В некоторых вариантах осуществления фрагмент константной области Ig содержит шарнир, домен CH2 и домен CH3.

[0476] В некоторых вариантах осуществления spFv в соответствии с настоящим описанием конъюгирован с N-концом константной области Ig или фрагментом константной области Ig.

[0477] В некоторых вариантах осуществления spFv в соответствии с настоящим описанием конъюгирован с C-концом константной области Ig или фрагментом константной области Ig.

[0478] spFv в соответствии с настоящим описанием, конъюгированный с константной областью Ig или фрагментом константной области Ig, можно оценить на их функциональные возможности с использованием нескольких известных анализов. Связывание с целевым антигеном можно оценить с использованием способов, описанных в настоящем документе. Измененные свойства, связанные с константным доменом Ig, или фрагментом константной области Ig, таким как Fc-область, можно анализировать в анализах связывания рецептора Fc с использованием растворимых форм рецепторов, таких как FcγRI, FcγRII, FcγRIII или FcRn, или с использованием клеточных анализов, измеряющих, например, ADCC, CDC или ADCP.

[0479] ADCC можно оценить с помощью анализа *in vitro* с использованием клеток, которые экспрессируют антиген, с которым связывается spFv в соответствии с настоящим описанием, в качестве клеток-мишеней и NK-клеток в качестве эффекторных клеток. Цитолиз может быть обнаружен по высвобождению из лизированных клеток метки (например, радиоактивных субстратов, флуоресцентных красителей или природных внутриклеточных белков). В примере анализа клетки-мишени применяли в соотношении 1 клетка-мишень на 4 эффекторные клетки. Клетки-мишени предварительно маркируют BATDA и объединяют с эффекторными клетками и исследуемым антителом. Пробы инкубируют в течение 2 часов и измеряют лизис клеток путем измерения высвобождения BATDA в супернатант. Данные нормализуют по максимальной цитотоксичности с 0,67% Triton X-100 (Sigma Aldrich) и минимальному контролю, который определяют по высвобождению BATDA из клеток-мишеней в отсутствие любого антитела.

[0480] ADCP можно оценить с помощью моноцитарных макрофагов в качестве эффекторных клеток и любой клетки, которая экспрессирует антиген, с которым связывается spFv настоящего изобретения, в качестве клеток-мишеней, которые сконструированы с возможностью экспрессии GFP или другой меченой молекулы. В примере анализа соотношение эффекторных клеток и клеток-мишеней может составлять, например, 4 : 1. Эффекторные клетки можно инкубировать с клетками-мишенями в течение 4 часов с антителом по изобретению или без него. После инкубации клетки можно отделять с помощью аккутазы. Идентификацию макрофагов можно проводить с помощью антител к CD11b и к CD14, связанных с флуоресцентной меткой, а процентное значение фагоцитоза можно определять на основании % флуоресцентного GFP в макрофагах CD11⁺CD14⁺ с помощью стандартных способов.

[0481] CDC для клеток можно измерять, например, посредством высевания клеток Дауди при 1×10^5 клеток/лунка (50 мкл/лунка) в RPMI-B (RPMI с добавлением 1% BSA),

добавления 50 мкл исследуемого белка в лунки до конечной концентрации в диапазоне 0-100 мкг/мл, инкубирования реакционной смеси в течение 15 мин при комнатной температуре, добавления 11 мкл объединенной человеческой сыворотки в лунки и инкубирования реакционной смеси в течение 45 мин при 37 °С. Процентное значение (%) лизированных клеток можно определять как % окрашенных пропидий йодидом клеток в анализе FACS с помощью стандартных способов.

Гетерологичные молекулы, содержащие spFv в соответствии с настоящим описанием и химерный антигенный рецептор (CAR) или его фрагмент

[0482] spFv в соответствии с настоящим описанием может быть конъюгирован с химерным антигенным рецептором (CAR) или фрагментом CAR. Таким образом, CAR, содержащий spFv в соответствии с настоящим описанием, может быть моноспецифическим или мультиспецифическим, содержащим в качестве внеклеточного домена одну или более молекул scFv в соответствии с настоящим описанием.

[0483] Химерные антигенные рецепторы (CAR) представляют собой рецепторы, сконструированные методами геной инженерии. Эти сконструированные рецепторы могут быть легко вставлены в иммунные клетки, включая Т-клетки, и экспрессированы ими в соответствии с методиками, известными в данной области. С помощью CAR один рецептор может быть запрограммирован как на распознавание специфического антигена, так и на активацию иммунной клетки для атаки и разрушения клетки, несущей этот антиген, при связывании с этим антигеном. Если эти антигены существуют на клетках-мишенях, иммунная клетка, которая экспрессирует CAR, может нацеливаться на клетку-мишень и уничтожать ее.

[0484] CAR, как правило, содержит внеклеточный домен, который связывается с антигеном, и необязательный линкер, трансмембранный домен и цитозольный домен, содержащий костимулирующий домен и/или сигнальный домен.

[0485] Внеклеточный домен в составе CAR может содержать любой полипептид, который связывается с нужным антигеном, таким как scFv в соответствии с настоящим описанием. CAR также могут быть сконструированы с возможностью связывания с двумя или более нужными антигенами, которые могут быть расположены в тандеме и разделены линкерными последовательностями. Например, один или более scFvs в соответствии с настоящим описанием, доменных антител, антител IIama VHH или других фрагментов антител, содержащих только VH, могут быть расположены в тандеме посредством линкера для получения биспецифических или мультиспецифических CAR.

[0486] Трансмембранный домен CAR может быть получен из трансмембранного домена CD8, альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD18), ICOS (CD278), 4-1 BB (CD137), 4-1 BBL, GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRFI), CD160, CD19, IL2R-бета, IL2R-гамма, IL7R а, ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CDI Id, ITGAE, CD103, ITGAL, CDI Ia, LFA-1, ITGAM, CDI Ib, ITGAX, CDI

Ic, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D и/или NKG2C.

[0487] Внутриклеточный костимулирующий домен CAR может быть получен из внутриклеточных доменов одной или более костимулирующих молекул. Костимулирующие молекулы хорошо известны как молекулы клеточной поверхности, отличные от антигенных рецепторов или Fc-рецепторов, которые обеспечивают второй сигнал, необходимый для эффективной активации и функционирования Т-лимфоцитов при связывании с антигеном. Примерами костимулирующих доменов, которые можно использовать в CAR, являются внутриклеточные домены 4-1BB, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM и ZAP70.

[0488] Внутриклеточный сигнальный домен CAR может быть получен из сигнальных доменов рецепторов, например рецепторов CD3 ζ CD3 ϵ , CD22, CD79a, CD66d или CD39. **«Внутриклеточный сигнальный домен»** относится к части полипептида CAR, которая участвует в передаче сообщения об эффективном связывании CAR с целевым антигеном во внутреннюю часть иммунной эффекторной клетки для запуска функции эффекторной клетки, например, активации, выработки цитокинов, пролиферации и цитотоксической активности, включая высвобождение цитотоксических факторов в клетку-мишень, связанную с CAR, или других клеточных ответов, запускаемых после связывания антигена с внеклеточным доменом CAR.

[0489] Необязательный линкер в CAR, расположенный между внеклеточным доменом и трансмембранным доменом, может представлять собой полипептид длиной от около 2 до около 100 аминокислот. Линкер может включать в себя гибкие остатки, такие как глицин и серин, или состоять из них, так что смежные домены белка могут свободно перемещаться относительно друг друга. Можно применять более длинные линкеры, если желательно обеспечить, чтобы два смежных домена не создавали стерических помех друг для друга. Линкеры могут быть расщепляемыми или нерасщепляемыми. Примеры расщепляемых линкеров включают в себя 2A.

[0490] Пример CAR содержит scFv в соответствии с настоящим описанием, трансмембранный домен CD8 и сигнальный домен CD3 ζ . Другой пример CAR содержит scFv в соответствии с настоящим описанием, трансмембранный домен CD8 или CD28, костимулирующий домен CD28, 41BB или OX40 и сигнальный домен CD3 ζ .

[0491] CAR получают с помощью стандартных методов молекулярной биологии.

[0492] SpFv в соответствии с настоящим описанием может быть конъюгирован непосредственно со второй молекулой или посредством линкера. Примеры линкеров включают в себя части шарнирной области иммуноглобулина, CL или CH1, полученные из

любого изотипа тяжелой или легкой цепи иммуноглобулина, богатых Gly линкеров, линкеров, содержащих Gly и Ala, линкеров, содержащих Ala и Ser, и линкеров, содержащих Pro. Примеры аминокислот, которые могут быть включены в линкер, представляют собой Gly, Ser Pro, Thr, Glu, Lys, Arg, Ile, Leu и His. В альтернативном варианте осуществления различные небелковые полимеры, включая полиэтиленгликоль (PEG), полипропиленгликоль, полиоксиалкилены или сополимеры полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля, могут найти применение в качестве линкеров. Примеры линкеров описаны, например, в международной патентной публикации. № WO2019/060695.

[0493] В некоторых вариантах осуществления гетерологичная молекула является моноспецифической.

[0494] В некоторых вариантах осуществления гетерологичная молекула является мультиспецифической.

[0495] В некоторых вариантах осуществления гетерологичная молекула является биспецифической.

[0496] В некоторых вариантах осуществления гетерологичная молекула является триспецифической.

[0497] В некоторых вариантах осуществления гетерологичная молекула является тетраспецифической.

Мультиспецифические молекулы, содержащие spFv в соответствии с настоящим описанием

[0498] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий вариабельную область тяжелой цепи (VH), линкер (L) и вариабельную область легкой цепи (VL), причем scFv содержит:

первую дисульфидную связь между цистеином (Cys) VH на структурно консервативной поверхности и первым Cys L;

вторую дисульфидную связь между Cys VL на структурно консервативной поверхности и вторым Cys L; или

первую дисульфидную связь между Cys VH на структурно консервативной поверхности и первым Cys L, и вторую дисульфидную связь между Cys VL на структурно консервативной поверхности и вторым Cys L.

[0499] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys VH в положении каркасного остатка на структурно консервативной поверхности VH, а L содержит первый Cys L;

VL содержит Cys VL в положении каркасного остатка на структурно консервативной поверхности VL, а L содержит второй Cys L; или

VH содержит Cys VH в положении каркасного остатка на структурно консервативной поверхности VH, VL содержит Cys VL в положении каркасного остатка на структурно консервативной поверхности VL, и L содержит первый Cys L и второй Cys L,

причем Cys VH и первый Cys L способны образовывать дисульфидную связь, и Cys VL и второй Cys L способны образовывать дисульфидную связь.

[0500] В некоторых вариантах осуществления расстояние между Cys VH и Cys VL составляет от около 7 Å до около 9 Å.

[0501] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H3, H5, H40, H43, H46 или H105, при этом остатки нумеруются по системе Чотиа.

[0502] В некоторых вариантах осуществления Cys VL находятся в L3, L5, L39, L42, L45, L100 или L102, где остатки нумеруются по системе Чотиа.

[0503] В некоторых вариантах осуществления

Cys VH находится в H105, а Cys VL находится в L42;

Cys VH находится в H43, а Cys VL находится в L100;

Cys VH находится в H3, а Cys VL находится в L3;

Cys VH находится в H3, а Cys VL находится в L5;

Cys VH находится в H3, а Cys VL находится в L39;

Cys VH находится в H3, а Cys VL находится в L42;

Cys VH находится в H3, а Cys VL находится в L45;

Cys VH находится в H3, а Cys VL находится в L100;

Cys VH находится в H3, а Cys VL находится в L102;

Cys VH находится в H5, а Cys VL находится в L3;

Cys VH находится в H5, а Cys VL находится в L5;

Cys VH находится в H5, а Cys VL находится в L39;

Cys VH находится в H5, а Cys VL находится в L42;

Cys VH находится в H5, а Cys VL находится в L45;

Cys VH находится в H5, а Cys VL находится в L100;

Cys VH находится в H5, а Cys VL находится в L102;

Cys VH находится в H40, а Cys VL находится в L3;

Cys VH находится в H40, а Cys VL находится в L5;

Cys VH находится в H40, а Cys VL находится в L39;

Cys VH находится в H40, а Cys VL находится в L42;

Cys VH находится в H40, а Cys VL находится в L45;

Cys VH находится в H40, а Cys VL находится в L100;

Cys VH находится в H40, а Cys VL находится в L102;

Cys VH находится в H43, а Cys VL находится в L3;

Cys VH находится в H43, а Cys VL находится в L5;

Cys VH находится в H43, а Cys VL находится в L39;

Cys VH находится в H43, а Cys VL находится в L42;

Cys VH находится в H43, а Cys VL находится в L45;

Cys VH находится в H43, а Cys VL находится в L102;

Cys VH находится в H46, а Cys VL находится в L3;

Cys VH находится в H46, а Cys VL находится в L5;

Cys VH находится в H46, а Cys VL находится в L39;
 Cys VH находится в H46, а Cys VL находится в L42;
 Cys VH находится в H46, а Cys VL находится в L45;
 Cys VH находится в H46, а Cys VL находится в L100;
 Cys VH находится в H46, а Cys VL находится в L102;
 Cys VH находится в H105, а Cys VL находится в L3;
 Cys VH находится в H105, а Cys VL находится в L5;
 Cys VH находится в H105, а Cys VL находится в L39;
 Cys VH находится в H105, а Cys VL находится в L45;
 Cys VH находится в H105, а Cys VL находится в L100; или
 Cys VH находится в H105, а Cys VL находится в L102;

в настоящем документе остатки нумеруются по системе Чотиа.

[0504] В некоторых вариантах осуществления L содержит непрерывную аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной области иммуноглобулина (Ig).

[0505] В некоторых вариантах осуществления шарнирная область Ig получена из шарнирной области человеческого или нечеловеческого Ig.

[0506] В некоторых вариантах осуществления шарнирная область Ig получена из шарнирной области Ig человека.

[0507] В некоторых вариантах осуществления шарнирная область Ig человека представляет собой изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

[0508] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность C(X)_yC (**SEQ ID NO: 23**), где X представляет собой Gly, Ser, Pro, Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Thr, Trp или Tyr, а y представляет собой целое число от 1 до 3.

[0509] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность C(X)_yC (**SEQ ID NO: 24**), где X представляет собой Gly, Ser или Pro, а y представляет собой целое число от 1 до 3.

[0510] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность CPC, CGC, CSC, CPPC (**SEQ ID NO: 1**), CGPC (**SEQ ID NO: 28**), CPGC (**SEQ ID NO: 29**), CGGC (**SEQ ID NO: 30**), CSPG (**SEQ ID NO: 31**), CPSC (**SEQ ID NO: 32**), CSSC (**SEQ ID NO: 33**), CGSC (**SEQ ID NO: 34**), CSGC (**SEQ ID NO: 35**), CPPPC (**SEQ ID NO: 36**), CGPPC (**SEQ ID NO: 37**), CPGPC (**SEQ ID NO: 38**), CPPGC (**SEQ ID NO: 39**), CGGPC (**SEQ ID NO: 40**), CPGGC (**SEQ ID NO: 41**), CGGGC (**SEQ ID NO: 42**), CSPPC (**SEQ ID NO: 43**), CPSPC (**SEQ ID NO: 44**), CPPSC (**SEQ ID NO: 45**), CSSPC (**SEQ ID NO: 46**), CPSSC (**SEQ ID NO: 47**), CSSSC (**SEQ ID NO: 48**), CGSPC (**SEQ ID NO: 49**), CPGSC (**SEQ ID NO: 50**), CSGPC (**SEQ ID NO: 51**) или CPSGC (**SEQ ID NO: 52**).

[0511] В некоторых вариантах осуществления L содержит от около 14 до около 19 аминокислот, например, около 14, около 15, около 16, около 17, около 18 или около 19 аминокислот.

[0512] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность $(X)_mC(X)_yC(X)_n$ (**SEQ ID NO: 25**); где X представляет собой Gly, Ser, Pro, Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Thr, Trp или Tyr, m представляет собой целое число от 6 до 9, y представляет собой целое число от 1 до 3, а n представляет собой целое число от 4 до 6.

[0513] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность $(X)_mC(X)_yC(X)_n$ (**SEQ ID NO: 26**); где X представляет собой Gly, Ser, Pro, Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Thr или Tyr, m представляет собой целое число от 6 до 9, y представляет собой целое число от 1 до 3, а n представляет собой целое число от 4 до 6.

[0514] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность $(X)_mC(X)_yC(X)_n$ (**SEQ ID NO: 27**); где X представляет собой Gly или Pro, m представляет собой целое число от 6 до 9, y представляет собой целое число от 1 до 3, а n представляет собой целое число от 4 до 6.

[0515] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7.

[0516] В некоторых вариантах осуществления spFv в соответствии с настоящим описанием находится в ориентации VL-L-VH.

[0517] В некоторых вариантах осуществления spFv в соответствии с настоящим описанием находится в ориентации VH-L-VL.

[0518] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H105;

VL содержит Cys в L42;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0519] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H105;

VL содержит Cys в L45;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0520] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H105;

VL содержит Cys в L39;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0521] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H5;

VL содержит Cys в L42;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0522] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H5;

VL содержит Cys в L45;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0523] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H5;

VL содержит Cys в L39;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0524] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H3;

VL содержит Cys в L42;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0525] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H3;

VL содержит Cys в L45;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0526] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H3;

VL содержит Cys в L39;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0527] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H43;

VL содержит Cys в L100;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0528] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H43;

VL содержит Cys в L102;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0529] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H43;

VL содержит Cys в L5;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0530] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H43;

VL содержит Cys в L3;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0531] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H40;

VL содержит Cys в L100;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0532] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H40;

VL содержит Cys в L102;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0533] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H40;

VL содержит Cys в L5;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0534] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H40;

VL содержит Cys в L3;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0535] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H46;

VL содержит Cys в L100;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0536] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H46;

VL содержит Cys в L102;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0537] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H46;

VL содержит Cys в L5;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0538] В настоящем описании также предложена мультиспецифическая молекула, содержащая scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

VH содержит Cys в H46;

VL содержит Cys в L3;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0539] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO: 3**.

[0540] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO: 6**.

[0541] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO: 7**.

[0542] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическая молекула содержит антитело или фрагмент антитела.

[0543] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический белок содержит константную область Ig или фрагмент константной области Ig.

[0544] В некоторых вариантах осуществления константная область Ig содержит область Fc.

[0545] В некоторых вариантах осуществления константная область Ig содержит домен CH2.

[0546] В некоторых вариантах осуществления фрагмент константной области Ig содержит домен CH3.

[0547] В некоторых вариантах осуществления фрагмент константной области Ig содержит домен CH2 и домен CH3.

[0548] В некоторых вариантах осуществления фрагмент константной области Ig содержит по меньшей мере часть шарнира, домена CH2 и домена CH3.

[0549] В некоторых вариантах осуществления фрагмент константной области Ig содержит шарнир, домен CH2 и домен CH3.

[0550] В некоторых вариантах осуществления spFv в соответствии с настоящим описанием конъюгирован с N-концом константной области Ig или с N-концом фрагмента константной области Ig.

[0551] В некоторых вариантах осуществления spFv в соответствии с настоящим описанием конъюгирован с C-концом константной области Ig или с C-концом фрагмента константной области Ig.

[0552] В некоторых вариантах осуществления константная область Ig или фрагмент константной области Ig представляет собой IgG1, IgG2 и IgG3 или изотип IgG4.

[0553] В некоторых вариантах осуществления константная область Ig или фрагмент константной области Ig содержит по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к уменьшению связывания мультиспецифической молекулы с Fc γ R.

[0554] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к снижению связывания мультиспецифической молекулы с Fc γ R, выбирают из группы, состоящей из F234A/L235A, L234A/L235A, L234A/L235A/D265S, V234A/G237A/ P238S/H268A/V309L/A330S/P331S, F234A/L235A, S228P/F234A/ L235A, N297A, V234A/G237A, K214T/E233P/ L234V/L235A/G236-делеция/A327G/P331A/D365E/L358M, H268Q/V309L/A330S/P331S, S267E/L328F, L234F/L235E/D265A, L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S, S228P/F234A/L235A/G237A/P238S и S228P/F234A/L235A/G236-делеция/G237A/P238S, причем нумерация остатков соответствует каталогу ЕС.

[0555] В некоторых вариантах осуществления константная область Ig или фрагмент константной области Ig содержат по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к усилению связывания мультиспецифической молекулы с Fc γ R.

[0556] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к усилению связывания мультиспецифической молекулы с Fc γ R выбирают из группы, состоящей из S239D/I332E, S298A/E333A/K334A, F243L/R292P/Y300L, F243L/R292P/Y300L/P396L, F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L и G236A/S239D/I332E, причем нумерация остатков соответствует каталогу ЕС.

[0557] В некоторых вариантах осуществления Fc γ R представляет собой Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIB или Fc γ RIII.

[0558] В некоторых вариантах осуществления константная область Ig или фрагмент константной области Ig содержат по меньшей мере одну мутацию, которая модулирует

период полужизни мультиспецифической молекулы.

[0559] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одну мутацию, которая модулирует период полужизни мультиспецифической молекулы выбирают из группы, состоящей из H435A, P257I/N434H, D376V/N434H, M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F, T308P/N434A и H435R, причем нумерация остатков соответствует каталогу ЕС.

[0560] В некоторых вариантах осуществления константная область Ig или фрагмент константной области Ig содержит по меньшей мере одну мутацию в домене СН3.

[0561] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одну мутацию в домене СН3 выбирают из группы, состоящей из T350V, L351Y, F405A, Y407V, T366Y, T366W, F405W, T394W, T394S, Y407T, Y407A, T366S/L368A/Y407V, L351Y/F405A/Y407V, T366I/K392M/T394W, F405A/Y407V, T366L/K392M/T394W, L351Y/Y407A, T366A/K409F, L351Y/Y407A, T366V/K409F, T366A/K409F, T350V/L351Y/F405A/Y407V и T350V/T366L/K392L/T394W, причем нумерация остатков соответствует каталогу ЕС.

[0562] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическая молекула является биспецифической.

[0563] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическая молекула является триспецифической.

[0564] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическая молекула является тетраспецифической.

5.2 Получение мультиспецифических белков, которые содержат spFv в соответствии с настоящим описанием

[0565] SpFv в соответствии с настоящим описанием может быть сконструирован в мультиспецифические молекулы любого известного формата с использованием известных рекомбинантных технологий, протоколов экспрессии и очистки.

[0566] SpFv в соответствии с настоящим описанием может быть сконструирован в полноразмерные мультиспецифические антитела, имеющие одну или более мутаций в домене СН3, которые стимулируют стабильность двух полумолекул. Эти мультиспецифические антитела могут быть получены *in vitro* с использованием обмена плечами Fab или путем совместной экспрессии различных цепей. Для обмена плечами Fab *in vitro* два моноспецифических двухвалентных антитела сконструированы таким образом, чтобы иметь одну или более замен в домене СН3, антитела инкубируют вместе в восстанавливающих условиях, достаточных для того, чтобы остатки цистеина в шарнирных областях проходили изомеризацию дисульфидной связи; получая таким образом биспецифическое антитело в результате обмена плечами Fab. Условия инкубации можно оптимально возвращать к невосстанавливающим. Примерами восстанавливающих агентов, которые можно использовать, являются 2-меркаптоэтиламин (2-MEA), дитиотреитол (DTT), дитиоэритрит (DTE), глутатион, трис(2-карбоксиил)фосфин (TCEP), L-цистеин и бета-меркаптоэтанол, предпочтительно восстанавливающий агент выбирают из группы, состоящей из: 2-меркаптоэтиламина, дитиотреитола и трис(2-карбоксиил)фосфина.

Например, можно использовать инкубирование в течение по меньшей мере 90 мин при температуре по меньшей мере 20 °С в присутствии по меньшей мере 25 мМ 2-МЕА или в присутствии по меньшей мере 0,5 мМ дитиотреитола при уровне рН 5-8, например при рН=7,0 или при рН=7,4.

[0567] Мутации СНЗ, которые можно использовать, включают в себя такие технологии, как мутации «выступ во впадину» (Genentech), электростатически спариваемые мутации (Chugai, Amgen, NovoNordisk, Oncomed), сконструированное посредством обмена цепей доменное тело (SEEDbody) (EMD Serono), мутации Duobody® (Genmab) и другие асимметричные мутации (например, Zymeworks).

[0568] Мутации «выступ во впадину» описаны, например, в WO1996/027011 и включают в себя мутации на границе раздела области СНЗ, в которой аминокислоту с небольшой боковой цепью (впадина) вводят в первую область СНЗ, а аминокислоту с большой боковой цепью (выступ) вводят во вторую область СНЗ, что приводит к предпочтительному взаимодействию между первой областью СНЗ и второй областью СНЗ. Примерами мутаций в области СНЗ, образующих выступ и впадину, являются T366Y/F405A, T366W/F405W, F405W/Y407A, T394W/Y407T, T394S/Y407A, T366W/T394S, F405W/T394S и T366W/T366S_L368A_Y407V.

[0569] Образование гетеродимера тяжелой цепи можно стимулировать путем использования электростатических взаимодействий посредством замены положительно заряженных остатков в первой области СНЗ и отрицательно заряженных остатков во второй области СНЗ, как описано в US2010/0015133, US2009/0182127, US2010/028637 или US2011/0123532.

[0570] Другими асимметричными мутациями, которые можно применять для стимуляции гетеродимеризации тяжелых цепей, являются L351Y_F405A_Y407V/T394W, T366I_K392M_T394W/F405A_Y407V, T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V, L351Y_Y407A/T366A_K409F, L351Y_Y407A/T366V_K409F, Y407A/T366A_K409F, or T350V_L351Y_F405A_Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W, как описано в US2012/0149876 or US2013/0195849 (Zymeworks).

[0571] Мутации SEEDbody включают замещение выбранных остатков IgG остатками IgA для стимуляции гетеродимеризации тяжелых цепей, как описано в US20070287170.

[0572] Другие примеры мутаций, которые могут быть использованы, представляют собой R409D_K370E/D399K_E357K, S354C_T366W/Y349C_T366S_L368A_Y407V, Y349C_T366W/S354C_T366S_L368A_Y407V, T366K/L351D, L351K/Y349E, L351K/Y349D, L351K/L368E, L351Y_Y407A/T366A_K409F, L351Y_Y407A/T366V_K409F, K392D/D399K, K392D/E356K, K253E_D282K_K322D/D239K_E240K_K292D, K392D_K409D/D356K_D399K, как описано в WO2007/147901, WO 2011/143545, WO2013/157954, WO2013/096291 и US2018/0118849.

[0573] Мутации Duobody® (Genmab) описаны, например, в US9150663 и US2014/0303356 и включают в себя мутации F405L/K409R, дикого типа/F405L_R409K,

T350I_K370T_F405L/K409R, K370W/K409R, D399AFGHILMNRSTVWY/K409R,
 T366ADEFQGHILMQVY/K409R, L368ADEGHNRSTVQ/K409AGRH,
 D399FHKRQ/K409AGRH, F405IKLSTVW/K409AGRH и Y407LWQ/K409AGRH.

[0574] Дополнительные биспецифические или мультиспецифические структуры, в которые может быть включен spFv в соответствии с настоящим описанием, включают иммуноглобулины с двойными переменными доменами (DVD) (международная патентная публикация № WO2009/134776; DVD представляют собой полноразмерные антитела, содержащие тяжелую цепь, имеющую структуру VH1-линкер-VH2-CH, и легкую цепь, имеющую структуру VL1-линкер-VL2-CL; где линкер необязателен), структуры, включающие различные димеризационные домены для соединения двух плеч антител с разной специфичностью, такие как «лейциновая застежка» или коллагеновые димеризационные домены (международная патентная публикация № WO2012/022811, патент США № 5,932,448; патент США № 6,833,441), два или более доменных антитела (dAb), конъюгированных вместе, диатела, антитела, имеющие только тяжелую цепь, такие как антитела верблюжьего типа и сконструированные антитела верблюжьего типа, антитела с двойным нацеливанием (DT)-Ig (GSK/Domantis), антитело «два в одном» (Genentech), поперечно сшитые Mab (Karmanos Cancer Center), mAb2 (F-Star) и CovX-тело (CovX/Pfizer), IgG-подобные биспецифические антитела (InnClone/Eli Lilly), Ts2Ab (MedImmune/AZ) и BsAb (Zymogenetics), HERCULES (Biogen Idec) и TvAb (Roche), слитые белки ScFv/Fc (Academic Institution), SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Zymogenetics/BMS), перенацеливающиеся антитела с двойной аффинностью (Fc-DART) (MacroGenics) и Dual(ScFv)₂-Fab (National Research Center for Antibody Medicine, Китай), антитела «двойного действия» или Bis-Fab (Genentech), Dock-and-Lock (DNL) (ImmunoMedics), двухвалентное биспецифическое антитело (Biotecol) и Fab-Fv (UCB-Celltech). Антитела на основе ScFv, диател и доменные антитела включают в себя, без ограничений, биспецифический T-клеточный активатор (BiTE) (Micromet), тандемное диатело (Tandab) (Affimed), перенацеливающиеся антитела с двойной аффинностью (DART) (MacroGenics), одноцепочечное диатело (Academic), TCR-подобные антитела (AIT, ReceptorLogics), слитый белок ScFv и человеческого сывороточного альбумина (Merrimack), COMBODY (Epigen Biotech), нанотела с двойным нацеливанием (Ablynx), доменные антитела с двойным нацеливанием, имеющие только тяжелую цепь.

[0575] scFv в соответствии с настоящим описанием также может быть сконструирован в мультиспецифический белок, который содержит три полипептидных цепи. В таких конструкциях по меньшей мере один антигенсвязывающий домен находится в форме scFv в соответствии с настоящим описанием. Иллюстративные конструкции включают (где «1» обозначает первый антигенсвязывающий домен, «2» обозначает второй антигенсвязывающий домен и «3» обозначает третий антигенсвязывающий домен):

Конструкция 1: Цепь А) scFv1-CH2-CH3; Цепь В) VL2-CL; Цепь С) VH2-CH1-шарнир-CH2-CH3

Конструкция 2: Цепь А) scFv1-шарнир-CH2-CH3; Цепь В) VL2-CL; Цепь С) VH2-

СН1-шарнир-СН2-СН3

Конструкция 3: Цепь А) scFv1-СН1-шарнир-СН2-СН3; Цепь В) VL2-CL; Цепь С) VH2-СН1-шарнир-СН2-СН3

Конструкция 4: Цепь А) СН2-СН3-scFv1; Цепь В) VL2-CL; Цепь С) VH2-СН1-шарнир-СН2-СН3

[0576] Конструирование СН3 может быть включено в конструкции 1-4, такие как мутации L351Y_F405A_Y407V/T394W, T366I_K392M_T394W/F405A_Y407V, T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V, L351Y_Y407A/T366A_K409F, L351Y_Y407A/T366V_K409F, Y407A/T366A_K409F или T350V_L351Y_F405A_Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W, как описано в US2012/0149876 или US2013/0195849 (Zymeworks).

5.3 Изотипы, аллотипы и конструирование Fc

[0577] Константная область Ig или фрагмент константной области Ig, такой как область Fc, присутствующая в мультиспецифических молекулах или в гетерологичных молекулах в соответствии с настоящим описанием, может представлять собой любой аллотип или изотип.

[0578] В некоторых вариантах осуществления константная область Ig или фрагмент константной области Ig представляет собой изотип IgG1.

[0579] В некоторых вариантах осуществления константная область Ig или фрагмент константной области Ig представляет собой изотип IgG2.

[0580] В некоторых вариантах осуществления константная область Ig или фрагмент константной области Ig представляет собой изотип IgG3.

[0581] В некоторых вариантах осуществления константная область Ig или фрагмент константной области Ig представляет собой изотип IgG4.

[0582] Константная область Ig или фрагмент константной области Ig могут иметь любой аллотип. Ожидается, что аллотип не влияет на свойства константной области Ig, такие как связывание или опосредованные Fc эффекторные функции. Иммуногенность терапевтических белков, содержащих константные области Ig их фрагментов, связана с повышенным риском реакций на инфузию и сниженной длительностью терапевтического ответа (Baert *et al.*, (2003) *N Engl J Med* 348:602-608). Степень, с которой терапевтические белки, содержащие константные области Ig их фрагментов, индуцируют иммунный ответ в организме-хозяине, отчасти может определяться аллотипом константной области Ig (Stickler *et al.*, (2011) *Genes and Immunity* 12:213-221). Аллотип константной области Ig связан с вариациями аминокислотной последовательности в конкретных положениях в последовательностях константных областей антитела. В **таблице 3** показаны выбранные аллотипы IgG1, IgG2 и IgG4.

Таблица 3.

Аллотип	Аминокислотный остаток в положении различия (нумерация остатков: по каталогу ЕС)		
	IgG2	IgG4	IgG1

	189	282	309	422	214	356	358	431
G2m(n)	T	M						
G2m(n-)	P	V						
G2m(n)/(n-)	T	V						
nG4m(a)			L	R				
G1m(17)					K	E	M	A
G1m(17,1)					K	D	L	A

[0583] Циркулирующие в крови эндогенные карбоксипептидазы могут удалять С-концевой лизин (CTL) из константной области Ig (Cai *et al.*, (2011) *Biotechnol Bioeng* 108:404-412). Удаление CTL во время получения можно контролировать на уровне ниже максимального посредством контроля концентрации внеклеточного Zn^{2+} , этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) или ЭДТА- Fe^{3+} , как описано в патентной публикации США № US2014/0273092. Содержание CTL белков можно измерять с помощью известных способов.

[0584] В некоторых вариантах осуществления изобретения spFv в соответствии с настоящим описанием, конъюгированный с константной областью Ig, имеет содержание С-концевого лизина от около 10% до около 90%. В некоторых вариантах осуществления содержание С-концевого лизина составляет от около 20% до около 80%. В некоторых вариантах осуществления содержание С-концевого лизина составляет от около 40% до около 70%. В некоторых вариантах осуществления содержание С-концевого лизина составляет от около 55% до около 70%. В некоторых вариантах осуществления содержание С-концевого лизина составляет около 60%.

[0585] Мутации области Fc можно вводить в мультиспецифические молекулы или гетерологичные молекулы в соответствии с настоящим описанием, содержащие константную область Ig или фрагмент константной области Ig для модуляции их эффекторных функций, таких как ADCC, ADCP и/или ADCP и/или фармакокинетические свойства. Это может быть достигнуто путем введения в Fc мутации (-ий), модулирующей (-их) связывание мутантного Fc с активирующими рецепторами FcγR (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIII), ингибиторным FcγRIIb и/или с FcRn.

[0586] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическая молекула или гетерологичная молекула настоящего описания содержат по меньшей мере одну мутацию в константной области Ig или в фрагменте константной области Ig.

[0587] В некоторых вариантах осуществления указанная по меньшей мере одна мутация находится в области Fc.

[0588] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическая молекула или гетерологичная молекула в соответствии с настоящим описанием содержит по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать мутаций в области Fc.

[0589] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическая молекула или гетерологичная молекула в соответствии с настоящим описанием содержит в области Fc по меньшей мере одну мутацию, которая модулирует связывание антитела с FcRn.

[0590] Положения Fc, в которые можно вводить мутации для модуляции периода полужизни (например, связывания с FcRn), включают в себя положения 250, 252, 253, 254, 256, 257, 307, 376, 380, 428, 434 и 435. Примерами мутаций, которые можно вводить по отдельности или в комбинации, являются мутации T250Q, M252Y, I253A, S254T, T256E, P257I, T307A, D376V, E380A, M428L, H433K, N434S, N434A, N434H, N434F, H435A и H435R. Примерами мутаций, которые можно вводить по отдельности или в комбинации для увеличения периода полужизни, являются мутации M428L/N434S, M252Y/S254T/T256E, T250Q/M428L, N434A и T307A/E380A/N434A. Примерами мутаций, которые можно вводить по отдельности или в комбинации для уменьшения периода полужизни, являются мутации H435A, P257I/N434H, D376V/N434H, M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F, T308P/N434A и H435R.

[0591] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическая молекула или гетерологичная молекула в соответствии с настоящим описанием содержит мутацию M252Y/S254T/T256E в области Fc.

[0592] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическая молекула или гетерологичная молекула в соответствии с настоящим описанием содержит по меньшей мере одну мутацию в области Fc, которая уменьшает связывание белка с активирующим Fc-рецептором (FcγR) и/или уменьшает эффекторные функции Fc, такие как связывание C1q, комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC), антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) или фагоцитоз (ADCP).

[0593] Положения Fc, в которые можно вводить мутации для уменьшения связывания мультиспецифической молекулы или гетерологичной молекулы в соответствии с настоящим описанием с активирующим FcγR и последующего снижения эффекторной функции, включают в себя положения 214, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 265, 267, 268, 270, 295, 297, 309, 327, 328, 329, 330, 331 и 365. Примерами мутаций, которые можно вводить по отдельности или в комбинации, являются мутации K214T, E233P, L234V, L234A, делеция G236, V234A, F234A, L235A, G237A, P238A, P238S, D265A, D265S, S267E, H268A, H268Q, Q268A, N297A, A327Q, P329A, D270A, Q295A, V309L, A327S, L328F, A330S и P331S в IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Примерами комбинаций мутаций, которые приводят к получению мультиспецифической молекулы или гетерологичной молекулы в соответствии с настоящим описанием со сниженной ADCC, являются мутации L234A/L235A в IgG1, L234A/L235A/D265S в IgG1, V234A/G237A/ P238S/H268A/V309L/A330S/P331S в IgG2, F234A/L235A в IgG4, S228P/F234A/ L235A в IgG4, N297A во всех изоформах Ig, V234A/G237A в IgG2, K214T/E233P/ L234V/L235A/G236-делеция/A327G/P331A/D365E/L358M в IgG1, H268Q/V309L/A330S/P331S в IgG2, S267E/L328F в IgG1, L234F/L235E/D265A в IgG1, L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S в IgG1, S228P/F234A/L235A/G237A/P238S в IgG4 и S228P/F234A/L235A/G236-делеция/G237A/P238S в IgG4. Можно также применять гибридные домены Fc IgG2/4, такие как Fc с остатками 117-260 из IgG2 и остатками 261-447 из IgG4.

[0594] Пример мутации, которая приводит к образованию мультиспецифической молекулы или гетерологичной молекулы в соответствии с настоящим описанием со сниженной CDC, представляет собой мутацию K322A.

[0595] Для усиления стабильности IgG4 можно выполнять известную мутацию S228P в IgG4.

[0596] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическая молекула или гетерологичная молекула в соответствии с настоящим описанием содержит в области Fc по меньшей мере одну мутацию, выбранную из группы, состоящей из K214T, E233P, L234V, L234A, делеции G236, V234A, F234A, L235A, G237A, P238A, P238S, D265A, S267E, H268A, H268Q, Q268A, N297A, A327Q, P329A, D270A, Q295A, V309L, A327S, L328F, A330S и P331S.

[0597] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическая молекула или гетерологичная молекула в соответствии с настоящим описанием содержит мутацию L234A/L235A/D265S в области Fc.

[0598] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическая молекула или гетерологичная молекула в соответствии с настоящим описанием содержит мутацию L234A/L235A в области Fc.

[0599] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическая молекула или гетерологичная молекула в соответствии с настоящим описанием содержит по меньшей мере одну мутацию в области Fc, которая усиливает связывание мультиспецифической молекулы или гетерологичной молекулы в соответствии с настоящим описанием с Fc γ R и/или усиливает эффекторные функции Fc, такие как связывание C1q, комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC), антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) и/или фагоцитоз (ADCP).

[0600] Положения Fc, в которые можно вводить мутации для увеличения связывания мультиспецифической молекулы или гетерологичной молекулы в соответствии с настоящим описанием с активирующим Fc γ R и/или для усиления эффекторных функций Fc, включают в себя положения 236, 239, 243, 256, 290, 292, 298, 300, 305, 312, 326, 330, 332, 333, 334, 345, 360, 339, 378, 396 или 430 (нумерация остатков соответствует каталогу ЕС). Примерами мутаций, которые можно выполнять по отдельности или в комбинации, являются G236A, S239D, F243L, T256A, K290A, R292P, S298A, Y300L, V305L, K326A, A330K, I332E, E333A, K334A, A339T и P396L. Примерами комбинаций мутаций, которые позволяют получать белки с повышенными ADCC или ADCP, являются S239D/I332E, S298A/E333A/K334A, F243L/R292P/Y300L, F243L/R292P/Y300L/P396L, F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L и G236A/S239D/I332E.

[0601] Положения Fc, в которые можно вводить мутации для усиления CDC, включают в себя положения 267, 268, 324, 326, 333, 345 и 430. Примерами мутаций, которые можно выполнять по отдельности или в комбинации, являются S267E, F1268F, S324T, K326A, K326W, E333A, E345K, E345Q, E345R, E345Y, E430S, E430F и E430T. Примерами комбинированных мутаций, которые приводят к образованию мультиспецифической

молекулы или гетерологичной молекулы в соответствии с настоящим описанием с повышенной CDC, являются K326A/E333A, K326W/E333A, H268F/S324T, S267E/H268F, S267E/S324T и S267E/H268F/S324T.

[0602] Конкретные мутации, описанные в данном документе, представляют собой мутации по сравнению с аминокислотными последовательностями дикого типа IgG1, igG2 и IgG4 SEQ ID NO: 66, 67 и 68 соответственно.

SEQ ID NO: 66, IgG1 дикого типа

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 67; IgG2 дикого типа

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPCPAPPV
AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTFRVVSVLTVVHVDWLNQKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 68; IgG4 дикого типа

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTV
DKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGLK

[0603] Связывание мультиспецифической молекулы или гетерологичной молекулы в соответствии с настоящим описанием с FcγR или FcRn можно оценивать с использованием проточной цитометрии на клетках, сконструированных для экспрессии каждого из рецепторов. В примере анализа связывания в 96-луночный планшет высевают 2×10^5 клеток на лунку и блокируют буферным раствором для окрашивания с бычьим сывороточным альбумином (BSA) (BD Biosciences, г. Сан-Хосе, США) в течение 30 мин при 4 °C. Клетки инкубируют с исследуемой мультиспецифической молекулой или исследуемой гетерологичной молекулой в соответствии с настоящим описанием на льду в течение 1,5 часа при 4 °C. После двукратного промывания буферным раствором для окрашивания BSA клетки инкубируют с меченым R-фикоэритрином (R-PE) вторичным антителом к человеческому IgG (Jackson Immunoresearch Laboratories) в течение 45 мин при 4 °C. Клетки дважды промывают в буферном растворе для окрашивания, после чего повторно суспендируют в 150 мкл буферного раствора для окрашивания, содержащего

разведенный в соотношении 1 : 200 краситель DRAQ7 для живых/мертвых клеток (Cell Signaling Technology, г. Данверс, США). Сигналы PE и DRAQ7 от окрашенных клеток определяют с помощью проточного цитометра Miltenyi_MACSQuant (Miltenyi Biotec, г. Оберн, США) с использованием, соответственно, каналов В2 и В4. Живые клетки гейтируют по исключению DRAQ7, а средние геометрические значения сигналов флуоресценции определяют для сбора по меньшей мере 10 000 случаев живых клеток. Для анализа используют программное обеспечение FlowJo (Tree Star). Данные наносят на график как логарифм концентрации антител в зависимости от средних значений сигналов флуоресценции. Проводят нелинейный регрессионный анализ.

5.4. Гликоинженерия

[0604] Способность мультиспецифической молекулы или гетерологичной молекулы в соответствии с настоящим описанием, конъюгированной с константной областью Ig или фрагментом константной области Ig, опосредовать ADCC может быть усилена путем конструирования компонента олигосахарида константной области Ig или фрагмента константной области Ig. IgG1 или IgG3 человека претерпевают N-гликозилирование по Asn297 большинством гликанов в хорошо известных 2-антенарных формах G0, G0F, G1, G1F, G2 или G2F. Константную область Ig, содержащую белки, можно продуцировать несконструированными клетками CHO, как правило, имеют содержание фукозы в гликанах по меньшей мере около 85%. Удаление центральной фукозы из олигосахаридов типа биантенарных комплексов, присоединенных к константной области Ig или фрагменту константной области Ig, усиливает ADCC мультиспецифической молекулы или гетерологичной молекулы в соответствии с настоящим описанием посредством улучшенного связывания FcγRIIIa без изменения связывания с антигеном или активности CDC. Такие мультиспецифические молекулы или гетерологичные молекулы можно получать с помощью разных способов, которые, по имеющимся данным, приводят к успешной экспрессии иммуноглобулинов с относительно высокой степенью дефукозилирования, несущих Fc-олигосахариды типа 2-антенарного комплекса, таких как контроль осмоляльности культуры (Konno *et al.*, (2012) *Cytotechnology* 64:249-265), применение в качестве линии клеток-хозяев вариантной линии CHO Lec13 (Shields *et al.*, (2002) *J Biol Chem* 277:26733-26740), application of a variant CHO line EB66 as the host cell line (Olivier *et al.*, (2010) *MAbs*;2: 405-415), применение линии клеток гибридомы крыс YB2/0 в качестве линии клеток-хозяев (Shinkawa *et al.*, (2003) *J Biol Chem* 278:3466-3473), введение малой интерферирующей РНК, специфичной к гену 1,6-фукозилтрансферазы (*FUT8*) (Mori *et al.*, (2004) *Biotechnol Bioeng* 88:901-908), или коэкспрессия β-1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III и α-маннозидазы II комплекса Гольджи, или применение сильного ингибитора альфа-маннозидазы I, кифунензина (Ferrara *et al.*, (2006) *J Biol Chem* 281:5032-5036).

[0605] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическая молекула или гетерологичная молекула в соответствии с настоящим описанием, содержащая константную область Ig или фрагмент константной области Ig, имеют 2-антенарную

структуру гликанов с содержанием фукозы от около 1% до около 15%, например около 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1%. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическая молекула или гетерологичная молекула в соответствии с настоящим описанием, содержащая константную область Ig или фрагмент константной области Ig, имеют структуру гликанов с содержанием фукозы около 50%, 40%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25% или 20%.

[0606] Термин «**содержание фукозы**» относится к количеству моносахарида фукозы в пределах сахаридной цепи в положении Asn297. Относительное количество фукозы представляет собой процентное содержание фукозосодержащих структур, относящихся ко всем гликоструктурам. Они могут характеризоваться и количественно определяться множеством способов, например: 1) при помощи времяпролетной матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI-TOF) пробы, обработанной N-гликозидазой F (например, комплексные, гибридные и олигоманнозные и высокоманнозные структуры), как описано в международной патентной заявке № WO2008/077546; 2) посредством ферментативного высвобождения гликанов Asn297 с последующей дериватизацией и обнаружением/количественным определением методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (сверхэффективной жидкостной хроматографии (СВЭЖХ)) с флуоресцентным обнаружением и/или высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС) (сверхэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (СВЭЖХ-МС)); 3) анализом интактного белка нативного или восстановленного mAb с обработкой или без обработки гликанов Asn297 ферментом Endo S или другим ферментом, который расщепляет связь между первым и вторым моносахаридами GlcNAc и при этом сохраняет соединение фукозы и первого GlcNAc; 4) расщеплением mAb на составляющие его пептиды посредством ферментативного расщепления (например, трипсин или эндопептидаза Lys-C) и последующим разделением, обнаружением и количественным определением посредством ВЭЖХ-МС (СВЭЖХ-МС); 5) отделением олигосахаридов mAb от белка mAb посредством специфического ферментативного дегликозилирования с PNGase F на Asn 297. Высвобожденные таким образом олигосахариды можно метить флуорофором, разделять и идентифицировать различными вспомогательными методами, которые позволяют: точно охарактеризовать структуры гликанов посредством масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI) путем сравнения экспериментальных масс с теоретическими массами, определить степень сиалилирования с помощью ионообменной ВЭЖХ (GlycoSep C), разделить и количественно оценить формы олигосахаридов по критерию гидрофильности с помощью ВЭЖХ с обычной фазой (GlycoSep N) и разделить и количественно оценить формы олигосахаридов с помощью высокоэффективного капиллярного электрофореза с лазер-индуцированной флуоресценцией (HPCE-LIF).

[0607] Термин «**низкая фукоза**» или «**низкое содержание фукозы**» относится к мультиспецифической молекуле или гетерологичной молекуле настоящего описания,

содержащей константную область Ig или фрагмент константной области Ig с содержанием фукозы около 1%-15%.

[0608] Термин «**нормальная фукоза**» или «**нормальное содержание фукозы**» относится к мультиспецифической молекуле или гетерологичной молекуле настоящего описания, содержащей константную область Ig или фрагмент константной области Ig с содержанием фукозы выше около 50%, обычно выше около 80% или выше 85%.

5.5 Антиидиотипические антитела

[0609] Антиидиотипические антитела представляют собой антитела, которые специфически связываются с spFv настоящего описания.

[0610] В настоящем изобретении также предложено антиидиотипическое антитело, которое специфически связывается с spFv в соответствии с настоящим описанием.

[0611] В некоторых вариантах осуществления антиидиотипическое антитело связывается с дисульфидной связью в spFv в соответствии с настоящим описанием.

[0612] В некоторых вариантах осуществления антиидиотипическое антитело связывается с антигенсвязывающим доменом spFv в соответствии с настоящим описанием.

5.6 Полинуклеотиды, векторы, клетки-хозяева

[0613] В настоящем описании также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий spFv в соответствии с настоящим описанием.

[0614] В настоящем описании также предложен вектор, содержащий полинуклеотид в соответствии с настоящим описанием.

[0615] В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вектор экспрессии. Экспрессионные векторы могут представлять собой плазмидные векторы, вирусные векторы, векторы для экспрессии бакуловируса, векторы для прокариотической экспрессии, векторы для эукариотической экспрессии, транспозонные векторы или любой другой вектор, подходящий для введения полинуклеотида настоящего описания в данную клетку или организм. Полинуклеотид, кодирующий spFv настоящего описания, может быть функционально связан с контрольными последовательностями в экспрессионном векторе, который облегчает экспрессию spFv. К таким регуляторным элементам могут относиться промотор транскрипции, последовательности, кодирующие приемлемые участки связывания мРНК с рибосомой, и последовательности, контролирующие терминацию транскрипции и трансляции. Экспрессионные векторы также могут включать в себя один или более нетранскрибируемых элементов, например точку начала репликации, другие 5' или 3' нетранскрибируемые последовательности, 5' 3' последовательности (например, необходимые участки связывания с рибосомой), донорный и акцепторный сайты сплайсинга или селективный маркер. Полинуклеотид может представлять собой кДНК. Промотор, управляющий экспрессией spFv, может быть сильным, слабым, тканеспецифичным, индуцибельным или специфичным для развития промотором. Типичные промоторы, которые можно использовать, представляют собой гипоксантин-фосфорибозилтрансферазу (HPRT), аденозиндеаминазу, пируваткиназу, бета-актин, человеческий миозин, гемоглобин человека, креатин мышц человека и другие. Кроме того,

многие вирусные промоторы функционируют конститутивно в эукариотических клетках и являются приемлемыми для применения в описанных вариантах осуществления. Такие вирусные промоторы включают в себя немедленно-ранний промотор цитомегаловируса (CMV), ранний и поздний промоторы SV40, промотор вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), длинные концевые повторы (LTR) вируса лейкоза Малони, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса Эпштейна - Барр (EBV), вируса саркомы Рауса (RSV) и других ретровирусов и промотор тимидинкиназы вируса простого герпеса. Индуцибельные промоторы, такие как промотор металлотионеина, индуцибельный промотор тетрациклина, индуцибельный доксициклин-индуцибельный промотор, промоторы, которые содержат один или более стимулируемых интерфероном ответных элементов (ISRE), таких как протеинкиназа R 2',5'-олигоденилатсинтетазы, гены Mx и ADAR1. Векторы в соответствии с настоящим описанием могут также содержать один или более участков внутренней посадки рибосомы (IRES). Включение последовательности IRES в слитые векторы может быть полезно для усиления экспрессии некоторых белков. Векторы в соответствии с настоящим описанием могут быть кольцевыми или линейными. Они могут быть получены с возможностью наличия системы репликации, функционирующей в прокариотической или эукариотической клетке-хозяине. Системы репликации могут быть получены, например, из ColE1, SV40, 2μ плазмиды, λ, вируса бычьей папилломы и т. п. Векторы экспрессии могут быть сконструированы либо для транзientной экспрессии, либо для стабильной экспрессии, либо для обоих типов. Векторы экспрессии могут быть получены для конститутивной экспрессии или для индуцируемой экспрессии.

[0616] Примерами векторов, которые могут применяться, являются бактериальные: pBs, phagescript, PsiX174, pBluescript SK, pBs KS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene, Ла-Холья, г. Сан-Диего, штат Калифорния, США); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540 и pRIT5 (Pharmacia, г. Уппсала, Швеция). Эукариотические: pWLneo, pSV2cat, pOG44, PXR1, pSG (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG и pSVL (Pharmacia), pEE6.4 (Lonza) и pEE12.4 (Lonza). Дополнительные векторы включают в себя серии pUC (Fermentas Life Sciences, Глен Берни, штат Мэриленд, США), серии pBluescript (Stratagene, г. Ла-Холья, штат Калифорния, США), серии pET (Novagen, г. Мэдисон, штат Висконсин, США), серии pGEX (Pharmacia Biotech, г. Уппсала, Швеция) и серии pEX (Clontech, г. Пало-Альто, штат Калифорния, США). Можно использовать векторы бактериофагов, такие как λGT10, λGT11, λEMBL4 и λNM1149, λZapII (Stratagene). Примеры векторов экспрессии растений включают pBI01, pBI01.2, pBI121, pBI101.3 и pBIN19 (Clontech). Примеры векторов экспрессии на животных включают pEUK-CI, pMAM и pMAMneo (Clontech). Экспрессионный вектор может быть вирусным вектором, например, ретровирусным вектором, например, гамма-ретровирусным вектором.

[0617] В настоящем описании также предложена клетка-хозяин, содержащая вектор в соответствии с настоящим описанием.

[0618] Термин «клетка-хозяин» относится к клетке, в которую был встроен вектор.

Следует понимать, что термин «клетка-хозяин» служит для обозначения не только конкретной заявленной клетки, но и потомства такой клетки, а также стабильной клеточной линии, полученной из конкретной заявленной клетки. Так как в последующих поколениях могут возникать некоторые модификации вследствие либо мутации, либо воздействий среды, такое потомство может быть неидентичным исходной клетке, но оно также может быть охвачено термином «клетка-хозяин», используемым в настоящем документе. Такими клетками-хозяевами могут быть эукариотические, прокариотические, растительные клетки или клетки архей. Кишечная палочка (*Escherichia coli*), бациллы, такие как сенная палочка (*Bacillus subtilis*), и другие энтеробактерии, такие как сальмонеллы, серратия и различные виды псевдомонад, являются примерами прокариотических клеток-хозяев. Для экспрессии также можно использовать другие микроорганизмы, такие как дрожжи. Сахаромицеты (например, *S. cerevisiae*) и пихии являются примерами приемлемых дрожжевых клеток-хозяев. Примерами эукариотических клеток могут быть клетки млекопитающих, насекомых, птиц или другие клетки животного происхождения. Эукариотические клетки млекопитающих включают иммортализованные клеточные линии, такие как гибридомы или клеточные линии миеломы, например мышинные клеточные линии SP2/0 (Американская коллекция типовых культур (ATCC), г. Манассас, штат Вирджиния, CRL-1581), NS0 (Европейская коллекция клеточных культур (ECACC), г. Солсбери, Уилтшир, Великобритания, ECACC № 85110503), FO (ATCC CRL-1646) и Ag653 (ATCC CRL-1580). Примером клеточной линии миеломы человека является U266 (ATTC CRL-TIB-196). Другие используемые клеточные линии включают в себя линии, полученные из клеток яичника китайского хомячка (CHO), например CHO-K1SV (Lonza Biologics, г. Уолкерсвилл, штат Мэриленд, США), CHO-K1 (ATCC CRL-61) или DG44.

[0619] В настоящем описании также предложен способ получения spFv в соответствии с настоящим описанием, включающий культивирование клетки-хозяина в соответствии с настоящим описанием в условиях выделения spFv, и очистку spFv. Известны способы получения scFvs и их очистки. После синтеза (химического или рекомбинантного) spFv настоящего изобретения можно очищать в соответствии со стандартными процедурами, включающими в себя осаждение сульфатом аммония, применение аффинных колонок, колоночную хроматографию, высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), гель-электрофорез и т. п. (см. по существу Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N.Y., 1982)). spFv настоящего изобретения может быть по существу чистым, например чистым на по меньшей мере от около 80% до 85%, чистым на по меньшей мере от около 85% до 90%, чистым на по меньшей мере от около 90% до 95%, чистым на по меньшей мере от около 98% до 99% или более, например не содержащим загрязнителей, таких как клеточный дебрис, макромолекулы и т. д., отличные от заявленного белка.

[0620] Полинуклеотиды, кодирующие scFv настоящего изобретения, могут быть включены в векторы с применением стандартных способов молекулярной биологии. Трансформацию клетки-хозяина, культивирование, экспрессию и очистку антитела выполняют с применением хорошо известных способов.

5.7 Фармацевтические композиции и введение

[0621] В настоящем описании также предложена фармацевтическая композиция, содержащая spFv, гетерологичная молекула, содержащая spFv или мультиспецифическая молекула, содержащая spFv в соответствии с настоящим описанием и фармацевтически приемлемый носитель. Для терапевтического применения spFv, гетерологичная молекула, содержащая spFv или мультиспецифическая молекула, содержащая spFv настоящего описания, может быть приготовлена в виде фармацевтических композиций, содержащих эффективное количество spFv, гетерологичную молекулу, содержащую spFv, или мультиспецифическую молекулу, содержащую spFv настоящего описания в качестве активного ингредиента в фармацевтически приемлемом носителе. Термин «носитель» относится к разбавителю, адьюванту, эксципиенту или несущей среде, с которой вводят spFv, гетерологичную молекулу, содержащую spFv, или мультиспецифическую молекулу, содержащую spFv настоящего описания. Такие несущие среды могут представлять собой жидкости, такие как вода и масла, включая масла минерального, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т. п. Например, можно применять 0,4%-й солевой раствор и 0,3%-й раствор глицина. Эти растворы стерильны и по существу не содержат твердых частиц. Стерилизацию проводят с использованием стандартных, хорошо известных способов стерилизации (например, фильтрования). Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для приближения к физиологическим условиям, такие как регулирующие pH и буферные агенты, стабилизирующие, загущающие, увлажняющие и окрашивающие агенты и т. д. Концентрация spFv, гетерологичной молекулы, содержащей spFv, или мультиспецифической молекулы, содержащей spFv, настоящего изобретения в таком фармацевтическом составе может варьировать от менее около 0,5%, обычно по меньшей мере около 1% и до 15 или 20% масс., и может выбираться преимущественно на основании необходимой дозы, объемов текучей среды, значений вязкости и т. д. в соответствии с выбранным способом введения. Приемлемые несущие среды и составы, включающие другие человеческие белки, например, человеческий сывороточный альбумин, описаны, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Troy, D.B. ed., Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Part 5, Pharmaceutical Manufacturing pp 691-1092, см., в особенности pp. 958-989.

[0622] Способом введения spFv, гетерологичной молекулы, содержащей spFv, или мультиспецифической молекулы, содержащей spFv, настоящего изобретения может быть любой приемлемый путь, такой как парентеральное введение, например внутривенное, внутримышечное, внутрибрюшинное, внутривенное или подкожное, трансмукозальное (пероральное, интраназальное, интравагинальное, ректальное) или другие способы, известные специалисту, как хорошо известно в данной области.

5.8 Способ получения spFv в соответствии с настоящим описанием

[0623] В описании также предложен способ получения стабилизированного scFv,

включающий:

обеспечение вариабельной области тяжелой цепи (VH) и вариабельной области легкой цепи (VL), которые образуют антигенсвязывающий сайт;

обеспечение линкера (L), который содержит или сконструирован таким образом, чтобы содержать первый Cys L;

конструирование VH таким образом, чтобы содержать Cys VH в положении каркасного остатка на структурно консервативной поверхности VH; и

образование дисульфидной связи между Cys VH и первым Cys L для получения стабилизированного scFv.

[0624] В описании также предложен способ получения стабилизированного scFv, включающий:

обеспечение VH и VL, которые образуют антигенсвязывающий сайт;

обеспечение L, который содержит или сконструирован таким образом, чтобы содержать второй Cys L;

конструирование VL таким образом, чтобы содержать Cys VL в положении каркасного остатка на структурно консервативной поверхности VL; и

образование дисульфидной связи между Cys VL и вторым Cys L для получения стабилизированного scFv.

[0625] В описании также предложен способ получения стабилизированного scFv, включающий:

обеспечение вариабельной области тяжелой цепи (VH) и вариабельной области легкой цепи (VL), которые образуют антигенсвязывающий сайт;

обеспечение линкера (L), который содержит или сконструирован таким образом, чтобы содержать первый Cys L и второй Cys L;

конструирование VH таким образом, чтобы содержать Cys VH в положении каркасного остатка на структурно консервативной поверхности VH;

конструирование VL таким образом, чтобы содержать Cys VL в положении каркасного остатка на структурно консервативной поверхности VL; и

образование дисульфидной связи между Cys VH и первым Cys L и дисульфидной связи между Cys VL и вторым Cys L для получения стабилизированного scFv.

[0626] Дисульфидная связь, как правило, образуется во время экспрессии scFv.

[0627] Любая известная пара VH/VL scFv, которая образует антигенсвязывающий домен, может быть сконструирована в стабилизированные scFv настоящего описания. В альтернативном варианте осуществления могут быть идентифицированы *de novo* представляющие интерес антигенсвязывающие пары VH/VL, путем использования известных способов, причем полученные пары VH/VL могут быть сконструированы в формат spFv.

[0628] Например, способ гибридом Kohler и Milstein можно использовать для идентификации пар VH/VL, которые связывают представляющий интерес антиген, причем полученные пары VH/VL могут быть сконструированы как spFv. В альтернативном

варианте осуществления для получения антигенсвязывающих фрагментов можно применять трансгенных животных, несущих в своем геноме локусы иммуноглобулинов (Ig) человека, таких как мыши, крысы или цыплята, которые описаны, например, в патенте США № 6,150,584, международной патентной публикации № WO1999/45962, международных патентных публикациях №№ WO2002/066630, WO2002/43478, WO2002/043478 и WO1990/04036. Эндогенные локусы иммуноглобулинов у таких животных можно разрывать или удалять, и в геном животного можно встраивать по меньшей мере один полный или частичный локус иммуноглобулина человека посредством гомологичной или негомологичной рекомбинации, с применением трансхромосом или с применением минигенов. Для получения человеческих антител, направленных против выбранного антигена, с применением описанной выше технологии можно обратиться к таким компаниям, как Regeneron (http://_www_regeneron_com), Harbour Antibodies (http://_www_harbourantibodies_com), Open Monoclonal Technology, Inc. (OMT) (http://_www_omtinc_net), KyMab (http://_www_kymab_com), Trianni (http://_www_trianni_com) и Ablexis (http://_www_ablexis_com). Фаговый дисплей также может использоваться для генерации антигенсвязывающих фрагментов, которые могут быть сконструированы как spFv.

[0629] В некоторых вариантах осуществления spFv в соответствии с настоящим описанием является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления spFv в соответствии с настоящим описанием является человеческим. В некоторых вариантах осуществления spFv в соответствии с настоящим описанием является нечеловеческим.

[0630] В некоторых вариантах осуществления расстояние между Cys VH и Cys VL составляет от около 7 Å до около 9 Å в стабилизированном scFv.

[0631] В некоторых вариантах осуществления Cys VH находится в H3, H5, H40, H43, H46 или H105, при этом остатки нумеруются по системе Чотиа.

[0632] В некоторых вариантах осуществления Cys VL находятся в L3, L5, L39, L42, L45, L100 или L102, где остатки нумеруются по системе Чотиа.

[0633] В некоторых вариантах осуществления

Cys VH находится в H105, а Cys VL находится в L42;

Cys VH находится в H43, а Cys VL находится в L100;

Cys VH находится в H3, а Cys VL находится в L3;

Cys VH находится в H3, а Cys VL находится в L5;

Cys VH находится в H3, а Cys VL находится в L39;

Cys VH находится в H3, а Cys VL находится в L42;

Cys VH находится в H3, а Cys VL находится в L45;

Cys VH находится в H3, а Cys VL находится в L100;

Cys VH находится в H3, а Cys VL находится в L102;

Cys VH находится в H5, а Cys VL находится в L3;

Cys VH находится в H5, а Cys VL находится в L5;

Cys VH находится в H5, а Cys VL находится в L39;

Cys VH находится в H5, а Cys VL находится в L42;
 Cys VH находится в H5, а Cys VL находится в L45;
 Cys VH находится в H5, а Cys VL находится в L100;
 Cys VH находится в H5, а Cys VL находится в L102;
 Cys VH находится в H40, а Cys VL находится в L3;
 Cys VH находится в H40, а Cys VL находится в L5;
 Cys VH находится в H40, а Cys VL находится в L39;
 Cys VH находится в H40, а Cys VL находится в L42;
 Cys VH находится в H40, а Cys VL находится в L45;
 Cys VH находится в H40, а Cys VL находится в L100;
 Cys VH находится в H40, а Cys VL находится в L102;
 Cys VH находится в H43, а Cys VL находится в L3;
 Cys VH находится в H43, а Cys VL находится в L5;
 Cys VH находится в H43, а Cys VL находится в L39;
 Cys VH находится в H43, а Cys VL находится в L42;
 Cys VH находится в H43, а Cys VL находится в L45;
 Cys VH находится в H43, а Cys VL находится в L102;
 Cys VH находится в H46, а Cys VL находится в L3;
 Cys VH находится в H46, а Cys VL находится в L5;
 Cys VH находится в H46, а Cys VL находится в L39;
 Cys VH находится в H46, а Cys VL находится в L42;
 Cys VH находится в H46, а Cys VL находится в L45;
 Cys VH находится в H46, а Cys VL находится в L100;
 Cys VH находится в H46, а Cys VL находится в L102;
 Cys VH находится в H105, а Cys VL находится в L3;
 Cys VH находится в H105, а Cys VL находится в L5;
 Cys VH находится в H105, а Cys VL находится в L39;
 Cys VH находится в H105, а Cys VL находится в L45;
 Cys VH находится в H105, а Cys VL находится в L100; или
 Cys VH находится в H105, а Cys VL находится в L102, при этом остатки нумеруются

по системе Чотиа.

[0634] В некоторых вариантах осуществления L содержит непрерывную аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной области иммуноглобулина (Ig).

[0635] В некоторых вариантах осуществления шарнирная область Ig получена из шарнирной области человеческого или нечеловеческого Ig.

[0636] В некоторых вариантах осуществления шарнирная область Ig получена из шарнирной области Ig человека.

[0637] В некоторых вариантах осуществления шарнирная область Ig человека представляет собой изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

[0638] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность $C(X)_yC$ (**SEQ ID NO: 23**), где X представляет собой Gly, Ser, Pro, Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Thr, Trp или Tyr, а y представляет собой целое число от 1 до 3

[0639] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность $C(X)_yC$ (**SEQ ID NO: 24**), где X представляет собой Gly, Ser или Pro, а y представляет собой целое число от 1 до 3.

[0640] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность CPC, CGC, CSC, CPPC (**SEQ ID NO: 1**), CGPC (**SEQ ID NO: 28**), CPGC (**SEQ ID NO: 29**), CGGC (**SEQ ID NO: 30**), CSPG (**SEQ ID NO: 31**), CPSC (**SEQ ID NO: 32**), CSSC (**SEQ ID NO: 33**), CGSC (**SEQ ID NO: 34**), CSGC (**SEQ ID NO: 35**), CPPPC (**SEQ ID NO: 36**), CGPPC (**SEQ ID NO: 37**), CPGPC (**SEQ ID NO: 38**), CPPGC (**SEQ ID NO: 39**), CGGPC (**SEQ ID NO: 40**), CPGGC (**SEQ ID NO: 41**), CGGGC (**SEQ ID NO: 42**), CSPPC (**SEQ ID NO: 43**), CPSPC (**SEQ ID NO: 44**), CPPSC (**SEQ ID NO: 45**), CSSPC (**SEQ ID NO: 46**), CPSSC (**SEQ ID NO: 47**), CSSSC (**SEQ ID NO: 48**), CGSPC (**SEQ ID NO: 49**), CPGSC (**SEQ ID NO: 50**), CSGPC (**SEQ ID NO: 51**) или CPSGC (**SEQ ID NO: 52**).

[0641] В некоторых вариантах осуществления L содержит от около 14 до около 19 аминокислот, например, около 14, около 15, около 16, около 17, около 18 или около 19 аминокислот.

[0642] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность $(X)_mC(X)_yC(X)_n$ (**SEQ ID NO: 25**); где X представляет собой Gly, Ser, Pro, Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Thr, Trp или Tyr, m представляет собой целое число от 6 до 9, y представляет собой целое число от 1 до 3, а n представляет собой целое число от 4 до 6.

[0643] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность $(X)_mC(X)_yC(X)_n$ (**SEQ ID NO: 26**); где X представляет собой Gly, Ser, Pro, Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Thr или Tyr, m представляет собой целое число от 6 до 9, y представляет собой целое число от 1 до 3, а n представляет собой целое число от 4 до 6.

[0644] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность $(X)_mC(X)_yC(X)_n$ (**SEQ ID NO: 27**); где X представляет собой Gly или Pro, m представляет собой целое число от 6 до 9, y представляет собой целое число от 1 до 3, а n представляет собой целое число от 4 до 6.

[0645] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7.

[0646] В некоторых вариантах осуществления стабилизированный spFv в соответствии с настоящим описанием находится в ориентации VL-L-VH.

[0647] В некоторых вариантах осуществления стабилизированный spFv в соответствии с настоящим описанием находится в ориентации VH-L-VL.

[0648] В некоторых вариантах осуществления

VH содержит Cys в H105;

VL содержит Cys в L42;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0649] В некоторых вариантах осуществления

VH содержит Cys в H105;

VL содержит Cys в L45;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0650] В некоторых вариантах осуществления

VH содержит Cys в H105;

VL содержит Cys в L39;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0651] В некоторых вариантах осуществления

VH содержит Cys в H5;

VL содержит Cys в L42;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0652] В некоторых вариантах осуществления

VH содержит Cys в H5;

VL содержит Cys в L45;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0653] В некоторых вариантах осуществления

VH содержит Cys в H5;

VL содержит Cys в L39;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0654] В некоторых вариантах осуществления

VH содержит Cys в H3;

VL содержит Cys в L42;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0655] В некоторых вариантах осуществления

VH содержит Cys в H3;

VL содержит Cys в L45;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0656] В некоторых вариантах осуществления

VH содержит Cys в H3;

VL содержит Cys в L39;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VL-L-VH.

[0657] В некоторых вариантах осуществления

VH содержит Cys в H43;

VL содержит Cys в L100;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0658] В некоторых вариантах осуществления

VH содержит Cys в H43;

VL содержит Cys в L102;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0659] В некоторых вариантах осуществления

VH содержит Cys в H43;

VL содержит Cys в L5;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0660] В некоторых вариантах осуществления

VH содержит Cys в H43;

VL содержит Cys в L3;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0661] В некоторых вариантах осуществления

VH содержит Cys в H40;

VL содержит Cys в L100;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0662] В некоторых вариантах осуществления

VH содержит Cys в H40;

VL содержит Cys в L102;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0663] В некоторых вариантах осуществления

VH содержит Cys в H40;

VL содержит Cys в L5;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0664] В некоторых вариантах осуществления

VH содержит Cys в H40;

VL содержит Cys в L3;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0665] В некоторых вариантах осуществления

VH содержит Cys в H46;

VL содержит Cys в L100;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0666] В некоторых вариантах осуществления

VH содержит Cys в H46;

VL содержит Cys в L102;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0667] В некоторых вариантах осуществления

VH содержит Cys в H46;

VL содержит Cys в L5;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0668] В некоторых вариантах осуществления

VH содержит Cys в H46;

VL содержит Cys в L3;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и scFv находится в ориентации VH-L-VL.

[0669] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO: 3**.

[0670] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO: 6**.

[0671] В некоторых вариантах осуществления L содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO: 7**.

[0672] В некоторых вариантах осуществления стабилизированный spFv в соответствии с настоящим описанием связывает антиген с сопоставимой аффинностью по сравнению с контрольным scFv, который не содержит дисульфидных связей.

[0673] В описании также предложен способ получения стабилизированного scFv, включающий:

обеспечение полинуклеотида, кодирующего VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys в H105, а VL содержит Cys в L42;

VH содержит Cys в H43, а VL содержит Cys в L100;

VH содержит Cys в H3, а VL содержит Cys в L3;

VH содержит Cys в H3, а VL содержит Cys в L5;

VH содержит Cys в H3, а VL содержит Cys в L39;
VH содержит Cys в H3, а VL содержит Cys в L42;
VH содержит Cys в H3, а VL содержит Cys в L45;
VH содержит Cys в H3, а VL содержит Cys в L100;
VH содержит Cys в H3, а VL содержит Cys в L102;
VH содержит Cys в H5, а VL содержит Cys в L3;
VH содержит Cys в H5, а VL содержит Cys в L5;
VH содержит Cys в H5, а VL содержит Cys в L39;
VH содержит Cys в H5, а VL содержит Cys в L42;
VH содержит Cys в H5, а VL содержит Cys в L45;
VH содержит Cys в H5, а VL содержит Cys в L100;
VH содержит Cys в H5, а VL содержит Cys в L102;
VH содержит Cys в H40, а VL содержит Cys в L3;
VH содержит Cys в H40, а VL содержит Cys в L5;
VH содержит Cys в H40, а VL содержит Cys в L39;
VH содержит Cys в H40, а VL содержит Cys в L42;
VH содержит Cys в H40, а VL содержит Cys в L45;
VH содержит Cys в H40, а VL содержит Cys в L100;
VH содержит Cys в H40, а VL содержит Cys в L102;
VH содержит Cys в H43, а VL содержит Cys в L3;
VH содержит Cys в H43, а VL содержит Cys в L5;
VH содержит Cys в H43, а VL содержит Cys в L39;
VH содержит Cys в H43, а VL содержит Cys в L42;
VH содержит Cys в H43, а VL содержит Cys в L45;
VH содержит Cys в H43, а VL содержит Cys в L102;
VH содержит Cys в H46, а VL содержит Cys в L3;
VH содержит Cys в H46, а VL содержит Cys в L5;
VH содержит Cys в H46, а VL содержит Cys в L39;
VH содержит Cys в H46, а VL содержит Cys в L42;
VH содержит Cys в H46, а VL содержит Cys в L45;
VH содержит Cys в H46, а VL содержит Cys в L100;
VH содержит Cys в H46, а VL содержит Cys в L102;
VH содержит Cys в H105, а VL содержит Cys в L3;
VH содержит Cys в H105, а VL содержит Cys в L5;
VH содержит Cys в H105, а VL содержит Cys в L39;
VH содержит Cys в H105, а VL содержит Cys в L45;
VH содержит Cys в H105, а VL содержит Cys в L100; или
VH содержит Cys в H105, а VL содержит Cys в L102, где остатки нумеруются по системе Чотиа;

L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и

экспрессию полинуклеотида в клетке-хозяине для получения стабилизированного scFv.

[0674] В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой прокариотическую клетку.

[0675] В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку.

[0676] Представленные ниже примеры приведены для дополнительного описания некоторых из вариантов осуществления, раскрываемых в настоящем документе. Примеры призваны проиллюстрировать, но не ограничить, раскрываемые варианты осуществления.

6. ПРИМЕРЫ

6.1 Пример 1. Конструкция стабилизированных scFv

[0677] Моноклональное антитело (mAb) распознает свой целевой антиген посредством двух переменных доменов VL и VH. Одноцепочечный Fv (scFv) впервые был сконструирован Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426 (1988) как генетически слитые VL и VH с гибким линкером в ориентации VL-линкер-VH или VH-линкер-VL. Гибкий линкер обычно составляет три или четыре повтора глицин-серинового линкера, такого как (GGGGS)_n; n=1-4 (**SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55**). ScFv воспроизводит специфичность связывания антигена и в значительной степени аффинность его исходного mAb. Эти молекулы scFv находят широкое применение в качестве реагентов обнаружения/диагностики или в качестве строительных блоков для получения более сложных молекул, таких как би-, мультиспецифические терапевтические средства (Brinkmann and Kontermann (2017) *MAbs* 9: 182-212) или в терапевтических средствах CAR-T (Gross *et al.*, (1989), *Transplant Proc* 21(1 Pt 1): 127-130; Porter *et al.*, (2011) *J Cancer* 2: 331-332; Porter *et al.*, (2011) *N Engl J Med* 365: 725-733).

[0678] Одной из проблем, связанных с молекулами scFv, является низкая стабильность и склонность к агрегированию (см. Worn and Pluckthun (2001) *J Mol Biol* 305: 989-1010; Rothlisberger *et al.*, (2005) *J Mol Biol* 347: 773-789). Существует ряд стратегий для улучшения их свойств (Arnd *et al.*, (2001) *J Mol Biol* 312: 221-228; Monsellier *et al.*, (2006) *J Mol Biol* 362: 580-593; Zhao *et al.*, (2010) *Int J Mol Sci* 12: 1-11; Perchiacca and Tessier (2012) *Annu Rev Chem Biomol Eng* 3: 263-286; Asial *et al.*, (2013) *Nat Commun* 4: 2901; Gil and Schrum (2013) *Adv Biosci Biotechnol* 4: 73-84; Tiller and Tessier (2015) *Annu rev Biomed Eng* 17: 191-216) Эти стратегии включают введение дисульфидных связей между доменами VL/VH, повышение стабильности домена VL/VH и/или поверхностные взаимодействия с помощью различных экспериментальных методов, с использованием дополнительных мотивов димеризации и других. Ключевая трудность заключается в том, что большинство из этих стратегий часто являются специфичными для пары VH/VL и не могут быть легко перенесены в другие пары VH/VL. Иногда конструирование может оказывать отрицательное влияние на структуру VL/VH и свойство scFv. Недавно Zhang *et al.* вводили дисульфид между положением 44 VH и положением 100 VL анти-афлатоксина B₁ scFv (H4) и успешно достигали значительной стабилизации scFv при сохранении его аффинности

связывания (Zhao *et al.*, (2010) *Int J Mol Sci* 12: 1-11). Однако благодаря расстоянию и ограничениям угла между выбранными двумя положениями дисульфид между-VL/VH, если он применен к другим парам VL/VH, может ограничивать/искажать относительную ориентацию между двумя доменами, которая часто требуется для связывания.

[0679] Граница раздела между тяжелыми и легкими цепями фрагмента Fab включает взаимодействия VH/VL и CH1/CL. Два независимых набора взаимодействий обеспечивают синергетические эффекты стабилизации. Кроме того, место соединения V/C также вносит некоторые стабилизирующие эффекты. Для сравнения, в scFv граница раздела VH/VL поддерживается только взаимодействиями VH/VL. Линкер сконструирован гибким и неограничивающим, за исключением случаев, когда длина должна быть настолько малой, чтобы способствовать взаимодействиям между-scFv для образования димера и олигомера, только слабо соединяя их друг с другом. Известно, что длина и свойства линкера, когда он является достаточно длинным, незначительно влияют на стабильность scFv.

6.1.1 «Сшивающая» конструкция

[0680] Цель работы заключалась в разработке и получении стабилизированных scFv путем ограничения, но не отрицательного влияния на относительные перемещения между образующими scFv VH и VL. Это достигалось путем стабилизации scFv путем конструирования дисульфидных связей между VH и линкером и между VL и линкером. Ограничения (т. е. дисульфидные связи), когда они правильно расположены, затем играют роль синергетических эффектов, обеспечиваемых взаимодействиями CH1/CL и V/C, обсуждаемыми выше. С этой целью были идентифицированы два каркасных положения структурно консервативной поверхности (якорные точки), по одному на VH и VL, которые не пересекались с типичным прогнозируемым антигенсвязывающим сайтом и мутировали в остатки цистеина (Cys). Затем два положения были выбраны в гибком линкере для положений Cys. Когда расстояния и положения между линкерным остатком Cys были сконструированы таким образом, чтобы облегчать образование дисульфидных связей между линкером Cys и каждой якорной точкой, VH и VL более плотно прикреплены друг к другу по сравнению с прикреплением в отсутствие дисульфидных связей. Эта схема представлена на **ФИГ. 1** с примером линкера, содержащего последовательность СРРС (**SEQ ID NO: 1**). Концепция образования дисульфидных связей между гибким линкером и якорными точками в настоящем документе называется «сшиванием». Полученные «сшитые» молекулы scFv в настоящем документе называются spFv («сшитый Fv»).

6.1.2 Выбор якорных точек, конструкция последовательностей скобок и линкеров

[0681] Для обеспечения широкого применения схемы сшивания важно, чтобы якорные точки были структурно консервативными, располагались на поверхности как VL, так и VH, и их мутации в Cys не влияли на укладку VL и VH или связывание с антигенами. Расстояние и геометрия якорных точек и концы N и C доменов VL и VH также являются важными факторами для надлежащего образования дисульфида.

[0682] Якорные точки выбирали отдельно для spFv в ориентации VL-линкер-VH и VH-линкер-VL. Для ориентации VL-линкер-VH в качестве якорных точек выбрали в VL

положение 42 по системе Чотиа и в VH положение 105 по системе Чотиа. На **ФИГ. 2** показана графическая иллюстрация выбранных якорных точек для spFv в ориентации VL-линкер-VH в Fv антитела зародышевой линии человека (pdb ID 5I19, Glk1 далее). В Glk1 положение VL 42 по системе Чотиа представляет собой лизин (K) и положение VH 105 по системе Чотиа представляет собой глутамин (Q). Для ориентации VL-линкер-VH в качестве якорных точек выбрали в VL положение 100 по системе Чотиа и в VH положение 43 по системе Чотиа. На **ФИГ. 3** показана графическая иллюстрация выбранных якорных точек для spFv в ориентации VH-линкер-VL в Fv антитела зародышевой линии человека (pdb ID 5I19, Glk1). В Glk1 положение VL 100 по системе Чотиа представляет собой глутамин (K) и положение VH 43 по системе Чотиа представляет собой лизин (Q). Выбранные якорные точки были структурно консервативными, а геометрия была очень сходной с антителами, содержащими легкие цепи каппа или лямбда. Расстояния между парами якорных точек варьировали от около 7 Å (для ориентации VL-линкер-VH) до около 9 Å (для ориентации VH-линкер-VL).

[0683] Последовательности сшивающих скобок, внедренные в линкер, соединяющий VH и VL, были сконструированы таким образом, чтобы они имели сходную длину с расстояниями между якорными точками spFv. В качестве исходного примера последовательности скобок CPPC (**SEQ ID NO: 1**) выбирали как возможную последовательность скобок, частично потому, что эта последовательность встречается нативно в шарнире IgG1 человека, а также в некоторых IgG грызунов. Структуры шарниров молекул IgG человека и мыши продемонстрировали, что расстояния C β (cys1)-C β (cys2) в шарнире IgG мыши (**ФИГ. 4**) и IgG человека (**ФИГ. 5**) варьируются от около 7 Å до 9 Å. Поскольку этот диапазон был очень сходным с расстояниями между двумя якорными точками в обеих ориентациях VL-линкер-VH и VH-линкер-VL, CPPC (**SEQ ID NO: 1**) последовательность скобок может обеспечивать правильную геометрию сшивания, т. е., образование надлежащих дисульфидных связей с якорными точками эффективно и правильно. Как правило, последовательности скобок были сконструированы таким образом, чтобы иметь два остатка Cys. Для правильного сшивания N-концевой Cys последовательности скобок образует дисульфидную связь с якорной точкой N-концевого домена spFv, и C-концевой Cys последовательности скобок образует дисульфидную связь с якорной точкой C-концевого домена spFv.

[0684] Таким образом, линкер, соединяющий VH и VL, был сконструирован таким образом, чтобы он содержал последовательность скобок и соединяющие последовательности как N-конца, так и C-конца с последовательностью скобок, чтобы увеличить линкер для обеспечения достаточной длины линкера для межцепьевого складывания VH и VL и облегчения надлежащего позиционирования последовательности скобок.

[0685] В конструкции VL-линкер-VH расстояния между якорной точкой VL (K42), якорной точкой VH (Q105), C-концом VL (K107) и N-концом VH (Q1) показаны на **ФИГ. 2**. В конструкции VH-линкер-VL расстояния между якорной точкой VL (Q100), якорной

точкой VH (K43), С-концом VH (S114) и N-концом VL (D1) показаны на **ФИГ. 3**. Моделирование предполагает, что эти расстояния могут быть охвачены длинами линкера около 14-19 остатков, в которых последовательность скобок из 4 остатков фланкирована N-концевым линкерным удлинением на около 6-9 остатков и С-концевым линкерным удлинением на около 4-6 остатков. Длина сконструированного линкера, таким образом, может быть выражена как $n+4+m$, где $n=6-9$ остатков и $m=4-6$ остатков, а 4 обозначает длину CPPC (**SEQ ID NO: 1**) последовательность скобок. Остатки n и m могут представлять собой глицин или серин или другие аминокислотные остатки. Ожидается, что эти длины линкера будут достаточно длинными и гибкими, чтобы обеспечить сшивание, но слишком короткими, чтобы позволить перестановку элементов.

6.2 Пример 2. Получение и определение характерных признаков spFv

[0686] Для оценки сшивающих конструкций выбрали три антитела человека для получения scFv и соответствующих SpFv: два антитела с легкими каппа-цепями (GLk1 и GLk2) из синтетических фаговых библиотек антител (Shi *et al.*, (2010) *J Mol Biol* 397:385-396) и лямбда-содержащее антитело (CAT2200), полученное из публикации (Gerhardt *et al.* (2009) *J Mol Biol* 394:905-921). Для CAT2200 мутация T28G была введена в исходную VH для получения варианта (CAT2200a) для уменьшения некоторых взаимодействий с его мишенью, IL-17. Кроме того, мутация S42Q (Чотиа) была сконструирована в исходную VL CAT2200 и соединена с VH T28G для получения CAT2200b. Аминокислотные последовательности доменов VL и VH GLk1, gLk2, cAT2200a и CAT2200b показаны на **ФИГ. 6** и **ФИГ. 7** соответственно. Аминокислотная последовательность домена VH идентична BAT2200a и CAT2200b. GLk1 VH является ближайшим к человеческомуIGHV2-23*01, GLk2VH - к человеческомуIGHV 5-51, CAT2200VH - к человеческомуIGHV 2-23*01. GLk1 VL является ближайшим к человеческомуIGKV1-39*01, GLk2VL - к человеческомуIGKV3-20*01 и CAT2200VL - к человеческомуIGLV6-57*01.

[0687] Все молекулы scFv и spFv были получены и экспрессированы в обеих ориентациях VL-линкер-VH и VH-линкер-VL. Для конструкторов scFv использовали стандартный (GGGGS)₄ (**SEQ ID NO; 2**) линкер. Для spFv использовали разные длины линкера в пределах вышеуказанных диапазонов n и m . Для GLk1 spFv использовали линкеры 9-4-5 для обеих ориентаций. Для Glk2 spFv использовали длины линкеров 9-4-5 и 6-4-6 для ориентаций VL-VH и VH-VL соответственно. Для CAT2200a spFv получали молекулы VL-VH с линкерами 8-4-4 и 9-4-4 соответственно и для CAT2200b spFv получали молекулу с линкером 9-4-4. В **таблице 4** показаны полученные молекулы и их линкерные последовательности. В **таблице 5** показаны аминокислотные последовательности созданных молекул.

Таблица 4.

Название молекулы (SEQ ID NO:)	Тип линкера	Аминокислотная последовательность линкера	Линкер SEQ ID NO:
GLk1 scFv VL-VH (8)	4x G4S	GGGGSGGGSGGGSGGGGS	2

GLk1 spFv VL-VH (9)	9+4+5	GGGSGGSGGCPPCGGSGG	3
GLk1 scFv VH-VL (10)	4x G4S	AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	2
GLk1 spFv VH-VL (11)	9+4+5	GGGSGGSGGCPPCGGSGG	3
GLk2 scFv VL-VH (12)	4x G4S	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	2
GLk2 spFv VL-VH (13)	9+4+5	GGGSGGSGGCPPCGGSGG	3
GLk2 scFv VH-VL (14)	4x G4S	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	2
GLk2 spFv VH-VL (15)	6+4+6	GGGSGGCPPCGGGSGG	4
CAT2200a scFv VL-VH (16)	4x G4S	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	2
CAT2200a spFv VL-VH (17)	8+4+4	GGSGGSGGCPPCGSGG	5
CAT2200b scFv VL-VH (18)	4x G4S	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	2
CAT2200a spFv VL-VH (19)	9+4+4	GGGSGGSGGCPPCGSGG	6
CAT2200a scFv VH-VL (20)	4x G4S	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	2
CAT2200b spFv VH-VL (21)	9+4+4v2	GGGSGGGSGCPCGGGG	7

Таблица 5.

Название молекулы	Белковая последовательность	SEQ ID NO:
GLk1 scFv VL-VH	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQK PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGTKVEIKRGGGSGGGG SGGGGSGGGGSEVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGF TFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYDGI YGELDFWGQGLVTVSSGHHHHHH	8
GLk1 spFv VL-VH	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQK PGCAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGTKVEIKRGGGSGGSGG CPPCGGSGGEVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTF SSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGR RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYDGIYG ELDFWGCGLVTVSSGHHHHHH	9
GLk1 scFv VH-VL	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR QAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNK	10

	<p>NTRYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYDGIYGELDFWGGQ TLVTVSSAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSS LSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QSYSTPLTFGQGTKVEIKRGHHHHHH</p>	
GLk1 spFv VH- VL	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR QAPGCGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNK NTRYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYDGIYGELDFWGGQ TLVTVSSGGGSGGGSGGCPPCGGSGGDIQMTQSPSSLSAS VGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASS LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYS TPLTFGCGTKVEIKRGHHHHHH</p>	11
GLk2 scFv VL- VH	<p>EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLISR LEPEDFAVYYCQQDYGFPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSG YSFTSYWISWVRQMPGKGLEWMGIIDPSDSDTRYSPSF QQQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCCARGDGS TDLDYWGQGTLLTVSSGHHHHHH</p>	12
GLk2 spFv VL- VH	<p>EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQ KPGCAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLISR LEPEDFAVYYCQQDYGFPWTFGQGTKVEIKGGGSGGSG GCPPCGGSGGEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYS FTSYWISWVRQMPGKGLEWMGIIDPSDSDTRYSPSFQ QQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCCARGDGST LDYWGCGTLLTVSSGHHHHHH</p>	13
GLk2 scFv VH- VL	<p>EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWISWVR QMPGKGLEWMGIIDPSDSDTRYSPSFQQQVTISADKSI TAYLQWSSLKASDTAMYCCARGDGSTDLDYWGQGTLL TVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSL SPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQ QDYGFPWTFGQGTKVEIKGHHHHHH</p>	14

GLk2 spFv VH-VL	EVQLVQSGAEVKKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWISWVR QMPGCGLEWMGIIDPSDSDTRYSPSFQGGQVTISADKSI TAYLQWSSLKASDTAMYCCARGDGDSTDLDYWGQGT LTVVSSGGGSGGCPPCGGGSGGEIVLTQSPGTLSPGER ATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA TGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQDYGF PWTFGCGTKVEIKGHHHHHH	15
CAT2200a scFv VL-VH	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSLANYVQWYQ QRPGSSPTIVIFANNQRPSGVPDRFSGSIDSSNSASLTIS GLKTEDEADYYCQTYDPYSVVFVGGGTKLTVLGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFGFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYY ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RDLIHGVTRNWXGQGT LTVVSSGHHHHHH	16
CAT2200a spFv VL-VH	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSLANYVQWYQ QRPGCSPTIVIFANNQRPSGVPDRFSGSIDSSNSASLTIS GLKTEDEADYYCQTYDPYSVVFVGGGTKLTVLGGSGGS GGCPPCGSGGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFG FSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVK GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLIHG VTRNWXGCGTLTVVSSGHHHHHH	17
CAT2200b scFv VL-VH	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSLANYVQWYQ QRPGQSPTIVIFANNQRPSGVPDRFSGSIDSSNSASLTIS GLKTEDEADYYCQTYDPYSVVFVGGGTKLTVLGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFGFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYY ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RDLIHGVTRNWXGQGT LTVVSSGHHHHHH	18
CAT2200a spFv VL-VH	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSLANYVQWYQ QRPGCSPTIVIFANNQRPSGVPDRFSGSIDSSNSASLTIS GLKTEDEADYYCQTYDPYSVVFVGGGTKLTVLGGGSGG SGGCPPCGSGGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF GFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLIH	19

		GVTRNWGCGTLVTVSSGHHHHHH	
CAT2200a	scFv	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFGFSSYAMSWV RQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLIHGVTRNWGQG TLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SESPGKTVTISCTRSSGSLANYVQWYQQRPGSSPTIVIF ANNQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADY YCQTYDPYSVVFVGGGTKLTVLGHHHHHH	20
CAT2200b	spFv	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFGFSSYAMSWV RQAPGCGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLIHGVTRNWGQG TLVTVSSGGGGSGGGSGCPPCGGGGNFMLTQPHSVSESP GKTVTISCTRSSGSLANYVQWYQQRPGQSPTIVIFANN QRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQT YDPYSVVFVGGGTKLTVLGHHHHHH	21

[0688] Все молекулы scFv и spFv, за исключением CAT2200a scFv VL-VH, клонировали в экспрессионный вектор млекопитающих, управляемый промотором CMV. Эти конструкции трансфицировали в клетки Expi293 с использованием протоколов производителя и клетки культивировали в течение 5 дней. Каждый белок очищали из осветленного супернатанта на 1 мл колонке His-TRAP HP (GE Healthcare) посредством системы AKTAPRESS (GE Healthcare). Подготавливали колонку с градиентом 0-100% элюирующего буфера (промывочный буфер: 50 mM трис pH 7,5, 500 mM NaCl, 20mM имидазола; Элюирующий буфер: 50 mM трис, pH 7,5, 500 mM NaCl, 500 mM имидазола) для удаления слабо связанного никеля и затем повторного уравнивания в DPBS. Очищенный супернатант сначала доводили до 50 mM трис, pH 7,5 и 20 mM имидазола, а затем загружали в 1 мл колонку HisTRAP HP при 4°C 0,8 мл/мин. Затем колонку промывали PBS до получения стабильной базовой линии. Затем колонку дополнительно промывали 20 CV промывочного буфера, элюировали элюирующим буфером в отдельном петлевом дозаторе и обессоливали в 1 x DPBS в обессоливающей колонке 26/10 HiPrep и собирали фракции. Фракции, содержащие очищенный белок, затем объединяли и концентрировали. Белки Glk2 scFv и spFv диализировали в DPBS для измерений термической стабильности (DSC и NanoDSF) и 25 mM трис, pH 7,5 и 100 mM NaCl для других исследований. Другие белки scFv и spFv диализируют в 25 mM MES, pH 6,0 и 100 mM NaCl.

[0689] CAT2200a scFv VL-VH приобретали у производителя. Концентрация составляла 0,77 мг/мл в DPBS, pH 7,2. Мутант IL-17 (12-132 с мутациями K70Q A132Q C106S, IL-17 далее для простоты (**SEQ ID NO: 22**) приобретали у Accelagen (Калифорния, США). Белок повторно отсоединяли от тельца включения *E. coli*, следуя собственному

протоколу рефолдинга, и предоставляли в концентрации 1,50 мг/мл в 20 mM NaCl, 20 mM MES, pH 6,0.

SEQ ID NO: 22 (мутант IL-17A)

MNSEDKNFPRTVMVNLNIHNRNTNTNPKRSSDYYNRSTSPWNLHRNEDPERYPS
VIWEAQCRHLGCINADGNVDYHMNSVPIQQEILVLRREPPHSPNSFRLEKILVSVGCTCV
TRIVHHVQ

6.2.1 Термостабильность полученных молекул scFv и spFv

[0690] Термостабильность молекул scFv и spFv исследовали с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC). Белки scFv и spFv диализировали в течение ночи с 1 x DPBS (Gibco) для GLk1 и CAT2200a/CAT2200b или MES (25 mM MES, pH 6,0, 100 mM NaCl) для GLk2. Затем диализирующий буфер фильтровали через фильтр 0,22 микрон и использовали в качестве эталонного раствора и для холостых проб буфер-буфер в эксперименте DSC. Белки разводили до ~0,5 мг/мл в отфильтрованном буфере и 400 мкл каждого белка или образца буфера загружали в 96-луночный планшет с глубокими лунками (MicroLiter Analytical Supplies, 07-2100) и выдерживали при 4°C в выдвижном ящике автодозатора в течение эксперимента. Для выполнения экспериментов DSC использовали капилляр MicroCal DSC с автодозатором (Malvern). Сканирование DSC выполняли от 25-95°C при скорости сканирования 60 °C/ч без повторного сканирования образцов. Обратную связь не выбирали и устанавливали период фильтрации на 15 с. После каждого образца клетки очищали с помощью 10% Contrad-70 и анализировали холостую пробу буфер-буфер. Анализ данных проводили с использованием Origin 7.0 с помощью дополнительного устройства для автоматизированного анализа MicroCal VP-Capillary DSC (Malvern). Исходный диапазон и тип выбирали вручную, а затем вычитали. Предыдущую буферную холостую пробу вычитали из кривой образца с последующей зависимой от концентрации нормализацией. Профили термического плавления анализировали с использованием переходов как между 2 состояниями, так и не между 2 состояниями. Подборы с двумя состояниями (один переход) плохо согласовались с экспериментальными кривыми. Таким образом, с двумя переходами (Tm1 и Tm2) вычисления проводились путем подборов вручную с числом состояний, отличающимся от двух. Данные Tm показаны в **таблице 6**. Профили DSC всех белков scFv и spFv демонстрировали асимметрию, при которой подбор возможен только с числом состояний, отличающимся от двух. Таким образом, для каждого scFv или spFv были представлены два перехода (Tm1 и Tm2) (**Таблица 6**). Наиболее вероятно, эти два перехода соответствуют плавлению Tm доменов VL и VH соответственно. В целом, после сравнения разница между scFv и spFv для Tm1 или Tm2 соответствует увеличению примерно на 10 °C при сшивании, независимо от Tm исходного scFv. Существует только одно исключение, в частности, случай Glk2 scFv и spFv (ориентация VH-VL), когда разница составляла ~7 °C. Вероятно, это связано с более коротким линкером 6+4+6, который может вызывать небольшое напряжение в геометрии сшивания. Тот факт, что $\Delta Tm1$ (VL) и $\Delta Tm2$ (VH) были почти идентичными, указывает на то, что сшивание приводит к стабилизации самих доменов в дополнение к усилению

взаимодействий VL/VH. В альтернативном варианте осуществления более сильные взаимодействия VH/VL передают стабилизирующие эффекты в стабилизацию доменов VL/VH. Таким образом, сшивание, как описано в данной работе, значительно повышает стабильность scFv.

Таблица 6.

Название молекулы (SEQ ID NO:)	Тип линкера	Стабильность при DSC						
		Tm1 (°C)	SD(Tm1) (°C)	Tm2 (°C)	SD(Tm2) (°C)	ΔTm_1 (°C)	ΔTm_2 (°C)	$\Delta(Tm_1 - Tm_2)$
GLk1 scFv VL-VH (8)	4x G4S	68,9	0,2	72,1	0,0	9,7	9,0	3,3
GLk1 spFv VL-VH (9)	9+4+5	78,5	0,2	81,1	0,0			2,6
GLk1 scFv VH-VL (10)	4x G4S	67,7	0,3	70,9	0,0	10,0	9,2	3,3
GLk1 spFv VH-VL (11)	9+4+5	77,7	0,2	80,1	0,1			2,4
GLk2 scFv VL-VH (12)	4x G4S	56,6	0,2	58,6	0,1	10,9	10,5	2,0
GLk2 spFv VL-VH (13)	9+4+5	67,6	0,3	69,2	0,1			1,6
GLk2 scFv VH-VL (14)	4x G4S	56,4	0,1	58,3	0,1	7,3	7,1	1,9
GLk2 spFv VH-VL (15)	6+4+6	63,7	0,3	65,4	0,1			1,7
CAT2200a scFv VL-VH (16)	4x G4S							
CAT2200a spFv VL-VH (17)	8+4+4							
CAT2200b scFv VL-VH (18)	4x G4S	54,7	0,3	57,6	0,0	12,0	11,7	2,9
CAT2200a spFv VL-VH (19)	9+4+4	66,7	0,3	69,3	0,0			2,6
CAT2200a scFv VH-VL (20)	4x G4S	52,6	0,3	56,4	0,0	12,9	11,4	3,8
CAT2200b spFv VH-VL (21)	9+4+4	65,5	0,3	67,9	0,0			2,4
		ΔTm_1 (°C): Разница в Tm1 (spFv) и Tm1 (scFv) ΔTm_2 (°C): Разница в Tm2 (spFv) и Tm2 (scFv) $\Delta(Tm_1 - Tm_2)$: Разница Tm2 и Tm1 scFv или spFv						

[0691] SpFv CAT2200 тестировали на их связывание с IL-17. Связывание было сопоставимым с scFv CAT2200.

6.3 Пример 3. Проверка правильности сшивания путем кристаллизации полученных молекул scFv и spFv

[0692] Белки концентрировали в их соответствующих буферах: GLk1 spFv VL-VH до 8,67 мг/мл в 25 mM MES, pH 6,0, 100 mM NaCl; GLk1 spFv VH-VL до 5 мг/мл в 25 mM MES, pH 6,0, 100 mM NaCl; GLk2 spFv VH-VL до 8,66 мг/мл в 25 mM трис, pH7,5, 100 mM NaCl; cat2200b spFv VH-VL до 25 mM MES, pH 6,0, 100 mM NaCl. Кристаллизацию проводили для каждого белка в формате сидячей капли в лотках для кристаллизации Corning 3550 с использованием робота Mosquito. Каждая лунка содержала 100 нл белка и 100 нл резервуарного раствора, инкубацию проводили против 70 мкл резервуара при 20 °С. Резервуарные растворы представляют собой индивидуальные условия ИН1 и ИН2, а также PEG Ion Screen HT (Hampton Research). С целью оптимизации были предприняты попытки уточнения некоторых начальных условий с помощью вариаций компонентов резервуара. Для некоторых из scFv и белков spFv были получены кристаллы качества дифракции. В **таблице 7** показаны сводные показатели используемых условий. Кристаллы замачивали на несколько секунд в маточном растворе с добавлением 20% глицерина и мгновенно замораживали в жидком N₂. Данные рентгеноструктурного анализа регистрировали в IMCA-CAT Beamline 17ID в лаборатории Argonne National Lab.

Таблица 7.

Название молекулы	Белок	Условие кристаллизации	Дисульфиды?	Разрешение (Å)
GLk1 spFv VL-VH	8,67 мг/мл, 25 mM MES, pH 6,0, 100 mM NaCl	0,1 M Na ацет. 4,5 pH, 18% м/об PEG 3350, 1 M LiCl	Да	1,65
Glk1 spFv VH-VL	5 мг/мл, 25 mM MES, pH 6,0, 100 mM NaCl	0,1 M MES 6,5 pH, 5% об/об PEG 400, 0,75 M (NH ₄) ₂ SO ₄	Да	2,10
GLk2 spFv VH-VL	8,66 мг/мл, 25 mM Tris, pH 7,5, 100 mM NaCl	0,1 M Na ацет. 4,5 pH, 0,75 M (NH ₄) ₂ SO ₄	Да	1,50
CAT2200b spFv VH-VL	4,91 мг/мл, 25 mM MES, pH 6,0, 100 mM NaCl	0,1 M Na ацет. 4,5 pH, 1,5 M (NH ₄) ₂ SO ₄	Да	2,40
Комплекс CAT2200a scFv VL-VH/IL-17	2,69 мг/мл, 20 mM HEPES, pH 7,5, 50 mM NaCl	0,1 M трис, pH 8,5, 18% PEG3K, 0,2 M LiSO ₄	без сшивания	2,30
Комплекс CAT2200a spFv VL-VH/IL-17	6,00 мг/мл, 20 mM HEPES, pH 7,5, 50 mM NaCl	15,5% ПЭГ 3350, 0,4 M NaH ₂ PO ₄	Да	2,00

6.3.1 Кристаллизация CAT2200a scFv VL-VH и CAT2200a spFv VL-VH в комплексе

с IL-17

[0693] Комплекс IL-17/ CAT2200a scFv VL-VH получали путем смешивания 333 мкл IL17 (**SEQ ID NO: 22**) (1,5 мг/мл) с 1,74 мл Cat2200a scFv (0,69 мг/мл) и инкубировали в течение 3 часов при 4 °С. Смесь концентрировали с помощью концентратора Amicon Ultra с граничным значением 10 кДа до объема около 400 μл и загружали в колонку Superdex75, уравновешенную в 250 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,5. Фракции, соответствующие комплексу, объединяли и концентрировали до объема 150 μл. Образец разводили и концентрировали 4 раза: добавление 350 μл 50 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,5 и концентрирование до чуть менее 150 μл. Объем доводили до ~105 μл, а концентрацию доводили до 2,69 мг/мл. Кристаллизацию проводили в формате сидячей капли с использованием робота для кристаллизации Mosquito с 150 нл белка+150 нл резервуар в планшетах Corning 3550 против резервуар 80 μл, который представляет собой набор буферных и осаждающих условий, установленных заранее в собственной лаборатории. Планшеты инкубировали при 20 °С. С помощью одного из условий (ацетат Na, pH 4,5, 25% PEG 3К, 0,2М ацетата Am) были получены очень малые кристаллы. Эти образцы собирали и превращали в центры кристаллизации с использованием Hampton Seed Bead в 100 μл 27% PEG 3350, 200 mM ацетата аммония, 100 mM ацетата натрия, pH 4,5 в пробирке Hampton Seed Bead.

[0694] Кристаллы качества дифракции получали с помощью той же процедуры, за исключением добавления вышеуказанных центров: 150 нл белка+100 нл резервуара+50 мкл центров кристаллизации. Кристаллы выращивали из 0,1 М трис 8,5, 18% PEG3К, 0,2 М LiSO₄ и переносили в синтетический маточный раствор (0,1 М трис, pH 8,5, 10% PEG 3350, 0,2 М LiSO₄ и 20% глицерина) и мгновенно замораживали в жидком азоте. Данные рентгеноструктурного дифракционного анализа регистрировали в IMCA-CAT ID17 в лаборатории Argonne National Laboratory.

[0695] Комплекс VL-VH IL-17/CAT2200a получали путем смешивания 167 μл IL-17 (250 мкг) с 154 μл MSCW274 (467 мкг в 250 mM NaCl, 20 mM MES, pH 6,5) и инкубировали при 4°С в течение ночи. Смесь концентрировали в 10 кДа концентраторе MWCO Amicon Ultra 0,5 мл до ~100 μл, затем многократно разводили и концентрировали 5 раз: концентрировали до ~150 μл и добавляли 350 μл 50 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,5. Конечный объем составлял 100 μл и концентрацию комплекса определили как 6,0 мг/мл. Кристаллизацию проводили аналогично комплексу scFv/IL-17 в сидячих каплях с использованием робота Mosquito. Сидячие капли состояли из 150 нл белка+120 нл резервуара+30 нл центров кристаллизации (вышеуказанного scFv/IL-17). Резервуарный раствор представлял собой набор условий, варьирующих концентрацию и соли PEG 3350. Кристаллизационные пластины инкубировали при 20 °С. Мелкие кристаллы получали из 15,5% PEG 3350, 0,4 М NaH₂PO₄. Кристаллы переносили в 16% PEG 3350, 0,2 М NaH₂PO₄, 20% глицерина и мгновенно замораживали LN2. Данные рентгеноструктурного дифракционного анализа регистрировали в IMCA-CAT ID17 в лаборатории Argonne National Laboratory.

[0696] Все данные рентгеноструктурного дифракционного анализа обрабатывали с помощью XDS (Kabsch *et al.* (2010) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66(Pt. 2):125-132; Monsellier and Bedouelle (2006) *J Mol Biol* 362:580-593) and CCP4 (Collaborative Computational Project, N. (1994) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 53:240-255). Все кристаллические структуры были разрешены путем молекулярной замены (MR) с использованием Phaser (Read (2001) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57(Pt 10):1373-1382) с моделями гомологии, образуемыми в МОЕ (Монреаль, Канада), за исключением комплекса scFv CAT2200a scFv VL-VH/IL-17, для которого в качестве моделей поиска использовали структуру pdb id 2vxs (Gerhardt *et al.* (2009) *J Mol Biol* 394:905-921). Структурные модели уточняли в PHENIX (Adams *et al.* (2004) *J Synchrotron Radiat* 11(Pt 1):53-55) и вручную регулировали в Coot (Emsley *et al.* (2010) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66(Pt 4):486-501). Фигуры молекулярных графических изображений были получены в PyMol ([www_schrodinger_com](http://www.schrodinger.com)).

6.3.2 Структуры

[0697] Структуры несвязанных молекул scFv и spFv показаны на ФИГ. 8, ФИГ. 9, ФИГ. 10 и ФИГ. 11. На ФИГ. 8 показана структура GLk1 spFv VL-VH. На ФИГ. 9 показана структура GLk1 spFv VH-VL. На ФИГ. 10 показана структура GLk2 spFv VH-VL. На ФИГ. 11 показана структура CAT2200b spFv VH-VL. Структуры соответствовали типичным структурам Fv с обеими доменами VL и VH, упакованными друг с другом. Как правило, большинство линкерных остатков упорядочивали и разделяли на карты распределения электронной плотности. Дисульфидные связи между скобками и якорными точками, как правило, хорошо упорядочены в обеих ориентациях VL-VH. В дополнение к несвязанным структурам scFv и spFv авторы также пытались выявить любое структурное влияние на связывание антигена. Вариантные молекулы scFv и spFv CAT2200 кристаллизовали в комплексе с его когнатной мишенью, IL-17. Для кристаллизованных вариантов scFv и spFv CAT2200 структуры были почти идентичными со связанной мишенью и без нее (ФИГ. 12, ФИГ. 13, ФИГ. 14). На ФИГ. 12 показано сравнение несвязанной CAT2200b spFv VH-VL по сравнению с CAT2200a scFv VL-VH, связанной с IL-17. На ФИГ. 13 показано сравнение вида спереди структур несвязанной CAT2200b spFv VH-VL по сравнению с CAT2200a spFv VL-VH, связанной с IL-17. На ФИГ. 14 показано сравнение вида сзади структур несвязанной CAT2200b spFv VH-VL по сравнению с CAT2200a spFv VL-VH, связанной с IL-17. Структуры также идентичны независимо от ориентации или наличия или отсутствия скобок. Среднеквадратичное отклонение для всех соответствующих атомов Ca между парами структур было очень малым: 0,41 Å между несвязанным spFv-VH-VL и связанными с антигеном scFv-VL-VH (ФИГ. 12), 0,46 Å между несвязанными spFv-VH-VL и spFv-VL-VH (ФИГ. 13 и ФИГ. 14 соответственно) и 0,37 Å между связанным scFv и связанным spFv. Структурные доказательства показывают, что сшивание работает как планировалось. Кроме того, сшивание не влияет на доменные структуры VL и VH или относительную упаковку VL/VH.

6.4 Пример 4. Конструкция дополнительных якорных точек

[0698] Подход, описанный в примере 1, использовали для идентификации любых дополнительных якорных точек для сшивания. Были идентифицированы следующие якорные точки:

[0699] Для ориентации VL-линкер-VH: положения VL 42, 45 и 39 по системе Чотиа и положения VH 105, 5 и 3 по системе Чотиа. На **ФИГ. 6** остатки VL на GLk1 VL представляют собой K42, K45, K39 и остатки VH на GLk1 представляют собой Q105, L5 и Q3. Формы скобок между любыми указанными положениями.

[0700] Для ориентации VH-линкер-VL: положения VH 43, 40 и 46 по системе Чотиа, положения VL 102, 5 и 3 по системе Чотиа, формы скобок между любым из положений.

[0701] spFv, имеющие якорные точки, описанные в данном примере, клонировали, экспрессировали и испытывали на образование скобок и их термостабильность с использованием анализов, описанных в настоящем документе и в примере 2.

6.5 Пример 5. Полусшивание

[0702] Получают и экспрессируют конструкции, содержащие одну скобку, либо между VH и линкером, либо между VL и линкером. Полученные конструкции экспрессируют, очищают и анализируют с использованием способов, описанных в настоящем документе.

6.6 Пример 6. Мультиспецифические конструкции, содержащие spFv

[0703] Примеры мультиспецифических связывающих молекул, содержащих структуры spFv, предложенные в настоящем документе, были сконструированы и протестированы в данном примере. В частности, биспецифические антитела и контрольные молекулы, полученные из последовательностей связывания мишеней, представленных в **таблице 8**, временно экспрессировали в суспензионных культурах CHO в бессывороточной/свободной от компонентов животного происхождения среде и очищали с помощью аффинной хроматографии на основе связывания с белком А с последующей препаративной эксклюзионной хроматографией (SEC) на колонке SUPERDEX 200 10/300 GL (GE Healthcare) с использованием прибора ÄKTA PURE (GE Healthcare). Тяжелые цепи, содержащие мутации «выступ во впадину» (KiH) для стимуляции гетеродимеризации (Ridgway *et al.*, *Protein Eng.* 9(7):617-21 (1996); Atwell *et al.*, *J. Mol. Biol.* 270(1):26-35 (1997); Merchant *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 16(7):677-81 (1998)). Антитела содержали Fc IgG1сигма, содержащий набор из семи мутаций Fc: L234A, L235A, G237A, P238S, H268A, A330S, и P331S, по сравнению с IgG1 дикого типа для снижения взаимодействий рецептора Fc (Tam *et al.*, *Antibodies* (2017)).

[0704] Биспецифические антитела получали с мутациями IgG1сигма и мутациями KiH.

Таблица 8. Последовательности связывания мишеней, используемые для конструкций примера 6.

Название антитела/лиганда	Мишень/рецептор	VH или цепь 1	VL или цепь 2
LTBRmAb1 (BHA10)	LTBR человека	WO2004002431/SEQ ID NO: 69	WO2004002431/SEQ ID NO: 70

EDBmAb1* (L19)	дополнительный домен В человека (EDB) фибронектина	WO9745544/SEQ ID NO: 71	WO9745544/SEQ ID NO: 72
B21M	RSV	Vafa O <i>et al.</i> (2014) Methods 65(1)/SEQ ID NO: 73	Vafa O <i>et al.</i> (2014) Methods 65(1)/SEQ ID NO: 74
MSLNmAb1	мезотелин человека	EP2322560/SEQ ID NO: 75	EP2322560/SEQ ID NO: 76

*: EDBmAb1(WO9745544), использованный в настоящем документе представляет собой антитело к ED-B, которое было протестировано в клинике, и другие антитела, связывающиеся с ED-B или смежными доменами, были описаны ранее (Carnemolla *et al. Int. J. Cancer* 68:397-405 (1996))

[0705] Последовательности в **таблице 8** являются следующими:

SEQ ID NO: 69 (VH BHA10)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYFTFTYYLHWVRQAPGQGLEWMGWIY
PGNVHAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSWEGFPYWGQGT
TVTVSS

SEQ ID NO: 70 (VL BHA10)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCKASQNVGINVAWYQQKPKAPKSLISSASYRY
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYDTPFTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 71 (VH L19)

EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSS
GTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGT
VTVSS

SEQ ID NO: 72 (VL L19)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRA
TGIPDRFSGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 73 (VH B21M)

QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIYW
DDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYYCARLYGFYGFAYWGQ
GTLVTVSS

SEQ ID NO: 74 (VL B21M)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVSYNGISYMHYQQKPGQPPKLLIYA
ASNPEGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQIIEPWTFTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 75 (VH MSLNmAb1)

QVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKSLEWIGLITPY
NGASSYNQKFRGKATLTVDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAVYFCARGGYDGRGFDYWGS
GTPVTVSS

SEQ ID NO: 76 (VL MSLNmAb1)

DIELTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHYQQKSGTSPKRWIYDTSKLAS
GVPGRFSGSGSGNSYSLTISSEVAEDDATYYCQQWSKHPLTFGSGGTKVEIK

[0706] Концентрацию белка определяли путем измерения поглощения при 280 нм (OD280) и определяли выход очистки. Аналитическая SEC была выполнена с использованием колонки Bio SEC-5 (Agilent, размер частиц 5 мкм, 300 Å) на системе ВЭЖХ Thermo VANQUISH. 10 мкл очищенного белка загружали в колонку и регистрировали элюирование по OD280.

[0707] В **таблице 9** представлен обзор структурных свойств биспецифических антител и контрольных молекул, описанных в данном примере. Молекулы, выделенные жирным шрифтом, представляют собой примеры молекул в соответствии с изобретением, в то время как другие являются контролями для различных аспектов. В **таблице 10** показаны структурные свойства другого сравнительного биспецифического антитела, нацеленного на LTBR и мезотелин (опухолеспецифический антиген, не присутствующий во внеклеточном матриксе), как описано в примере 9.

Таблица 9. Обзор структурных свойств биспецифических антител к EDB/LTBR и контрольных молекул

	Название	Тип	Сайты связывания			Домен Fc	Характеристики scFv			Комментарии
			LTBRmAb 1	EDBmAb 1	B21M (изотипический контроль мАт)	Белок А мут.*	Сшитый линкер	Дисульфидный стабилизированный	Ориентация	
Асимметричные антитела, Формат 2:1	COVA1480	2:1	1 (scFv)	2 (мАт)	-	Да	Да	-	VH-VL	scFv, слитый с N-конц HC EDBmAb1
	COVA1481	2:1	1 (scFv)	2 (мАт)	-	Да	Да	-	VL-VH	scFv, слитый с N-конц HC EDBmAb1
	COVA1482	2:1	1 (scFv)	2 (мАт)	-	Да	Да	-	VH-VL	scFv, слитый с C-конц HC EDBmAb1
	COVA1483	2:1	1 (scFv)	2 (мАт)	-	Да	Да	-	VL-VH	scFv, слитый с C-конц HC EDBmAb1
	COVA1484	2:1	1 (scFv)	-	2 (мАт)	Да	Да	-	VH-VL	LTBR/нулевой контроль с COVA1480
	COVA1485	2:1	1 (scFv)	-	2 (мАт)	Да	Да	-	VL-VH	LTBR/нулевой контроль с COVA1481
	COVA1486	2:1	1 (scFv)	-	2 (мАт)	Да	Да	-	VH-VL	LTBR/нулевой контроль с COVA1482 и с COVA14146
	COVA1487	2:1	1 (scFv)	-	2 (мАт)	Да	Да	-	VL-VH	LTBR/нулевой контроль с COVA1483
	COVA1410 7	2:1	1 (scFv)	2 (мАт)	-	Да	Да	Нет	VH-VL	scFv (C-конц слитый с HC EDBmAb1) содержит мутации для пониженной аффинности к LTBR (VL3: Y36F_S49Y_F87)

	COVA1410 8	2:1	1 (scFv)	2 (mAb)	-	Да	Да	Нет	VH-VL	scFv (C-конец слитый с HC EDBmAb1) содержит мутации для пониженной аффинности к LTBR (VH_CDR1_Y33A)
	COVA1413 3	2:1	1 (scFv)	2 (mAb)	-	Нет	Да	Нет	VH-VL	scFv, слитый с C-конец HC EDBmAb1
	COVA1413 6	2:1	1 (scFv)	-	2 (mAb)	Нет	Да	Нет	VH-VL	LTBR/нулевой контроль с COVA14133

*: мутации в части Fc для прекращения связывания с белком A и облегчения очистки гетеродимеров, описанных в WO2010151792.

Таблица 10. Обзор структурных свойств биспецифического антитела к MSLN/LTBR

Название	Тип	Сайты связывания		Домен Fc	Характеристики scFv			Комментарии
		LTBR mAb1	MSL NmAb1		Белок мут. А	Сшитый линкер	Дисульфидный стабилизированный	
COVA 14146	2:1	1 (scFv)	2 (mAb)	Да	Да	Нет	VH-VL	С-концевое слияние HC scFv, полученного из LTBRmAb1, с MSLNmAb1. Молекула изотипического контроля для данного конструкта представляет собой COVA1486

[0708] Асимметричные антитела с стехиометрическим составом 2:1 (все IgG1 сигма, все с мутациями KiH), перечисленные выше, получали следующим образом:

i. COVA1484 получали путем совместной экспрессии тяжелой цепи антитела к RSV B21M, несущей N-концевой сшитый scFv BHA10 (ориентация VH-VL SEQ ID NO: 77), слитый с (SEQ ID NO: 78, содержащей SEQ ID NO: 79) с тяжелой цепью (HC; SEQ ID NO: 80) и легкой цепью (LC; SEQ ID NO: 81) антитела к RSV B21M (**ФИГ. 15А**).

SEQ ID NO: 77 [сшитый scFv BHA10 (VH-VL)]

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTTYYLHWVRQAPGCGLEWMGWIY
PGNVHAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARSWEGFPYWGQGT
TVTIVSSGGGSGGGSGCPPCGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGINVAWY
QQKPGKAPKSLISSASYRYSRVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQYDTPFT
FGCGTKVEIK

SEQ ID NO: 78 (HC B21M N-конец сшитый BHA10 (VH-VL), IgG1s, выступ, с мутациями pA)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTTYLHWVVRQAPGCGLEWMGWIY
 PGNVHAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSWEGFPYWGQGT
 TVTVSSGGGSGGGSGCPCGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGINVAWY
 QQKPGKAPKSLISSASYRYSQVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYDTPFT
 FCGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGITLKESGPTLVKPTQTLTLCTF
 SGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVL
 MTNMDPVDATYYCARLYGFTYGFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
 TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
 YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRT
 PEVTCVVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
 LNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGF
 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE
 ALHNRFTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 79 (HC B21M (RSV) IgG1s выступ с мутациями pA)

QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIYW
 DDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARLYGFTYGFAYWQ
 GTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHT
 FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
 PAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREP
 QVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 80 (HC B21M (RSV) IgG1s впадина)

QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIYW
 DDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARLYGFTYGFAYWQ
 GTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHT
 FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
 PAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREP
 QVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
 LVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 81 [LC B21M (RSV)]

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVDYNGISYMHYQQKPGQPPKLLIYA
 ASNPEGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQIIEPWTFTGQGTKVEIKRTV
 AAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVCLLNRFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
 DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ii. COVA1485 получали путем совместной экспрессии тяжелой цепи антитела к RSV B21M, несущей N-концевой сшитый scFv BHA10 (ориентация VH-VL SEQ ID NO: 82),

LVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 81 [LC B21M (RSV)]

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVDYNGISYMHWYQQKPGQPPKLLIYA
ASNPESEGVDFRSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQIIEPWTFTGQGTGKVEIKRTV
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYFREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYLSSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

iii. COVA1486 получали путем совместной экспрессии тяжелой цепи антитела к RSV B21M, несущей C-концевой сшитый scFv BHA10 (ориентация VH-VL SEQ ID NO: 77), слитый с (SEQ ID NO: 84, содержащей SEQ ID NO: 79) с тяжелой цепью (HC; SEQ ID NO: 80) и легкой цепью (LC; SEQ ID NO: 81) антитела к RSV B21M (**ФИГ. 15C**).

SEQ ID NO: 77 [сшитый scFv BHA10 (VH-VL)]

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSCKASGYFTFTYYLHWVRQAPGCGLEWMGWIIY
PGNVHAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSWEGFPYWGQGT
TVTSSGGGSGGGSGCPCGGGGDIQMTQSPSSLSASVDRVTITCKASQNVGINVAWY
QQKPGKAPKSLISSASYRYSQVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYDTPFT
FGCGTKVEIK

SEQ ID NO: 84 (HC B21M C-конец сшитый BHA (VH-VL), IgG1s, выступ, с мутациями pA)

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIYW
DDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARLYGFYGFAYWGQ
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHT
FPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGS
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSCKASGYFTFTYYLHWVRQAPGCGLEWMGWIIYPGNV
HAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSWEGFPYWGQGTTVT
SSGGGSGGGSGCPCGGGGDIQMTQSPSSLSASVDRVTITCKASQNVGINVAWYQQK
GKAPKSLISSASYRYSQVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYDTPFTFGCG
TKVEIK

SEQ ID NO: 79 (HC B21M (RSV) IgG1s выступ с мутациями pA)

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIYW
DDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARLYGFYGFAYWGQ
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHT
FPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 80 (HC B21M (RSV) IgG1s впадина)

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIYW
 DDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARLYGFYGFAYWGG
 GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
 FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
 PAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREP
 QVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
 LVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 81 [LC B21M (RSV)]

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVDYNGISYMHYQKPKGQPPKLLIYA
 ASNPESEGVDFRFGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQIEDPWTFTGQGTKVEIKRTV
 AAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
 DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

iv. COVA1487 получали путем совместной экспрессии тяжелой цепи антитела к RSV B21M, несущей С-концевой сшитый scFv BHA10 (ориентация VL-VH SEQ ID NO: 82), слитый с (SEQ ID NO: 85, содержащей SEQ ID NO: 79) с тяжелой цепью (HC; SEQ ID NO: 80) и легкой цепью (LC; SEQ ID NO: 81) антитела к RSV B21M (**ФИГ. 15D**).

SEQ ID NO: 82 [сшитый scFv BHA10 (VL-VH)]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGINVAWYQKPKGCAPKSLISSASYRY
 SGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYDTPFTFGQGTKVEIKGGSGGSGGC
 PPCGSGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYFTFTYYLHWVRQAPGQGLEWMG
 WIYPGNVHAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSWEGFPYWG
 CGTTVTVSS

SEQ ID NO: 85 (HC B21M С-конец сшитый BHA (VL-VH), IgG1s, выступ, с мутациями pA)

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIYW
 DDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARLYGFYGFAYWGG
 GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
 FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
 PAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREP
 QVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGS
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGINVAWYQKPKGCAPKSLISSASYRYSGVPS
 RFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYDTPFTFGQGTKVEIKGGSGGSGGCPPCGS
 GGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYFTFTYYLHWVRQAPGQGLEWMGWIYPG
 NVHAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSWEGFPYWGCGTTV
 TVSS

SEQ ID NO: 79 (HC B21M (RSV) IgG1s выступ с мутациями pA)

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIYW
 DDDKRYNPSLKSRLLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARLYGFYGFAYWGO
 GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHT
 FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
 PAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREP
 QVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNRFQTKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 80 (HC B21M (RSV) IgG1s впадина)

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIYW
 DDDKRYNPSLKSRLLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARLYGFYGFAYWGO
 GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHT
 FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
 PAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREP
 QVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
 LVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQTKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 81 [LC B21M (RSV)]

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVVDYNGISYMHWYQQKPGQPPELLIYA
 ASNPESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQIIEPWTFTGQGTKVEIKRTV
 AAPSVMFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
 DSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

v. COVA1480 получали путем совместной экспрессии тяжелой цепи антитела к EDB EDBmAb1, несущей N-концевой сшитый scFv BHA10 (ориентация VH-VL SEQ ID NO: 77), слитый с (SEQ ID NO: 86, содержащей SEQ ID NO: 87) с тяжелой цепью (HC; SEQ ID NO: 88) и легкой цепью (LC; SEQ ID NO: 89) антитела к EDB EDBmAb1 (**ФИГ. 15E**).

SEQ ID NO: 77 [сшитый scFv BHA10 (VH-VL)]

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSKASGYFTFTYYLHWVRQAPGCGLEWMGWIIY
 PGNVHAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSWEGFPYWGQGT
 TVTVSSGGGSGGGSGCPCGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGINVAWY
 QKPKGKAPKSLISSASYRYSQVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYDTPFT
 FCGGTKVEIK

SEQ ID NO: 86 (HC L19 N-конец сшитый BHA10 (VH-VL), IgG1s, выступ, с мутациями pA)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSKASGYFTFTYYLHWVRQAPGCGLEWMGWIIY
 PGNVHAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSWEGFPYWGQGT
 TVTVSSGGGSGGGSGCPCGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGINVAWY
 QKPKGKAPKSLISSASYRYSQVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYDTPFT
 FCGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGLLVQPGGSLRLSCA
 ASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ

MNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
 GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV
 NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
 VVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
 YKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNRFTQKLSLSPGK

SEQ ID NO: 87 (HC L19 IgG1s выступ с мутациями pA)

VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSG
 TTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGLVTV
 SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
 SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA
 GASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
 CREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNRFTQKLSLSPGK

SEQ ID NO: 88 (HC L19 IgG1s впадина)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSS
 GTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGLVTV
 VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA
 AGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTL
 PPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
 VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK

SEQ ID NO: 89 (LC L19)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRA
 TGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI
 FPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYQFVYRQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
 STLTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

vi. COVA1481 получали путем совместной экспрессии тяжелой цепи антитела к EDB EDBmAb1, несущей N-концевой сшитый scFv BHA10 (ориентация VL-VH SEQ ID NO: 82), слитый с (SEQ ID NO: 90, содержащей SEQ ID NO: 87) с тяжелой цепью (HC; SEQ ID NO: 88) и легкой цепью (LC; SEQ ID NO: 89) антитела к EDB EDBmAb1 (**ФИГ. 15F**).

SEQ ID NO: 82 [сшитый scFv BHA10 (VL-VH)]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGINVAWYQQKPGCAPKSLISSASYRY
 SGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQYDTPFTFGQGTKVEIKGGSGGSGGC
 PPCGSGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTTYLHWVRQAPGQGLEWMG
 WIYPGNVHAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSWEGFPYWG
 CGTTVTVSS

SEQ ID NO: 90 (HC L19 N-конец сшитый BHA10 (VL-VH), IgG1s, выступ, с мутациями pA)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGINVAWYQQKPGCAPKSLISSASYRY
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYDTPFTFGQGTKVEIKGGSGGSGGC
PPCGSGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTTYYLHWVRQAPGQGLEWMG
WIYPGNVHAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARSWEGFPYWG
CGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA
SGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQM
NSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNRFT
QKLSLSPGK

SEQ ID NO: 87 (HC L19 IgG1s выступ с мутациями pA)

VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSG
TTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGLVTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA
GASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
CREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNRFTQKLSLSPGK

SEQ ID NO: 88 (HC L19 IgG1s впадина)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSS
GTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGLVTV
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA
AGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTL
PPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTV
VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK

SEQ ID NO: 89 (LC L19)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRA
TGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

vii. COVA1482 получали путем совместной экспрессии тяжелой цепи антитела к EDB EDBmAb1, несущей C-концевой сшитый scFv BHA10 (ориентация VH-VL SEQ ID NO:

77), слитый с (SEQ ID NO: 91, содержащей SEQ ID NO: 87) с тяжелой цепью (HC; SEQ ID NO: 88) и легкой цепью (LC; SEQ ID NO: 89) антитело EDBmAb1 к EDB (**ФИГ. 15G**).

SEQ ID NO: 77 [сшитый scFv BHA10 (VH-VL)]

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTTYLHWVRQAPGCGLEWMGWIY
PGNVHAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARSWEGFPYWGQGT
TVTSSGGGSGGGSGCPCGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGINVAWY
QKPKGKAPKSLISSASYRYSYGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYDTPFT
FGCGTKVEIK

SEQ ID NO: 91 (HC L19 C-конец сшитый BHA10 (VH-VL), IgG1s, выступ, с мутациями pA)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSS
GTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDNAVYYCAKPFYFDYWGQGT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
SCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNRFTQKSL
SLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTTYL
HWVRQAPGCGLEWMGWIYPGNVHAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSE
DNAVYYCARSWEGFPYWGQGTTVTSSGGGSGGGSGCPCGGGGDIQMTQSPSSLSA
SVGDRTITCKASQNVGINVAWYQKPKGKAPKSLISSASYRYSYGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISSLQPEDFATYFCQQYDTPFTFGCGTKVEIK

SEQ ID NO: 87 (HC L19 IgG1s выступ с мутациями pA)

VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSG
TTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDNAVYYCAKPFYFDYWGQGT
LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
SCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNRFTQKSL
SLSPGK

SEQ ID NO: 88 (HC L19 IgG1s впадина)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSS
GTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDNAVYYCAKPFYFDYWGQGT
LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
SCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
SSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTV

VDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 89 (LC L19)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRA
TGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYAPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

viii. COVA1483 получали путем совместной экспрессии тяжелой цепи антитела к EDB EDBmAb1, несущей C-концевой сшитый scFv BHA10 (ориентация VL-VH SEQ ID NO: 82), слитый с (SEQ ID NO: 92, содержащей SEQ ID NO: 87) с тяжелой цепью (HC; SEQ ID NO: 88) и легкой цепью (LC; SEQ ID NO: 89) антитело EDBmAb1 к EDB (**ФИГ. 15H**).

SEQ ID NO: 82 [сшитый scFv BHA10 (VL-VH)]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGINVAWYQQKPGCAPKSLISSASYRY
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYDTPFTFGQGTKVEIKGGSGGSGGC
PPCGSGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTTYLHWVRQAPGQGLEWMG
WIYPGNVHAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARSWEGFPYWG
CGTTVTVSS

SEQ ID NO: 92 (HC L19 C-конец сшитый BHA10 (VL-VH), IgG1s, выступ, с мутациями pA)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSS
GTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGLVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA
AGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNRFTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSDIQMT
QSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGINVAWYQQKPGCAPKSLISSASYRYSGVPSRFSGS
GSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYDTPFTFGQGTKVEIKGGSGGSGGCPPCGSGGQV
QLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTTYLHWVRQAPGQGLEWMGWIYPGNVHA
QYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARSWEGFPYWGCGTTVTVSS

SEQ ID NO: 87 (HC L19 IgG1s выступ с мутациями pA)

VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSG
TTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGLVT
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA
GASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
CREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 88 (HC L19 IgG1s впадина)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSS
 GTTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGGQGLVT
 VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA
 AGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTL
 PPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLT
 VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 89 (LC L19)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRA
 TGIPDRFSGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI
 FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLS
 STLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ix. COVA14107 получали путем совместной экспрессии тяжелой цепи антитела к EDB EDBmAb1, несущей C-концевой сшитый scFv BHA10 (ориентация VH-VL, VL3 Y36F_S49Y_F87Y SEQ ID NO: 93), слитый с (SEQ ID NO: 94, содержащей SEQ ID NO: 87) с тяжелой цепью (HC; SEQ ID NO: 88) и легкой цепью (LC; SEQ ID NO: 89) антитело EDBmAb1 к EDB (**ФИГ. 15I**).

SEQ ID NO:93 [сшитый scFv (VL3_Y36F_S49Y_F87Y) BHA10 (VH-VL)]

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYFTFTYYLHWVRQAPGCGLEWMGWIY
 PGNVHAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSWEGFPYWGQGT
 TTVTVSSGGSGGGSGCPCGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGINVAWF
 QQKPGKAPKSLIYSASYRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYDTPFT
 FGCGTKVEIK

SEQ ID NO: 94 (HC L19 C-конец сшитый (VL3_Y36F_S49Y_F87Y) BHA (VH-VL), IgG1s, выступ, с мутациями pA)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSS
 GTTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGGQGLVT
 VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA
 AGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
 PPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL
 TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLV
 QSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYFTFTYYLHWVRQAPGCGLEWMGWIYPGNVHAQYN
 EKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSWEGFPYWGQGT TTVTVSSGGG
 SGGGSGCPCGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGINVAWFQQKPGKAPK
 SLIYSASYRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYDTPFTFGCGTKVEI
 K

SEQ ID NO: 87 (HC L19 IgG1s выступ с мутациями pA)

VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSG
 TTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGLVTV
 SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQ
 SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA
 GASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
 CREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 88 (HC L19 IgG1s впадина)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSS
 GTTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGLVTV
 VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA
 AGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTL
 PPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLT
 VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 89 (LC L19)

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRA
 TGIPDRFSGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI
 FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
 STLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

х. COVA14108 получали путем совместной экспрессии тяжелой цепи антитела к EDB EDBmAb1, несущей С-концевой сшитый scFv BHA10 (ориентация VH-VL, VH_CDR1_Y33A SEQ ID NO: 95), слитый с (SEQ ID NO: 96, содержащей SEQ ID NO: 87) с тяжелой цепью (HC; SEQ ID NO: 88) и легкой цепью (LC; SEQ ID NO: 89) антитело EDBmAb1 к EDB (**ФИГ. 15J**).

SEQ ID NO: 95 [сшитый scFv (VH_CDR1_Y33A) BHA10 (VH-VL)]

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSKASGYTFTTYALHWVRQAPGCGLEWMGWIY
 PGNVHAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSWEGFPYWGQGT
 TVTVSSGGGSGGGSGCPCGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGINVAWY
 QQKPGKAPKSLISSASYRYSYGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYDTPFT
 FCGGTKVEIK

SEQ ID NO: 96 (HC L19 С-конец сшитый (VH_CDR1_Y33A) BHA10 (VH-VL), IgG1s, выступ, с мутациями pA)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSS
 GTTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGLVTV
 VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA
 AGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR

EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
 PPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGDSFFLYSKL
 TVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNRFTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSSQVQLV
 QSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYFTFTTYALHWVRQAPGCGLEWMGWYIPGNVHAQYN
 EKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARSWEGFPYWGQGTITVTVSSGGG
 SGGGSGCPPCGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGINVAWYQQKPGKAP
 KSLISSASYRYSQVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQYDTPFTFGCGTKVEI
 K

SEQ ID NO: 87 (HC L19 IgG1s выступ с мутациями pA)

VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSG
 TTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGTITVTV
 SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
 SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA
 GASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
 CREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGDSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 88 (HC L19 IgG1s впадина)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSS
 GTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGTITVTV
 VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA
 AGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTL
 PPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGDSFFLVSKLT
 VDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 89 (LC L19)

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRA
 TGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI
 FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSL
 STLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

xi. COVA14133 получали путем совместной экспрессии тяжелой цепи антитела к EDB EDBmAb1, несущей C-концевой сшитый scFv BHA10 (ориентация VH-VL SEQ ID NO: 77), слитый с (SEQ ID NO: 97, содержащей SEQ ID NO: 98) с тяжелой цепью (HC; SEQ ID NO: 88) и легкой цепью (LC; SEQ ID NO: 89) антитело EDBmAb1 к EDB (**ФИГ. 15К**).

SEQ ID NO: 77 [сшитый scFv BHA10 (VH-VL)]

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYFTFTTYLHWVRQAPGCGLEWMGWYI
 PGNVHAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARSWEGFPYWGQGT
 TVTVSSGGGSGGGSGCPPCGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGINVAWY
 QQKPGKAPKSLISSASYRYSQVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQYDTPFT

FGCGTKVEIK

SEQ ID NO: 97 (HC L19 C-конец сшитый BHA10 (VH-VL), IgG1s, выступ, без мутаций pA)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSS
 GTTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGLVT
 VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA
 AGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
 PPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
 TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSSQVQLV
 QSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYFTTYYLHWVRQAPGCGLEWMGWIYPGNVHAQYN
 EKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARSWEGFPYWGQGT TTVTVSSGGG
 SGGGSGCPPCGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGINVAWYQQKPGKAP
 KSLISSASYRYSQVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYDTPFTFGCGTKVEI
 K

SEQ ID NO: 98 (HC L19 IgG1s выступ)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSS
 GTTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGLVT
 VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA
 AGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
 PPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
 TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 88 (HC L19 IgG1s впадина)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSS
 GTTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGLVT
 VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA
 AGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTL
 PPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLT
 VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 89 (LC L19)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRA
 TGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI
 FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
 STLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

xii. COVA14136 получали путем совместной экспрессии тяжелой цепи антитела к

RSV B21M, несущей С-концевой шитый scFv BHA10 (ориентация VH-VL SEQ ID NO: 77), слитый с (SEQ ID NO: 99, содержащей SEQ ID NO: 100) с тяжелой цепью (HC; SEQ ID NO: 80) и легкой цепью (LC; SEQ ID NO: 81) антитело EDBmAb1 к EDB (**ФИГ. 15L**).

SEQ ID NO: 77 [шитый scFv BHA10 (VH-VL)]

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYFTFTYYLHWVRQAPGCGLEWMGWIY
PGNVHAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARSWEGFPYWGQGT
TVTSSGGGSGGGSGCPCGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGINVAWY
QQKPGKAPKSLISSASYRYSYGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYDTPFT
FGCGTKVEIK

SEQ ID NO: 99 (HC B21M С-конец шитый BHA10 (VH-VL), IgG1s, выступ, без мутаций рА)

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIYW
DDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARLYGFTYGFAYWGG
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPETCVVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGS
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYFTFTYYLHWVRQAPGCGLEWMGWIYPGNV
HAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARSWEGFPYWGQGTTVT
SSGGGSGGGSGCPCGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGINVAWYQQK
GKAPKSLISSASYRYSYGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYDTPFTFGCG
TKVEIK

SEQ ID NO: 100 (HC B21M IgG1s выступ)

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIYW
DDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARLYGFTYGFAYWGG
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPETCVVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 80 (HC B21M (RSV) IgG1s впадина)

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIYW
DDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARLYGFTYGFAYWGG
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPETCVVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREP

QVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 81 [LC B21M (RSV)]

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVDYNGISYMHWYQQKPGQPPKLLIYA
ASNPESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQIIEDPWTFGQGTKVEIKRTV
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

xiii. COVA14146 получали путем совместной экспрессии тяжелой цепи антитела к мезотелину EDBmAb1, несущей N-концевой шитый scFv BHA10 (ориентация VH-VL SEQ ID NO: 77), слитый с (SEQ ID NO: 101, содержащей SEQ ID NO: 102) с тяжелой цепью (HC; SEQ ID NO: 103) и легкой цепью (LC; SEQ ID NO: 104) антитело к мезотелину MSLNmAb1 (ФИГ. 15M).

SEQ ID NO: 77 [сшитый scFv BHA10 (VH-VL)]

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKKASGYFTFTYYLHWVRQAPGCGLEWMGWIIY
PGNVHAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSWEGFPYWGQGT
TVTVSSGGGSGGGSGCPCGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGINVAWY
QQKPGKAPKSLISSASYRYSYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYDTPFT
FGCGTKVEIK

**SEQ ID NO: 101 (MSLNmAb1 HC C-конец шитый BHA10 (VH-VL), IgG1s, выступ.
с мутациями pA)**

QVQLQSQGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYTMNWKQSHGKSLEWIGLITPY
NGASSYNQKFRGKATLTVDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAVYFCARGGYDGRGFDYWGS
GTPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNRFTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGS
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKKASGYFTFTYYLHWVRQAPGCGLEWMGWIIYPGNV
HAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSWEGFPYWGQGTTVTV
SSGGGSGGGSGCPCGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGINVAWYQQK
GKAPKSLISSASYRYSYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYDTPFTFGCG
TKVEIK

SEQ ID NO: 102 (MSLNmAb1 HC, IgG1s, выступ. с мутациями pA)

QVQLQSQGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYTMNWKQSHGKSLEWIGLITPY
NGASSYNQKFRGKATLTVDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAVYFCARGGYDGRGFDYWGS
GTPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREP

QVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNRFQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 103 (HC MSLNmAb1 IgG1s впадина)

QVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKSLEWIGLITPY
NGASSYNQKFRGKATLTVDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAVYFCARGGYDGRGFDYWGS
GTPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREP
QVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 104 (LC MLSNmAb1)

DIELTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLAS
GVPGRFSGSGSGNSYSLSLTISSVEAEDDATYYCQQWSKHPLTFGSGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYSL
SSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0709] Все описанные выше конструкторы могут быть экспрессированы и очищены с высоким выходом и чистотой (см таблицу 11 ниже), что указывает на то, что биспецифические конструкторы, включающие в себя spFv, предложенные в данном документе, имеют хорошие биофизические свойства.

Таблица 11. Выход и чистота выбранных биспецифических EDB/LTBR

Название биспецифического соединения	Описание	Выход (мг/л)	Чистота [%мономера]
COVA1482	Гетеродимер 2:1, состоящий из HC EDBmAb1, слитой со сшитым scFv BHA10 (VH-VL) (содержит мутацию в Fc, которая отменяет связывание с белком А для облегчения очистки гетеродимера), спаренный с HC EDBmAb1 и LC EDBmAb1	53	100
COVA14133	Гетеродимер 2:1, состоящий из HC EDBmAb1, слитый со сшитым scFv BHA10 (VH-VL), спаренный с HC EDBmAb1 и LC EDBmAb1	64,3	100

6.7 Пример 7. Зависимая от EDB активация LTBR *in vitro* - анализ репортерного гена люциферазы NF-κB

[0710] Чтобы показать, что биспецифические EDB/LTBR способны активировать LTBR в зависимости от EDB, активность соединений тестировали в анализе репортерного гена люциферазы NF-κB клеток A549 в присутствии или в отсутствие EDB, содержащего фибронектин (EDB+фибронектин). Сигнальная система NF-κB играет ключевую роль в регулировании развития клеток и иммунного гомеостаза. Активация NF-κB посредством рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR) или членов суперсемейства TNFR (например,

LTBR) происходит при взаимодействии с соответствующими лигандами. Линия клеток эпителия легкого A549 естественным образом экспрессирует LTBR, а конструкт репортерного гена люциферазы NF-κB стабильно встраивают в геном линии клеток эпителия легкого A549. После активации стимуляторами эндогенные факторы транскрипции NF-κB связываются с ответными элементами ДНК для индукции транскрипции гена люциферазы.

[0711] Чтобы продемонстрировать зависимую от EDB активацию LTBR, высокосвязывающие 96-луночные планшеты с плоским дном µClear (Greiner; Монро, Северная Каролина, США) покрывали в течение ночи 150 нг/лунка рекомбинантного домена EDB человека+домены фибронектина 7-B-8-9 (EDB+; SEQ ID NO: 105) или 150 нг/лунка рекомбинантных доменов фибронектина человека 7-8-9 (EDB-; SEQ ID NO: 106), последовательности которых перечислены ниже.

SEQ ID NO: 105 (домены фибронектина 7B89)

PLSPPTNLHLEANPDTGVLTVSWERSTTPDITGYRITTTPTNGQQGNSLEEVVHA
DQSSCTFDNLSPGLEYNVSVYTVKDDKESVPISDTIPEVPQLTDLSFVDITDSSIGLRWTP
LNSSTIIGYRITVVAAGEGIPIFEDFVDSSVGYTYVTGLEPGIDYDISVITLINGGESAPTTL
TQQTAVPPPTDLRFTNIGPDTMRVTWAPPPSIDLTNFLVRYSPVKNEEDVAELSIKSPDNA
VVLTNLLPGTEYVVS SVSSVYEQHESTPLRGRQKTGLDSPTGIDFSITANSFTVHWIAPR
ATITGYRIRHHPEHFSGRPREDRVPHSRNSITLTNLTPGTEYVVSIVALNGREESPLLIGQQ
STHHHHHH

SEQ ID NO: 106 (домены фибронектина 789)

PLSPPTNLHLEANPDTGVLTVSWERSTTPDITGYRITTTPTNGQQGNSLEEVVHA
DQSSCTFDNLSPGLEYNVSVYTVKDDKESVPISDTIIPAVPPPTDLRFTNIGPDTMRVTWA
PPPSIDLTNFLVRYSPVKNEEDVAELSIKSPDNAVVLTNLLPGTEYVVS SVSSVYEQHESTP
LRGRQKTGLDSPTGIDFSITANSFTVHWIAPRATITGYRIRHHPEHFSGRPREDRVPHSR
NSITLTNLTPGTEYVVSIVALNGREESPLLIGQQSTHHHHHH

[0712] После инкубации в течение ночи планшеты с покрытием промывали PBS и блокировали в течение 2 часов при 37°C с помощью среды для анализа (DMEM+10% инактивированной нагреванием FBS). Готовили серию разведений соединений 1:5 в среде для анализа в виде маточных растворов 2-кратной концентрации (конечных концентраций, исследуемых в диапазоне от 200 нМ до 2,6 нМ). 50 мкл разведенных соединений вносили в предварительно заблокированный планшет после удаления блокирующего раствора путем аспирации. В каждую лунку добавляли 50 мкл суспензии клеток A549 (концентрация клеточной суспензии=0,4 млн. клеток/мл среды для анализа) (20 000 клеток/лунка). Клетки A549 ранее отделяли от флакона для культур клеток с использованием Accutase/EDTA и затем переносили в среду для анализа. Клетки инкубировали с соединениями в течение 18-20 часов при 37 °C/5% CO₂.

[0713] После инкубации в течение 18 часов использовали систему для анализа люциферазы BIO-GLO (Promega; Мэдисон, Висконсин, США) использовали для обнаружения активности люциферазы. Люминесценцию измеряли с помощью прибора

TECAN M1000 Pro с временем интеграции 500 миллисекунд. Из полученных относительных световых единиц (RLU) кратность индукции сигнальной системы LTBR рассчитывали следующим образом: Кратность индукции = $RLU_{\text{стимулированные клетки}} / \text{среднее } RLU_{\text{нестимулированные клетки}}$ (нестимулированные клетки включали в качестве контрольных в каждом тестируемой планшете).

[0714] Кривые дозовой зависимости, включая стандартные отклонения, наносили на график с использованием GRAPHPAD Prism, и наносили нелинейные подборы (логарифм (агонист) в зависимости от ответа (переменный наклон - три параметра), если применимо. Чтобы соответствовать данным, значения x (концентрации соединений) трансформировали с использованием функции $X = \text{Log}(x)$ GRAPHPAD Prism.

[0715] COVA1482 сравнивали с COVA1456 в том же анализе A549 репортерного гена NF-κB. COVA1482 отличается от COVA1456 только способом стабилизации, применяемом для scFv. ScFv в COVA1482, который также был получен из LTBRmAb1, стабилизировали с использованием сшитой платформы, описанной в настоящем документе (т. е., стабилизированную посредством VH/линкера и дисульфидной связи VL), причем COVA1456 представляет собой дисульфид, стабилизированный между VH и VL (т. е., стабилизируют посредством дисульфидной связи VH/VL). На **ФИГ. 16А** показано, что как COVA1482, так и COVA1456 эффективно активируют LTBR в зависимости от EDB. Соответствующие молекулы изотипического контроля COVA1486 и COVA1462 не активировали LTBR (**ФИГ. 16А**). Эти результаты демонстрируют, что включение spFv в мультиспецифическую молекулу не оказывает отрицательного влияния на активность мультиспецифической молекулы. Биспецифические антитела к EDB/LTBR 2:1 (COVA1482 или COVA1456) демонстрировали повышенную активность индукции сигнальной системы NF-κB в этом анализе репортерного гена. Среднее значение EC_{50} , рассчитанное для COVA1482 в нескольких анализах с одним и тем же экспериментальным набором, составляло около $30 \text{ пМ} \pm 10 \text{ пМ}$, тогда как контрольная гетеродимерная конструкция 1:1 показала EC_{50} около 3 нМ в анализе (данные не показаны здесь), что указывает на то, что биспецифические вещества 2:1 могут быть в 100 раз более эффективными, чем биспецифические вещества 1:1. Это можно объяснить повышенной кластеризацией сайта связывания LTBR, полученного с 2 сайтами связывания с ТАА.

[0716] Чтобы исследовать влияние аффинности к LTBR на способность таких биспецифических антител к ТАА-зависимой активации LTBR, получали варианты более низкой аффинности (SEQ ID NO: 107, $KD \approx 60 \text{ нМ}$ и SEQ ID NO: 108, $KD \approx 600 \text{ нМ}$) фрагмента scFv, полученного из LTBRmAb1, и использовали для конструирования 2:1 биспецифических COVA14107 и COVA14108 (см. **таблицу 9**).

SEQ ID NO: 107 [сшитый scFv (VL3_Y36F_S49Y_F87Y) BHA10 (VH-VL)]

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSCKASGYTFTTYYLHWVRQAPGCGLEWMGWIY
PGNVHAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSWEGFPYWGQGT
TVTIVSSGGSGGGSGCPPCGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGINVAWF
QQKPGKAPKSLIYSASYRYSRVSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYDTPFT

FGCGTKVEIK

SEQ ID NO: 108 [сшитый scFv (VH CDR1 Y33A) BHA10 (VH-VL)]

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTTYALHWVRQAPGCGLEWMGWIY
PGNVHAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSWEGFPYWGQGT
TVTIVSSGGGSGGGSGCPPCGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGINVAWY
QQKPGKAPKSLISSASYRYSQVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYDTPFT
FGCGTKVEIK

[0717] Полученные биспецифические вещества тестировали в анализе A549 репортерного гена NF-κB, чтобы увидеть влияние аффинности на активацию LTBR. На **ФИГ. 16B** показано, что более низкая аффинность к LTBR соответствует более низкой способности биспецифического агента активировать LTBR в зависимости от ТАА в этом анализе. Данные также демонстрируют, что включение spFv в мультиспецифические молекулы не оказывает отрицательного влияния на активность молекулы.

[0718] Как упомянуто в примере 6, мутации (WO2010151792) для отмены связывания с белком А (применяемым для очистки антител) вводили в Fc некоторых конструкций для облегчения очистки желаемого гетеродимера. COVA14133 получали без этих мутаций, и его активность сравнивали с COVA1482, чтобы показать, что мутации в области Fc не влияют на активность биспецифического агента. COVA14133 и COVA1482 и их соответствующие молекулы изотипического контроля COVA14136 и COVA1486 сравнивали в анализе A549 репортерного гена NF-κB. На **ФИГ. 16C** показано, что COVA14133 активировали LTBR в зависимости от ТАА эффективностью, аналогичной COVA1482, демонстрируя, что мутации в Fc не влияют на способность биспецифического агента активировать LTBR и не оказывают влияния на функционирование spFv.

[0719] В заключение, было показано, что COVA14133 обладает превосходной способностью активировать LTBR в зависимости от ТАА.

6.8 Пример 8. Зависимая от EDB активация LTBR in vitro - анализ совместного культивирования клеток сублинии 2RA A375/WI38VA

[0720] Анализ совместного культивирования сублинии 2RA A375/WI38VA проводили для проверки того, приводит ли активация LTBR в присутствии EDB+фибронектина (полученного и депонированного во внеклеточном матриксе с помощью клеток WI38VA (Zardi, L., *et al.*, *EMBO J*, 6, 2337-42 (1987)) к высвобождению цитокинов и хемокинов и усилению регуляции адгезивной молекулы ICAM-1 на клетках A375, и что включение spFv не оказывает отрицательного влияния на активность. Клетки сублинии 2RA WI38VA (ATCC® CCL75.1™) высевали в 96-луночный планшет с плотностью 5000 клеток/луночку и инкубировали в течение 48 часов в их среде для выращивания (MEM без глутамина+10% инактивированный нагреванием FBS+0,1 mM NEAA+2 mM L-Gln+1 mM пирувата натрия) при 37 °C/5% CO₂. Серия разведенных соединений 1:5 была приготовлена в среде для анализа (DMEM+10% инактивированный нагреванием FBS) в виде маточных растворов 2-кратной концентрации (конечных концентраций, исследуемых в диапазоне от 40 нМ до 0,5 нМ). Перед инкубацией в

совместной культуре клетки сублинии 2RA WI38VA, клетки A375 (ATCC® CRL-1619™) метили фиолетовым CELLTRACE (CTV, Invitrogen; г. Карлсбад, штат Калифорния). Для мечения клеточную суспензию с концентрацией 10×10^6 клеток/мл и $2,5 \mu\text{M}$ CTV в 5% FBS в PBS инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре, при этом защищая от света. Затем клетки промывали и ресуспендировали в среде для анализа с плотностью $0,4 \times 10^6$ клеток/мл. Осторожно удаляли культуральную среду из планшета, содержащего 48-часовую культуру сублинии 2RA WI38VA, затем добавляли 50 $\mu\text{л}$ клеточной суспензии A375 (20 000 клеток/лунку; CTV+ или CTV-) в каждую лунку. 50 $\mu\text{л}$ последовательно разведенных соединений (конечный объем на лунку 100 $\mu\text{л}$) добавляли к клеткам и инкубировали 24 часа при $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$.

[0721] После инкубации в течение 24 часов супернатанты очищали центрифугированием и хранили для измерения цитокинов и хемокинов методом MSD. Клетки дополнительно обрабатывали для измерения ICAM-1 с помощью проточной цитометрии.

6.8.1 Обнаружение ICAM-1 с помощью проточной цитометрии

[0722] Любые среды, оставленные в 96-луночном планшете, тщательно удаляли, клетки отделяли с помощью аккутазы, переносили в 96-луночный планшет DeepWell (три повторности объединяли в 1 лунку), промывали, ресуспендировали в 100 $\mu\text{л}$ буфера для FACS (PBS+1% FBS+0,1% NaN_3) и переносили в круглодонный 96-луночный планшет. Антитело, т. е. антитело PE к ICAM-1 человека, меченое PE (клон 1H4, Thermo; Уолтем, Массачусетс, США) или изотипическое контрольное антитело, меченное PE (MPC-11, BioLegend; Сан-Диего, Калифорния, США) и краситель для дифференциации живых и мертвых клеток в ближней ИК-области LIVE/DEAD fixable near-IR (Invitrogen) для одиночного или комбинированного окрашивания разводили как показано в **таблице 12**.

Таблица 12. Схема разведения для одиночного или комбинированного окрашивания в буфере для FACS

	Антитело или краситель	Конечная концентрация ($\mu\text{г}/\text{мл}$)	Коэффициент разведения
Одиночные окрашивания	ICAM-1	1,25	20
	Контроль изотипа	1,25	160
	LIVE/DEAD	-	400
Комбинированное окрашивание ICAM-1+LIVE/DEAD	ICAM-1	1,25	20
	LIVE/DEAD	-	400

[0723] Клетки центрифугировали при $400 \times g$ при 4°C в течение 4 минут, супернатант отбрасывали и получали 50 мкл растворов антитела, как описано в **таблице 12**. Клетки и антитела инкубировали в темноте при 4°C в течение 30 минут. После инкубации в каждую лунку добавляли 120 мкл, а затем клетки центрифугировали при $400 \times g$ при 4°C в течение 4 минут. Клетки промывали один раз буфером для FACS, центрифугировали и

ресуспендировали в 90 мкл буфера для FACS. Затем клетки фиксировали путем добавления 90 мкл 3,7% раствора формалина в PBS и инкубировали в течение 15 минут на льду в темноте. После фиксации клетки центрифугировали при 400 x g в течение 4 минут и ресуспендировали в 100 мкл буфера для FACS. Клетки измеряли с помощью прибора с MACS Quant при высокой скорости потока в режиме скрининга, получали 49 мкл/лунку. Данные анализировали с использованием программного обеспечения FLOWLOGICS (версия 700.2A) и наносили на график с помощью GRAPHPAD Prism.

6.8.2 Измерение цитокинов в супернатантах обработанных клеток с использованием платформы MSD

[0724] Несколько цитокинов, которые, как известно, находятся под контролем сигнальной системы NF-κB, измеряли с использованием платформы MSD и мультиплексных планшетов MSD. В данном документе представлены некоторые примеры измеренных цитокинов:

- RANTES: с использованием набора антител R-Plex человека RANTES (MSD);
- I-TAC, IP-10, MIP-3b: с использованием анализа высвобождения цитокинов 3- PLEX (MSD);
- IL-8, IP-10, MIP-3b: с использованием анализа высвобождения цитокинов 3- PLEX (MSD); и
- IL-12p70, IL-6, TNF-α, MIP-3α, SDF-1α: с использованием анализа высвобождения цитокинов 5- PLEX (MSD)

[0725] Концентрацию цитокинов в супернатанте обработанных клеток измеряли с помощью платформы MSD в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, протокол включал следующие стадии:

(1) Приготовление планшета включает в себя покрытие предоставленного планшета связанными с линкером захватывающими антителами. Планшеты инкубировали со встряхиванием в течение ночи при температуре 2-8 °C. На следующий день планшеты промывали PBST (PBS плюс 0,05% Tween-20) с помощью устройства для мойки планшетов (Biotek; Уинуски, Вермонт, США);

(2) Получение калибровочного стандарта и раствора детекторного антитела;

(3) Супернатанты разводили 1:3 или 1:5 в зависимости от доступности материала.

6.8.3 Протокол анализа

o Стадия 1. Образец или калибровочный стандарт добавляли на планшет, и планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа при встряхивании;

o Стадия 2. Планшеты промывали и добавляли детекторное антитело. Планшеты инкубировали при встряхивании в течение 1 часа при комнатной температуре.

o Стадия 3. Планшеты промывали и добавляли 2x считывающий буфер T. Планшет анализировали на приборе MSD

Данные анализировали с использованием программного обеспечения MESOSCALE Software (лабораторная программа поиска MSD версии 4.0.12.1) и наносили на график с помощью GRAPHPAD Prism.

6.8.4 Результаты - Обнаружение ICAM-1 с помощью проточной цитометрии

[0726] Ранее было показано, что сигнальная система NF-κB может приводить к повышению экспрессии ICAM-1 на поверхности клеток (da Silva Antunes, *et al. Front Immunol*, 9:576, (2018)). Таким образом, измеряли уровни экспрессии ICAM-1 на поверхности клеток A375 после совместного культивирования с биспецифическими препаратами EDB/LTBR. В качестве примера на **ФИГ. 17** показано повышение экспрессии ICAM-1 после инкубации с биспецифическим препаратом EDB/LTBR COV1482, демонстрируя функциональность spFv, связывающего LTBR. Молекула изотипического контроля COVA1486 не вызвала повышения экспрессии ICAM-1. Эти данные показали, что способность кластеризовать scFv LTBR посредством связывания с EDB представляла собой необходимое условие активации LTBR, и, как следствие, повышения экспрессии ICAM-1.

6.8.5 Результаты - Измерение цитокинов в супернатантах обработанных клеток

[0727] Несколько цитокинов и хемокинов, которые экспрессируются в результате активации LTBR, измеряли в супернатанте совместных культур, которые обрабатывали биспецифическими и контрольными молекулами EDB/LTBR, как описано выше. На **ФИГ. 18A-18D** показаны 4 характерных примера цитокинов (**ФИГ. 18A**: RANTES, **ФИГ. 18B**: IL-6, **ФИГ. 18C**: IL-8 и **ФИГ. 18D**: MIP-3b), экспрессия которых повышалась активацией LTBR с COVA14133. Нецелевой scFv LTBRmAb1, полученный в COVA14136, не активировал LTBR, и, как следствие, концентрация цитокинов в супернатанте не была повышена выше уровня фона. Уровень фона был представлен уровнем, достигаемым с помощью антитела B21M или COVA1440 (2 (mAb) B21M изотипического контроля mAb) (показано в виде одной концентрации на графиках). Результаты демонстрируют, что связывающий spFv LTBR является функционализированным *in vitro*.

[0728] Взятые вместе, повышение экспрессии ICAM-1 и секреция цитокинов при активации LTBR подтвердили ожидаемые эффекты на клетки, которые могут иметь активацию LTBR.

[0729] В этом примере было показано, что молекулы, предложенные в настоящем документе, обеспечивают эффективную зависимую от опухолеспецифического антигена (в данном случае содержащего EDB фибронектин) активацию LTBR.

6.9 Пример 9. Зависимая от мезотелина активация LTBR *in vitro* - Анализ совместного культивирования клеток с репортерными клетками A549 NF-κB и CHO-K1-huMSLN или H226

[0730] В примерах 7 и 8 было показано, что биспецифические антитела, содержащие структуры spFv, предложенные в настоящем документе, нацеленные на EDB (опухолеспецифический антиген во внеклеточном матриксе) и LTBR, очень эффективно активирует LTBR в зависимости от опухолевого антигена. Для проверки того, является ли это заключение истинным для любого опухолевого антигена, несмотря на его местоположение (осажденное во внеклеточном матриксе или на клеточной поверхности опухолевых клеток), было сконструировано и получено биспецифическое антитело 2:1,

нацеленное на мезотелин (MSLN), опухолеспецифический антиген, экспрессируемый на различных типах опухоли (Hassan and Ho, *Eur. J. Cancer*, 44:46-53 (2008)) и LTBR, как описано в примере 6. COVA14146 представляет собой биспецифическое антитело к MSLN/LTBR 2:1, состоящее из антитела (MSLNmAb1) к мезотелину (MSLNmAb1), слитого с фрагментом spFv, полученным из LTBRmAb1. Чтобы показать, могло ли биспецифическое антитело LTBR, нацеленное на LTBR, и опухолеспецифический антиген, присутствующий в клеточной поверхности опухолевых клеток (например, мезотелин) эффективно активировать LTBR в зависимости от опухоли, применяли анализ с совместным культивированием клеток. Используемые анализы совместной культуры представляли собой клеточный анализ репортерного гена люциферазы NF-κB клеток A549 (описанный в примере 7) и клеток H226 (мезотелиома клеточная линия; ATCC® CRL-5826) известно, что экспрессирует мезотелин (Fan *et al. Mol. Canc. Ther.* 1:595-600 (2002)) и LTBR.

6.9.1 Получение клеток H226

[0731] 10 000 клеток на лунку (в 75 мкл среды для анализа: DMEM+10% FBS-Н) клеток H226 (экспрессировали около 200 000 копий мезотелина и 10 000 копий LTBR) высевали в 96-луночный планшет для культивирования тканей и инкубировали в течение 6 часов при 37 °C/5% CO₂ в их среде для выращивания (MEM 2 mM глутамин 10% FBS-Н+10 мкг/мл пуромицина и RPMI-1640+10% FBS+1 mM Na-пирувата соответственно), чтобы обеспечить прикрепление клеток к планшету.

6.9.2 Получение соединений

[0732] Соединения тестировали в диапазоне концентраций от 100 нМ до 1,3 пМ. Готовили последовательные 4-кратные разведения соединений 1:5 в среде для анализа (DMEM+10% FBS-Н) и хранили при 4°C до использования.

6.9.3 Приготовление и добавление репортерных клеток A549

[0733] Репортерные клетки A549 отделяли от флакона для культивирования клеток с помощью Accutase/EDTA и переносили в среду для анализа (DMEM+10% FBS-Н). После добавления в каждую лунку 20 000 репортерных клеток A549 на лунку в планшеты, содержащие клетки H226, в каждую лунку добавляли 50 мкл предварительно разведенных соединений и инкубировали в течение 20 часов при 37 °C/5% CO₂.

6.9.4 Измерение люминесценции в обработанных совместных культурах

[0734] После инкубации в течение 20 часов использовали систему для анализа люциферазы BIO-GLO (Promega; Мадисон, Висконсин, США) использовали в соответствии с инструкциями производителя для обнаружения активности люциферазы. Люминесценцию измеряли с помощью прибора TECAN M1000 Pro с временем интеграции 500 миллисекунд. Из полученных относительных световых единиц (RLU) кратность индукции сигнальной системы LTBR рассчитывали следующим образом: Кратность индукции=RLU стимулируемые клетки/среднее RLU нестимулируемые клетки (нестимулируемые клетки включали в качестве контрольных в каждом тестируемой планшете).

[0735] Кривые дозовой зависимости, включая стандартные отклонения, наносили на

график с использованием GRAPHPAD Prism, и применяли нелинейные подборы (логарифм (агонист) в зависимости от ответа (переменный наклон - три параметра), если применимо. Чтобы соответствовать данным, значения x (концентрации соединений) трансформировали с использованием функции $X = \text{Log}(x)$ GRAPHPAD Prism.

6.9.5 Измерение цитокинов в супернатантах обработанных клеток с использованием платформы MSD

[0736] Несколько цитокинов, которые, как известно, находятся под контролем сигнальной системы NF- κ B, можно измерять с использованием платформы MSD и мультиплексных планшетов MSD. В качестве примера, в настоящем документе описан способ измерения RANTES с использованием набора антител R-Plex человека RANTES (MSD).

[0737] Концентрацию RANTES в супернатанте обработанных клеток измеряли с помощью платформы MSD в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, протокол включал следующие стадии:

(1) Приготовление планшета включает в себя покрытие предоставленного планшета связанными с линкером захватывающими антителами. Планшеты инкубировали со встряхиванием в течение ночи при температуре 2-8 °C. На следующий день планшеты промывали PBST (PBS плюс 0,05% Tween-20) с помощью устройства для мойки планшетов (Biotek; Уинуски, Вермонт, США);

(2) Получение калибровочного стандарта и раствора детекторного антитела;

(3) Супернатанты разводили 1:3 или 1:5 в зависимости от доступности материала.

6.9.6 Протокол анализа

o Стадия 1. Образец или калибровочный стандарт добавляли на планшет, и планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа при встряхивании;

o Стадия 2. Планшеты промывали и добавляли детекторное антитело. Планшеты инкубировали при встряхивании в течение 1 часа при комнатной температуре.

o Стадия 3. Планшеты промывали и добавляли 2х считывающий буфер T. Планшет анализировали на приборе MSD

Данные анализировали с использованием программного обеспечения MESOSCALE Software (лабораторная программа поиска MSD версии 4.0.12.1) и наносили на график с помощью GRAPHPAD Prism.

6.9.7 Результаты - Зависимая от мезотелина активация LTBR в анализе совместного культивирования репортерных клеток A549/H226

[0738] Анализ совместного культивирования с репортерными клетками A549 и клетками H226 проводили для проверки того, способны ли COVA14146 активировать LTBR в более физиологической системе, где из-за его широкой экспрессии (Lukashev, *et al. Cancer Res.*, 66(19):9617-24 (2006), ожидается, что LTBR и мезотелин (и другие опухолеспецифические антигены на клеточной поверхности опухолевых клеток, например, EGFR) будут совместно экспрессироваться на клеточной поверхности опухолевых клеток. На **ФИГ. 19А**, было показано, что при этих условиях COVA14146 эффективно не

активирует LTBR. Концентрации RANTES, секретлируемых в супернатантах обработанных клеток, измеряли для подтверждения неспособности COVA14146 эффективно активировать LTBR. Как и ожидалось, **на ФИГ. 19В** показано, что RANTES секретировали посредством клеток, обработанных COVA14146 в той же степени, что и клетки, обработанные молекулой изотипического контроля COV1486, что подтверждает, что LTBR не может быть активирован в этих условиях.

6.10 Пример 10. Биспецифические антитела, специфически связывающиеся с LTBR и другими ТАА, присутствующими во внеклеточном матриксе

[0739] Приведенные выше примеры продемонстрировали, что биспецифические антитела, нацеленные на LTBR и ТАА, экспрессированные во внеклеточном матриксе, в данном случае EDB фибронектина, могут селективно активировать LTBR в опухолевой ткани, которая экспрессирует EDB. Этот пример показал, что это в большей степени применимо к биспецифическим антителам, которые нацелены на LTBR и другой ТАА, присутствующие во внеклеточном матриксе, путем обеспечения двух или более примеров таких ТАА, а именно домена А2 тенасцина С и дополнительного домена А фибронектина.

[0740] Как правило, в соответствии со способами, описанными в приведенных выше примерах, были получены дополнительные биспецифические антитела, которые связываются с LTBR и другими ТАА, присутствующими во внеклеточном матриксе, а именно домен А2 тенасцина С (TnCA2) или дополнительный домен А фибронектина (EDA). Последовательность этих ТАА, например, была описана в:

- TnCA2: номер доступа UniProt P24821.3;
- EDA: номер доступа UniProt P02751;

[0741] Кроме того, антитела против этих ТАА, например, были описаны ранее в:

- TnCA2: WO2011/020783;
- EDA: EP2142567

[0742] Примеры последовательностей связывающих доменов с этими мишенями, использованные для данного примера (путем объединения с scFv LTBR для создания мультиспецифической связывающей молекулы настоящего описания) представлены как:

- TnCA2: VH с SEQ ID NO: 109 и VL SEQ ID NO: 110;
- EDA: VH с SEQ ID NO: 111 и VL SEQ ID NO: 112.

[0743] Эти последовательности являются следующими:

SEQ ID NO: 109 (VH анти-TnCA2 Ab 2B10)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGPIIF
GTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARLYGYAYYGAFDYWG
QGTTVTVSS

SEQ ID NO: 110 (VL анти-TnCA2 Ab 2B10)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQ
SGVPSRFSGGGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQNGLQPATFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 111 (VH анти-EDA Ab F8)

EVQLLESGLLVQPGSLRLSCAASGFTFSLFTMSWVRQAPGKGLEWVSAISGS

GGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGGQ
TLVTVSS

SEQ ID NO: 112 (VL анти-EDA Ab F8)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSMPFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA
TGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQMRGRPPTFGQGTKVEIK

[0744] Биспецифические антитела, которые связываются с LTBR, и эти ТАА были получены и исследованы на ТАА-специфическую активацию LTBR в методе анализа *in vitro* ТАА-зависимой активации LTBR - анализ репортерного гена люциферазы NF-κB в соответствии с процедурой, описанной в примере 7.

[0745] Асимметричные антитела с стехиометрическим составом 2:1 получали следующим образом:

[0746] COVA14198 получали путем совместной экспрессии тяжелой цепи антитела к EDA, несущей С-концевой сшитый scFv BHA10 (ориентация VH-VL SEQ ID NO: 77), слитый с (SEQ ID NO: 113, содержащей SEQ ID NO: 114) с тяжелой цепью (HC; SEQ ID NO: 115) и легкой цепью (LC; SEQ ID NO: 116) антитела к EDA. Последовательности перечислены ниже.

SEQ ID NO: 77 [сшитый scFv BHA10 (VH-VL)]

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFTTYLHWVRQAPGCGLEWMGWIY
PGNVHAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARSWEGFPYWGQGT
TVT VSSGGSGGGSGCPCGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGINVAWY
QQKPGKAPKSLISSASYRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQYDTPFT
FGCGTKVEIK

SEQ ID NO: 113 (F8 HC с BHA10 сшитый (VH-VL) scFv С-конец слитый, IgG1 сигма, мутации, образующие выступ)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTMSWVRQAPGKGLEWVSAISGS
GGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGGQ
TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
APEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKLSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSQ
VQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFTTYLHWVRQAPGCGLEWMGWIYPGNVH
AQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARSWEGFPYWGQGTTVT V S
SGGGSGGGSGCPCGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGINVAWYQQK P
GKAPKSLISSASYRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQYDTPFTFGCG
TKVEIK

SEQ ID NO: 114 (F8 HC, IgG1 сигма, мутации, образующие выступ)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTMSWVRQAPGKGLEWVSAISGS
GGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGGQ

TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
APEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 115 (F8 HC, IgG1 сигма и мутации, образующие впадину)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTMSWVRQAPGKGLEWVSAISGS
GGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQG
TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
APEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQ
VCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
VSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 116 (F8 LC)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSMPLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA
TGIPDRFSGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQMRGRPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSL
SSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0747] COVA14202 получали путем совместной экспрессии анти-домена A2 тяжелой цепи антитела к тенасину C, несущей C-концевой сшитый scFv BHA10 (ориентация VH-VL SEQ ID NO: 77), слитый с (SEQ ID NO: 117, содержащей SEQ ID NO: 118) с тяжелой цепью (HC; SEQ ID NO: 119) и легкой цепью (LC; SEQ ID NO: 120) анти-домена A2 антитела к тенасину C. Последовательности перечислены ниже.

SEQ ID NO: 77 [сшитый scFv BHA10 (VH-VL)]

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSCKASGYTFTTYLHWVRQAPGCGLEWMGWIY
PGNVHAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARSWEGFPYWGQGT
TVT VSSGGGSGGGSGCPCGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGINVAWY
QQKPGKAPKSLISSASYRYSRVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYDTPFT
FGCGTKVEIK

SEQ ID NO: 117 (2B10 HC с BHA10 сшитый (VH-VL) scFv C-конец слитый, IgG1 сигма, мутации, образующие выступ)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSCKASGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEWMGGPIIF
GTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARLYGYAYYGAFDYWG
QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF

FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGG
 SQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTTYLHWVRQAPGCGLEWMGWIYPGNV
 HAQYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSWEGFPYWGQGTITVTV
 SSGGGSGGGSGCPPCGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGINVAWYQQKPK
 GKAPKSLISSASYRYSVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYDTPFTFGCG
 TKVEIK

SEQ ID NO: 118 (2B10 HC, IgG1 сигма, мутации, образующие выступ)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGPIIF
 GTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLYGYAAYGAFDYWG
 QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
 HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
 PCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHN
 AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPRE
 PQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF
 FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 119 (2B10 HC, IgG1 сигма и мутации, образующие впадину)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGPIIF
 GTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLYGYAAYGAFDYWG
 QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
 HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
 PCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHN
 AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPRE
 PQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF
 FLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 120 (2B10 LC)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQ
 SGVPSRFSGGGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQNGLQPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
 IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSL
 SSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0748] Чтобы продемонстрировать зависимую от ТАА активацию LTBR, высокосвязывающие 96-луночные планшеты с плоским дном µClear (Greiner; Монро, Северная Каролина, США) покрывали в течение ночи:

- 150 нг/луночка рекомбинантного домена A2, содержащего (A2⁺) домены теназина С A1-A2-A3 (TnCA2⁺; SEQ ID NO: 121) или 150 нг/луночка рекомбинантных доменов теназина A1-A3 (т. е. без домена A2, обозначенного как A2⁻) (TnCA2⁻; SEQ ID NO: 122); или

- 150 нг/луночка рекомбинантных EDA-содержащих (EDA⁺) фибронектиновых доменов 11-A-12 (EDA⁺; SEQ ID NO: 123) или 150 нг/луночка рекомбинантных фибронектиновых доменов 11-12 (т. е., не содержащих EDA, обозначенных как EDA⁻) (EDA⁻; SEQ ID NO: 124).

[0749] Вышеуказанные последовательности являются следующими:

SEQ ID NO: 121 (домены A1-A2-A3 Ну тенащина С, включающие (His)₆ - Маркер для очистки)

EQAPELENLTVTEVGWDGLRLNWTAAADQAYEHFIIQVQEANKVEAARNLTVPG
SLRAVDIPGLKAATPYTVSIYGVIQGYRTPVLSAEASTGETPNLGEVVVAEVGWDALKL
NWTAPEGAYEYFFIQVQEADTVEAAQNLTVPGGLRSTDLPGLKAATHYTITIRGVTQDF
STTPLSVEVLTEEVPMGNLTVTEVSWDALRLNWTTPDGTYDQFTIQVQEADQVEEAH
NLTVPGSLRSMEIPGLRAGTPYTVTLHGEVRGHSTRPLAVEVVTHHHHHH

SEQ ID NO: 122 (домены A1-A3 Ну тенащина С, включающие (His)₆ - Маркер для очистки)

EQAPELENLTVTEVGWDGLRLNWTAAADQAYEHFIIQVQEANKVEAARNLTVPG
SLRAVDIPGLKAATPYTVSIYGVIQGYRTPVLSAEVPMGNLTVTEVSWDALRLNWT
TPDGTYDQFTIQVQEADQVEEAHNLTVPGSLRSMEIPGLRAGTPYTVTLHGEVRGHSTR
PLAVEVVTHHHHHH

SEQ ID NO: 123 (домены 11-A-12 Ну тенащина С, включающие (His)₆ - Маркер для очистки)

EIDKPSQMQVTDVQDNSISVKWLPSSSPVTGYRVTTTPKNGPGPTKTKTAGPDQT
EMTIEGLQPTVEYVVSVAQNPESQPLVQTAVTNIDRPKGLAFTDQVDSIKIAWESP
QGQVSRVRYTYSSPEDGIHELFPAPDGEEDTAELQGLRPGSEYTVSVVALHDDMESQPLI
GTQSTAIPAPTDLKFQVTPPTSLSAQWTPPNVQLTGYRVRVTPKEKTGPMKEINLAPDSS
SVVVSGLMVATKYEVSVAALKDTLTSRPAQGVVTTLEHHHHH

SEQ ID NO: 124 (Ну домены 11-12 фибронектина С, включающие (His)₆ - Маркер для очистки)

EIDKPSQMQVTDVQDNSISVKWLPSSSPVTGYRVTTTPKNGPGPTKTKTAGPDQT
EMTIEGLQPTVEYVVSVAQNPESQPLVQTAVTTPAPTDLKFQVTPPTSLSAQWTPP
NVQLTGYRVRVTPKEKTGPMKEINLAPDSSSVVVSGLMVATKYEVSVAALKDTLTSRP
AQGVVTTLEHHHHH

[0750] Результаты этих анализов соответствовали результатам, показанным выше для биспецифических антител EDB/LTBR, т. е. они показали активацию LTBR в основном в присутствии опухолевого антигена внеклеточного матрикса, на который нацелена соответствующая биспецифическая связывающая молекула (Таблица 13).

Таблица 13. Максимальные кратности индукции сигнальной системы NF-κB в присутствии или в отсутствие EDA или TnCA2 для COVA14198 и COVA14202 соответственно.

Название	Макс. кратность индукции в присутствии ТАА	Макс. кратность индукции в отсутствие ТАА	Соотношение (макс. кратность индукции ТАА ⁺)/макс. кратность индукции ТАА ⁻)
COVA14198 (EDA/LTBR)	4,5	1,3	3,5
COVA14202 (TnCA2/LTBR)	4,2	1,2	3,5

[0751] В частности, биспецифическая связывающая молекула TnCA2/TBR может

активировать LTBR и, следовательно, инициировать передачу сигналов NF-κB, строго в присутствии антигена TnCA2, а биспецифическая связывающая молекула EDA/LTBR может активировать LTBR и, следовательно, инициировать передачу сигналов NF-κB, строго в присутствии антигена EDA. В отсутствие соответствующего TAA эти биспецифические вещества не активируют LTBR или только минимально активируют LTBR.

[0752] Этот пример показал, что подход к активации LTBR посредством мультиспецифической связывающей молекулы, представленной в настоящем документе, например, связывание как LTBR, так и опухолеспецифического антигена, связанного с внеклеточным матриксом, работает для всех трех различных опухолеспецифических антигенов внеклеточной матрицы, которые были протестированы до сих пор, и, таким образом, обычно применимы к опухолеспецифическим антигенам, присутствующим во внеклеточной матрице. Пример также продемонстрировал, что молекулы, содержащие spFv, являются функциональными.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), содержащий переменную область тяжелой цепи (VH), линкер (L) и переменную область легкой цепи (VL), причем scFv содержит:

a) первую дисульфидную связь между цистеином (Cys) на структурно консервативной поверхности VH и первым Cys L;

b) вторую дисульфидную связь между Cys на структурно консервативной поверхности VL и вторым Cys L; или

c) первую дисульфидную связь между Cys на структурно консервативной поверхности VH и первым Cys L, и вторую дисульфидную связь между Cys на структурно консервативной поверхности VL и вторым Cys L.

2. Выделенный scFv, содержащий VH, L и VL, в котором

a) VH содержит Cys VH в положении каркасных остатков на структурно консервативной поверхности VH, а L содержит первый Cys L;

b) VL содержит Cys VL в положении каркасных остатков в положении каркасных остатков на структурно консервативной поверхности VL, а L содержит второй Cys L; или

c) VH содержит Cys VH в положении каркасных остатков на структурно консервативной поверхности VH, причем VL содержит Cys VL в положении каркасных остатков на структурно консервативной поверхности VL, а L содержит первый Cys L и второй Cys L, причем Cys VH и первый Cys L способны образовывать дисульфидную связь, а Cys VL и второй Cys L способны образовывать дисульфидную связь.

3. ScFv по п. 1 или 2, в котором расстояние между Cys VH и Cys VL составляет от около 7 Å до около 9 Å.

4. ScFv по любому из пп. 1-3, в котором Cys VH находится в H3, H5, H40, H43, H46 или H105, где остатки нумеруются по системе Чотиа.

5. ScFv по любому из пп. 1-4, в котором Cys VL находятся в L3, L5, L39, L42, L45, L100 или L102, где остатки нумеруются по системе Чотиа.

6. scFv по любому из пп. 1-5, в котором

a) Cys VH находится в H105, а Cys VL находится в L42;

b) Cys VH находится в H43, а Cys VL находится в L100;

c) Cys VH находится в H3, а Cys VL находится в L3;

d) Cys VH находится в H3, а Cys VL находится в L5;

e) Cys VH находится в H3, а Cys VL находится в L39;

f) Cys VH находится в H3, а Cys VL находится в L42;

g) Cys VH находится в H3, а Cys VL находится в L45;

h) Cys VH находится в H3, а Cys VL находится в L100;

i) Cys VH находится в H3, а Cys VL находится в L102;

j) Cys VH находится в H5, а Cys VL находится в L3;

k) Cys VH находится в H5, а Cys VL находится в L5;

l) Cys VH находится в H5, а Cys VL находится в L39;

- m) Cys VH находится в H5, а Cys VL находится в L42;
- n) Cys VH находится в H5, а Cys VL находится в L45;
- o) Cys VH находится в H5, а Cys VL находится в L100;
- p) Cys VH находится в H5, а Cys VL находится в L102;
- q) Cys VH находится в H40, а Cys VL находится в L3;
- r) Cys VH находится в H40, а Cys VL находится в L5;
- s) Cys VH находится в H40, а Cys VL находится в L39;
- t) Cys VH находится в H40, а Cys VL находится в L42;
- u) Cys VH находится в H40, а Cys VL находится в L45;
- v) Cys VH находится в H40, а Cys VL находится в L100;
- w) Cys VH находится в H40, а Cys VL находится в L102;
- x) Cys VH находится в H43, а Cys VL находится в L3;
- y) Cys VH находится в H43, а Cys VL находится в L5;
- z) Cys VH находится в H43, а Cys VL находится в L39;
- aa) Cys VH находится в H43, а Cys VL находится в L42;
- bb) Cys VH находится в H43, а Cys VL находится в L45;
- cc) Cys VH находится в H43, а Cys VL находится в L102;
- dd) Cys VH находится в H46, а Cys VL находится в L3;
- ee) Cys VH находится в H46, а Cys VL находится в L5;
- ff) Cys VH находится в H46, а Cys VL находится в L39;
- gg) Cys VH находится в H46, а Cys VL находится в L42;
- hh) Cys VH находится в H46, а Cys VL находится в L45;
- ii) Cys VH находится в H46, а Cys VL находится в L100;
- jj) Cys VH находится в H46, а Cys VL находится в L102;
- kk) Cys VH находится в H105, а Cys VL находится в L3;
- ll) Cys VH находится в H105, а Cys VL находится в L5;
- mm) Cys VH находится в H105, а Cys VL находится в L39;
- nn) Cys VH находится в H105, а Cys VL находится в L45;
- oo) Cys VH находится в H105, а Cys VL находится в L100; или
- pp) Cys VH находится в H105, а Cys VL находится в L102, где остатки нумеруются по системе Чотиа.

7. ScFv по любому из пп. 1-6, в котором L содержит непрерывную аминокислотную последовательность, полученную из шарнирной области иммуноглобулина (Ig).

8. ScFv по п. 7, в котором шарнирная область Ig получена из шарнирной области человеческого или нечеловеческого Ig.

9. ScFv по п. 8, в котором шарнирная область Ig получена из шарнирной области Ig человека.

10. scFv по п. 9, в котором шарнирная область Ig человека представляет собой изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

11. scFv по любому из пп. 1-10, в котором L содержит аминокислотную

последовательность $C(X)_yC$ (**SEQ ID NO: 23**), где X представляет собой глицин (Gly), серин (Ser), пролин (Pro), аланин (Ala), аргинин (Arg), аспарагин (Asn), аспарагиновую кислоту (Asp), глутаминовую кислоту (Glu), глутамин (Gln), гистидин (His), изолейцин (Ile), лейцин (Leu), лизин (Lys), фенилаланин (Phe), треонин (Thr), триптофан (Trp) или тирозин (Tyr), а y представляет собой целое число от 1 до 3.

12. scFv по п. 11, в котором L содержит аминокислотную последовательность $C(X)_yC$ (**SEQ ID NO: 24**), где X представляет собой Gly, Ser или Pro, а y представляет собой целое число от 1 до 3.

13. scFv по любому из пп. 1-12, в котором L содержит аминокислотную последовательность CPC, CGC, CSC, CPPC (SEQ ID NO: 1), CGPC (SEQ ID NO: 28), CPGC (SEQ ID NO: 29), CGGC (SEQ ID NO: 30), CSPG (SEQ ID NO: 31), CPSC (SEQ ID NO: 32), CSSC (SEQ ID NO: 33), CGSC (SEQ ID NO: 34), CSGC (SEQ ID NO: 35), CPPPC (SEQ ID NO: 36), CGPPC (SEQ ID NO: 37), CPGPC (SEQ ID NO: 38), CPPGC (SEQ ID NO: 39), CGGPC (SEQ ID NO: 40), CPGGC (SEQ ID NO: 41), CGGGC (SEQ ID NO: 42), CSPPC (SEQ ID NO: 43), CPSPC (SEQ ID NO: 44), CPPSC (SEQ ID NO: 45), CSSPC (SEQ ID NO: 46), CPSSC (SEQ ID NO: 47), CSSSC (SEQ ID NO: 48), CGSPC (SEQ ID NO: 49), CPGSC (SEQ ID NO: 50), CSGPC (SEQ ID NO: 51) или CPSGC (SEQ ID NO: 52).

14. ScFv по любому из пп. 1-13, в котором L содержит от около 14 до около 19 аминокислот, например, около 14, около 15, около 16, около 17, около 18 или около 19 аминокислот.

15. scFv по любому из пп. 1-14, в котором L содержит аминокислотную последовательность $(X)_mC(X)_yC(X)_n$ (**SEQ ID NO: 25**); где X представляет собой Gly, Ser, Pro, Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Thr, Trp или Tyr, m представляет собой целое число от 6 до 9, y представляет собой целое число от 1 до 3, а n представляет собой целое число от 4 до 6.

16. scFv по п. 15, в котором L содержит аминокислотную последовательность $(X)_mC(X)_yC(X)_n$ (**SEQ ID NO: 26**); где X представляет собой Gly, Ser, Pro, Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Thr или Tyr, m представляет собой целое число от 6 до 9, y представляет собой целое число от 1 до 3, а n представляет собой целое число от 4 до 6.

17. scFv по п. 16, в котором L содержит аминокислотную последовательность $(X)_mC(X)_yC(X)_n$ (**SEQ ID NO: 27**); где X представляет собой Gly или Pro, m представляет собой целое число от 6 до 9, y представляет собой целое число от 1 до 3, а n представляет собой целое число от 4 до 6.

18. scFv по любому из пп. 1-17, в котором L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7.

19. scFv по любому из пп. 1-18, в котором scFv находится в ориентации VL-L-VH.

20. scFv по любому из пп. 1-18, в котором scFv находится в ориентации VH-L-VL.

21. scFv, содержащий VH, L и VL, где

a) VH содержит Cys в H105;

b) VL содержит Cys в L42;

- c) L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и
 - d) scFv находится в ориентации VL-L-VH.
22. scFv, содержащий VH, L и VL, где
- a) VH содержит Cys в H105;
 - b) VL содержит Cys в L45;
 - c) L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и
 - d) scFv находится в ориентации VL-L-VH.
23. scFv, содержащий VH, L и VL, где
- a) VH содержит Cys в H105;
 - b) VL содержит Cys в L39;
 - c) L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и
 - d) scFv находится в ориентации VL-L-VH.
24. scFv, содержащий VH, L и VL, где
- a) VH содержит Cys в H5;
 - b) VL содержит Cys в L42;
 - c) L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и
 - d) scFv находится в ориентации VL-L-VH.
25. scFv, содержащий VH, L и VL, где
- a) VH содержит Cys в H5;
 - b) VL содержит Cys в L45;
 - c) L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и
 - d) scFv находится в ориентации VL-L-VH.
26. scFv, содержащий VH, L и VL, где
- a) VH содержит Cys в H5;
 - b) VL содержит Cys в L39;
 - c) L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и
 - d) scFv находится в ориентации VL-L-VH.
27. scFv, содержащий VH, L и VL, где
- a) VH содержит Cys в H3;
 - b) VL содержит Cys в L42;
 - c) L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и
 - d) scFv находится в ориентации VL-L-VH.
28. scFv, содержащий VH, L и VL, где
- a) VH содержит Cys в H3;
 - b) VL содержит Cys в L45;
 - c) L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и
 - d) scFv находится в ориентации VL-L-VH.
29. scFv, содержащий VH, L и VL, где
- a) VH содержит Cys в H3;
 - b) VL содержит Cys в L39;

- c) L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и
d) scFv находится в ориентации VL-L-VH.
30. scFv, содержащий VH, L и VL, где
a) VH содержит Cys в H43;
b) VL содержит Cys в L100;
c) L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и
d) scFv находится в ориентации VH-L-VL.
31. scFv, содержащий VH, L и VL, где
a) VH содержит Cys в H43;
b) VL содержит Cys в L102;
c) L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и
d) scFv находится в ориентации VH-L-VL.
32. scFv, содержащий VH, L и VL, где
a) VH содержит Cys в H43;
b) VL содержит Cys в L5;
c) L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и
d) scFv находится в ориентации VH-L-VL.
33. scFv, содержащий VH, L и VL, где
a) VH содержит Cys в H43;
b) VL содержит Cys в L3;
c) L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и
d) scFv находится в ориентации VH-L-VL.
34. scFv, содержащий VH, L и VL, где
a) VH содержит Cys в H40;
b) VL содержит Cys в L100;
c) L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и
d) scFv находится в ориентации VH-L-VL.
35. scFv, содержащий VH, L и VL, где
a) VH содержит Cys в H40;
b) VL содержит Cys в L102;
c) L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и
d) scFv находится в ориентации VH-L-VL.
36. scFv, содержащий VH, L и VL, где
a) VH содержит Cys в H40;
b) VL содержит Cys в L5;
c) L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и
d) scFv находится в ориентации VH-L-VL.
37. scFv, содержащий VH, L и VL, где
a) VH содержит Cys в H40;
b) VL содержит Cys в L3;

- c) L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и
d) scFv находится в ориентации VH-L-VL.
38. scFv, содержащий VH, L и VL, где
a) VH содержит Cys в H46;
b) VL содержит Cys в L100;
c) L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и
d) scFv находится в ориентации VH-L-VL.
39. scFv, содержащий VH, L и VL, где
a) VH содержит Cys в H46;
b) VL содержит Cys в L102;
c) L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и
d) scFv находится в ориентации VH-L-VL.
40. scFv, содержащий VH, L и VL, где
a) VH содержит Cys в H46;
b) VL содержит Cys в L5;
c) L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и
d) scFv находится в ориентации VH-L-VL.
41. scFv, содержащий VH, L и VL, где
a) VH содержит Cys в H46;
b) VL содержит Cys в L3;
c) L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и
d) scFv находится в ориентации VH-L-VL.
42. scFv по любому из пп. 21-41, в котором L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.
43. scFv по любому из пп. 21-41, в котором L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.
44. scFv по любому из пп. 21-41, в котором L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.
45. scFv по любому из пп. 1-44, в котором scFv конъюгирован со второй молекулой.
46. scFv по п. 45, в котором вторая молекула представляет собой фрагмент, увеличивающий время полувыведения.
47. scFv по п. 46, в котором фрагмент, увеличивающий время полувыведения, представляет собой иммуноглобулин (Ig), фрагмент Ig, константную область Ig, фрагмент константной области Ig, область Fc, трансферрин, альбумин, альбумин-связывающий домен или полиэтиленгликоль.
48. scFv по п. 45, в котором вторая молекула представляет собой цитотоксический агент или обнаруживаемую метку.
49. scFv по п. 48, в котором вторая молекула представляет собой антитело или его фрагмент.
50. scFv по п. 49, в котором scFv и антитело или его фрагмент связывают отдельные

антигены.

51. scFv по п. 45, в котором вторая молекула представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR).

52. Фармацевтическая композиция, содержащая scFv по любому из пп. 1-51 и фармацевтически приемлемый носитель.

53. Полинуклеотид, кодирующий scFv по любому из пп. 1-44.

54. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 53.

55. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 54.

56. Способ получения scFv по любому из пп. 1-44, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 55 в условиях, в которых выделяется scFv, и очистку scFv.

57. Способ по п. 56, в котором клетка-хозяин представляет собой прокариотическую клетку.

58. Способ по п. 56, в котором клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку.

59. Антиидиотипическое антитело, которое связывается с scFv по любому из пп. 1-44.

60. Набор, содержащий scFv по любому из пп. 1-44.

61. Мультиспецифическая молекула, содержащая scFv по любому из пп. 1-44.

62. Мультиспецифическая молекула по п. 61, в которой мультиспецифическая молекула содержит антитело или фрагмент антитела.

63. Мультиспецифическая молекула по п. 61, в которой мультиспецифический белок содержит константную область Ig или фрагмент константной области Ig.

64. Мультиспецифический белок по п. 63, в котором фрагмент константной области Ig содержит область Fc.

65. Мультиспецифическая молекула по п. 63, в которой фрагмент константной области Ig содержит домен CH2.

66. Мультиспецифическая молекула по п. 63, в которой фрагмент константной области Ig содержит домен CH3.

67. Мультиспецифическая молекула по п. 63, в которой фрагмент константной области Ig содержит домен CH2 и домен CH3.

68. Мультиспецифическая молекула по п. 63, в которой фрагмент константной области Ig содержит по меньшей мере часть шарнира, домена CH2 и домена CH3.

69. Мультиспецифическая молекула по п. 63, в которой фрагмент константной области Ig содержит шарнир, домен CH2 и домен CH3.

70. Мультиспецифическая молекула по любому из пп. 63-69, в которой scFv конъюгирован с N-концом константной области Ig или с N-концом фрагмента константной области Ig.

71. Мультиспецифическая молекула по любому из пп. 63-69, в которой scFv конъюгирован с C-концом константной области Ig или с N-концом фрагмента константной области Ig.

72. Мультиспецифическая молекула по любому из пп. 63-71, в которой константная область Ig или фрагмент константной области Ig представляют собой IgG1, IgG2 и IgG3 или изотип IgG4.

73. Мультиспецифическая молекула по любому из пп. 63-72, в которой константная область Ig или фрагмент константной области Ig содержат по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к снижению связывания мультиспецифической молекулы с FcγR.

74. Мультиспецифическая молекула по п. 73, в которой указанную по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к снижению связывания мультиспецифической молекулы с FcγR, выбирают из группы, состоящей из F234A/L235A, L234A/L235A, L234A/L235A/D265S, V234A/G237A/ P238S/H268A/V309L/A330S/P331S, F234A/L235A, S228P/F234A/ L235A, N297A, V234A/G237A, K214T/E233P/ L234V/L235A/G236-делеция/A327G/P331A/D365E/L358M, H268Q/V309L/A330S/P331S, S267E/L328F, L234F/L235E/D265A, L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S, S228P/F234A/L235A/G237A/P238S и S228P/F234A/L235A/G236-делеция/G237A/P238S, причем нумерация остатков соответствует каталогу ЕС.

75. Мультиспецифическая молекула по любому из пп. 63-72, в которой константная область Ig или фрагмент константной области Ig содержат по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к усилению связывания мультиспецифической молекулы с FcγR.

76. Мультиспецифическая молекула по п. 75, в которой указанную по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к усилению связывания мультиспецифической молекулы с FcγR выбирают из группы, состоящей из S239D/I332E, S298A/E333A/K334A, F243L/R292P/Y300L, F243L/R292P/Y300L/P396L, F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L и G236A/S239D/I332E, причем нумерация остатков соответствует каталогу ЕС.

77. Мультиспецифическая молекула по любому из пп. 73-76, в которой FcγR представляет собой FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB или FcγRIII или любую их комбинацию.

78. Мультиспецифическая молекула по любому из пп. 63-72, в которой константная область Ig или фрагмент константной области Ig содержат по меньшей мере одну мутацию, которая модулирует период полужизни мультиспецифической молекулы.

79. Мультиспецифическая молекула по п. 78, в которой указанную по меньшей мере одну мутацию, которая модулирует период полужизни мультиспецифической молекулы выбирают из группы, состоящей из H435A, P257I/N434H, D376V/N434H, M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F, T308P/N434A и H435R, причем нумерация остатков соответствует каталогу ЕС.

80. Мультиспецифическая молекула по любому из пп. 63-72, в которой константная область Ig или фрагмент константной области Ig содержат по меньшей мере одну мутацию в домене CH3.

81. Мультиспецифическая молекула по п. 80, в которой по меньшей мере одну мутацию в домене CH3 выбирают из группы, состоящей из T350V, L351Y, F405A, Y407V, T366Y, T366W, F405W, T394W, T394S, Y407T, Y407A, T366S/L368A/Y407V, L351Y/F405A/Y407V, T366I/K392M/T394W, F405A/Y407V, T366L/K392M/T394W,

L351Y/Y407A, T366A/K409F, L351Y/Y407A, T366V/K409F, T366A/K409F, T350V/L351Y/F405A/Y407V и T350V/T366L/K392L/T394W, причем нумерация остатков соответствует каталогу ЕС.

82. Мультиспецифическая молекула по любому из пп. 61-81, в которой мультиспецифическая молекула является биспецифической.

83. Мультиспецифическая молекула по любому из пп. 61-81, в которой мультиспецифическая молекула является триспецифической.

84. Мультиспецифическая молекула по любому из пп. 61-81, в которой мультиспецифическая молекула является тетраспецифической.

85. Фармацевтическая композиция, содержащая мультиспецифическую молекулу по любому из пп. 61-84 и фармацевтически приемлемый носитель.

86. Гетерологичная молекула, содержащая scFv по любому из пп. 1-44.

87. Гетерологичная молекула по п. 86, в которой scFv конъюгирован со вторым белком, полинуклеотидом, терапевтическим агентом, цитотоксическим агентом или обнаруживаемой меткой.

88. Гетерологичная молекула по п. 87, в которой второй белок представляет собой антитело или его фрагмент.

89. Гетерологичная молекула по п. 87, в которой второй белок представляет собой альтернативный каркас.

90. Гетерологичная молекула по п. 87, в которой второй белок представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR) или его фрагмент.

91. Гетерологичная молекула по любому из пп. 86-90, в которой гетерологичная молекула является моноспецифической.

92. Гетерологичная молекула по любому из пп. 86-90, в которой гетерологичная молекула является мультиспецифической.

93. Гетерологичная молекула по п. 92, в которой гетерологичная молекула является биспецифической.

94. Гетерологичная молекула по п. 92, в которой гетерологичная молекула является триспецифической.

95. Гетерологичная молекула по п. 92, в которой гетерологичная молекула является тетраспецифической.

96. Фармацевтическая композиция, содержащая гетерологичную молекулу по любому из пп. 86-95 и фармацевтически приемлемый носитель.

97. Способ получения стабилизированного scFv, включающий:

обеспечение вариабельной области тяжелой цепи (VH) и вариабельной области легкой цепи (VL), которые образуют антигенсвязывающий домен;

обеспечение линкера (L), который содержит или сконструирован таким образом, чтобы содержать первый Cys L;

конструирование VH таким образом, чтобы содержать Cys VH в положении каркасного остатка на структурно консервативной поверхности VH; и

образование дисульфидной связи между Cys VH и первым Cys L для получения стабилизированного scFv.

98. Способ получения стабилизированного scFv, включающий:

обеспечение VH и VL, которые образуют антигенсвязывающий домен;

обеспечение L, который содержит или сконструирован таким образом, чтобы содержать второй Cys L;

конструирование VL таким образом, чтобы содержать Cys VL в положении каркасного остатка на структурно консервативной поверхности VL; и

образование дисульфидной связи между Cys VL и вторым Cys L для получения стабилизированного scFv.

99. Способ получения стабилизированного scFv, включающий:

обеспечение VH и VL, которые образуют антигенсвязывающий домен;

обеспечение L, который содержит или сконструирован таким образом, чтобы содержать первый Cys L и второй Cys L;

конструирование VH таким образом, чтобы содержать Cys VH в положении каркасного остатка на структурно консервативной поверхности VH;

конструирование VL таким образом, чтобы содержать Cys VL в положении каркасного остатка на структурно консервативной поверхности VL; и

образование дисульфидной связи между Cys VH и первым Cys L и дисульфидной связи между Cys VL и вторым Cys L для получения стабилизированного scFv.

100. Способ по любому из пп. 97-99, в котором стабилизированный scFv представляет собой scFv по любому из пп. 1-44.

101. Способ по любому из пп. 97-100, в котором стабилизированный scFv связывает антиген с сопоставимой аффинностью по сравнению с контрольным scFv, который не содержит дисульфидных связей.

102. Способ получения стабилизированного scFv, включающий:

а) обеспечение полинуклеотида, кодирующего VH, L и VL, в котором:

VH содержит Cys в H105, а VL содержит Cys в L42;

VH содержит Cys в H43, а VL содержит Cys в L100;

VH содержит Cys в H3, а VL содержит Cys в L3;

VH содержит Cys в H3, а VL содержит Cys в L5;

VH содержит Cys в H3, а VL содержит Cys в L39;

VH содержит Cys в H3, а VL содержит Cys в L42;

VH содержит Cys в H3, а VL содержит Cys в L45;

VH содержит Cys в H3, а VL содержит Cys в L100;

VH содержит Cys в H3, а VL содержит Cys в L102;

VH содержит Cys в H5, а VL содержит Cys в L3;

VH содержит Cys в H5, а VL содержит Cys в L5;

VH содержит Cys в H5, а VL содержит Cys в L39;

VH содержит Cys в H5, а VL содержит Cys в L42;

VH содержит Cys в H5, а VL содержит Cys в L45;
VH содержит Cys в H5, а VL содержит Cys в L100;
VH содержит Cys в H5, а VL содержит Cys в L102;
VH содержит Cys в H40, а VL содержит Cys в L3;
VH содержит Cys в H40, а VL содержит Cys в L5;
VH содержит Cys в H40, а VL содержит Cys в L39;
VH содержит Cys в H40, а VL содержит Cys в L42;
VH содержит Cys в H40, а VL содержит Cys в L45;
VH содержит Cys в H40, а VL содержит Cys в L100;
VH содержит Cys в H40, а VL содержит Cys в L102;
VH содержит Cys в H43, а VL содержит Cys в L3;
VH содержит Cys в H43, а VL содержит Cys в L5;
VH содержит Cys в H43, а VL содержит Cys в L39;
VH содержит Cys в H43, а VL содержит Cys в L42;
VH содержит Cys в H43, а VL содержит Cys в L45;
VH содержит Cys в H43, а VL содержит Cys в L102;
VH содержит Cys в H46, а VL содержит Cys в L3;
VH содержит Cys в H46, а VL содержит Cys в L5;
VH содержит Cys в H46, а VL содержит Cys в L39;
VH содержит Cys в H46, а VL содержит Cys в L42;
VH содержит Cys в H46, а VL содержит Cys в L45;
VH содержит Cys в H46, а VL содержит Cys в L100;
VH содержит Cys в H46, а VL содержит Cys в L102;
VH содержит Cys в H105, а VL содержит Cys в L3;
VH содержит Cys в H105, а VL содержит Cys в L5;
VH содержит Cys в H105, а VL содержит Cys в L39;
VH содержит Cys в H105, а VL содержит Cys в L45;
VH содержит Cys в H105, а VL содержит Cys в L100; или
VH содержит Cys в H105, а VL содержит Cys в L102,
где остатки нумеруются по системе Чотиа.

b) L содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6 или 7; и

c) экспрессию полинуклеотида в клетке-хозяине для получения стабилизированного scFv.

103. Способ по п. 102, в котором клетка-хозяин представляет собой прокариотическую клетку.

104. Способ по п. 102, в котором клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку.

105. Выделенный одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), содержащий переменную область тяжелой цепи (VH), средство для связывания (L) и переменную область легкой цепи (VL), причем scFv содержит:

а) первую дисульфидную связь между подвергнутым воздействию структурно-конструктивной поверхности VH цистеином (Cys) и первым Cys L;

б) вторую дисульфидную связь между Cys на структурно консервативной поверхности VL и вторым Cys L; или

с) первую дисульфидную связь между Cys на структурно консервативной поверхности VH и первым Cys L, и вторую дисульфидную связь между Cys на структурно консервативной поверхности VL и вторым Cys L.

106. Выделенный одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), содержащий средство для связывания антигена, линкер (L) и переменную область легкой цепи (VL), причем scFv содержит:

а) первую дисульфидную связь между цистеином (Cys) на структурно консервативной поверхности, предназначенным для связывания антигена, и первым Cys L;

б) вторую дисульфидную связь между Cys на структурно консервативной поверхности VL и вторым Cys L; или

с) первую дисульфидную связь между Cys на структурно консервативной поверхности, предназначенным для связывания антигена, и первым Cys L, и вторую дисульфидную связь между Cys на структурно консервативной поверхности VL и вторым Cys L.

107. Выделенный одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), содержащий переменную область тяжелой цепи (VH), линкер (L) и средство для связывания антигена, причем scFv содержит:

а) первую дисульфидную связь между подвергнутым воздействию структурно-конструктивной поверхности VH цистеином (Cys) и первым Cys L;

б) вторую дисульфидную связь между Cys на структурно консервативной поверхности, предназначенным для связывания антигена, и вторым Cys L; или

с) первую дисульфидную связь между Cys на структурно консервативной поверхности VH и первым Cys L, и вторую дисульфидную связь между Cys на структурно консервативной поверхности, предназначенным для связывания антигена, и вторым Cys L.

108. Мультиспецифическая молекула, содержащая одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), содержащий переменную область тяжелой цепи (VH), средство для связывания (L) и переменную область легкой цепи (VL), причем scFv содержит:

а) первую дисульфидную связь между подвергнутым воздействию структурно-конструктивной поверхности VH цистеином (Cys) и первым Cys L;

б) вторую дисульфидную связь между Cys на структурно консервативной поверхности VL и вторым Cys L; или

с) первую дисульфидную связь между Cys на структурно консервативной поверхности VH и первым Cys L, и вторую дисульфидную связь между Cys на структурно консервативной поверхности VL и вторым Cys L.

109. Мультиспецифическая молекула, содержащая одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), содержащий средство для связывания антигена, линкер (L) и

вариабельную область легкой цепи (VL), причем scFv содержит:

- а) первую дисульфидную связь между цистеином (Cys) на структурно консервативной поверхности, предназначенным для связывания антигена, и первым Cys L;
- б) вторую дисульфидную связь между Cys на структурно консервативной поверхности VL и вторым Cys L; или
- с) первую дисульфидную связь между Cys на структурно консервативной поверхности, предназначенным для связывания антигена, и первым Cys L, и вторую дисульфидную связь между Cys на структурно консервативной поверхности VL и вторым Cys L.

110. Мультиспецифическая молекула, содержащая одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий вариабельную область тяжелой цепи (VH), линкер (L) и средство для связывания антигена (VL), причем scFv содержит:

- а) первую дисульфидную связь между подвергнутым воздействию структурно-конструктивной поверхности VH цистеином (Cys) и первым Cys L;
- б) вторую дисульфидную связь между Cys на структурно консервативной поверхности, предназначенным для связывания антигена, и вторым Cys L; или
- с) первую дисульфидную связь между Cys на структурно консервативной поверхности VH и первым Cys L, и вторую дисульфидную связь между Cys на структурно консервативной поверхности, предназначенным для связывания антигена, и вторым Cys L.

111. Гетерологичная молекула, содержащая одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий вариабельную область тяжелой цепи (VH), средство для связывания (L) и вариабельную область легкой цепи (VL), причем scFv содержит:

- а) первую дисульфидную связь между подвергнутым воздействию структурно-конструктивной поверхности VH цистеином (Cys) и первым Cys L;
- б) вторую дисульфидную связь между Cys на структурно консервативной поверхности VL и вторым Cys L; или
- с) первую дисульфидную связь между Cys на структурно консервативной поверхности VH и первым Cys L, и вторую дисульфидную связь между Cys на структурно консервативной поверхности VL и вторым Cys L.

112. Гетерологичная молекула, содержащая одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий средство для связывания антигена, линкер (L) и вариабельную область легкой цепи (VL), причем scFv содержит:

- а) первую дисульфидную связь между цистеином (Cys) на структурно консервативной поверхности, предназначенным для связывания антигена, и первым Cys L;
- б) вторую дисульфидную связь между Cys на структурно консервативной поверхности VL и вторым Cys L; или
- с) первую дисульфидную связь между Cys на структурно консервативной поверхности, предназначенным для связывания антигена, и первым Cys L, и вторую дисульфидную связь между Cys на структурно консервативной поверхности VL и вторым Cys L.

113. Гетерологичная молекула, содержащая одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), содержащий переменную область тяжелой цепи (VH), линкер (L) и средство для связывания антигена, причем scFv содержит:

а) первую дисульфидную связь между подвергнутому воздействию структурно-конструктивной поверхности VH цистеином (Cys) и первым Cys L;

б) вторую дисульфидную связь между Cys на структурно консервативной поверхности, предназначенным для связывания антигена, и вторым Cys L; или

в) первую дисульфидную связь между Cys на структурно консервативной поверхности VH и первым Cys L, и вторую дисульфидную связь между Cys на структурно консервативной поверхности, предназначенным для связывания антигена, и вторым Cys L.

114. Средство для кодирования scFv по любому из пп. 105-113.

115. Средство для репликации вектора 114.

116. Композиция, содержащая средство для стабилизации scFv.

117. Композиция, содержащая средство для повышения термостабильности scFv.

118. Композиция по п. 116 или 117, в которой средство включает образование дисульфидной связи между VH и L, между VL и L или между VH и L и между VL и L.

119. Мультиспецифическая молекула, содержащая средство для стабилизации scFv.

120. Мультиспецифическая молекула, содержащая средство для повышения термостабильности scFv.

121. Мультиспецифическая молекула по п. 119 или 120, в которой средство включает образование дисульфидной связи между VH и L, между VL и L или между VH и L и между VL и L.

122. Гетерологичная молекула, содержащая средство для стабилизации scFv.

123. Гетерологичная молекула, содержащая средство для повышения термостабильности scFv.

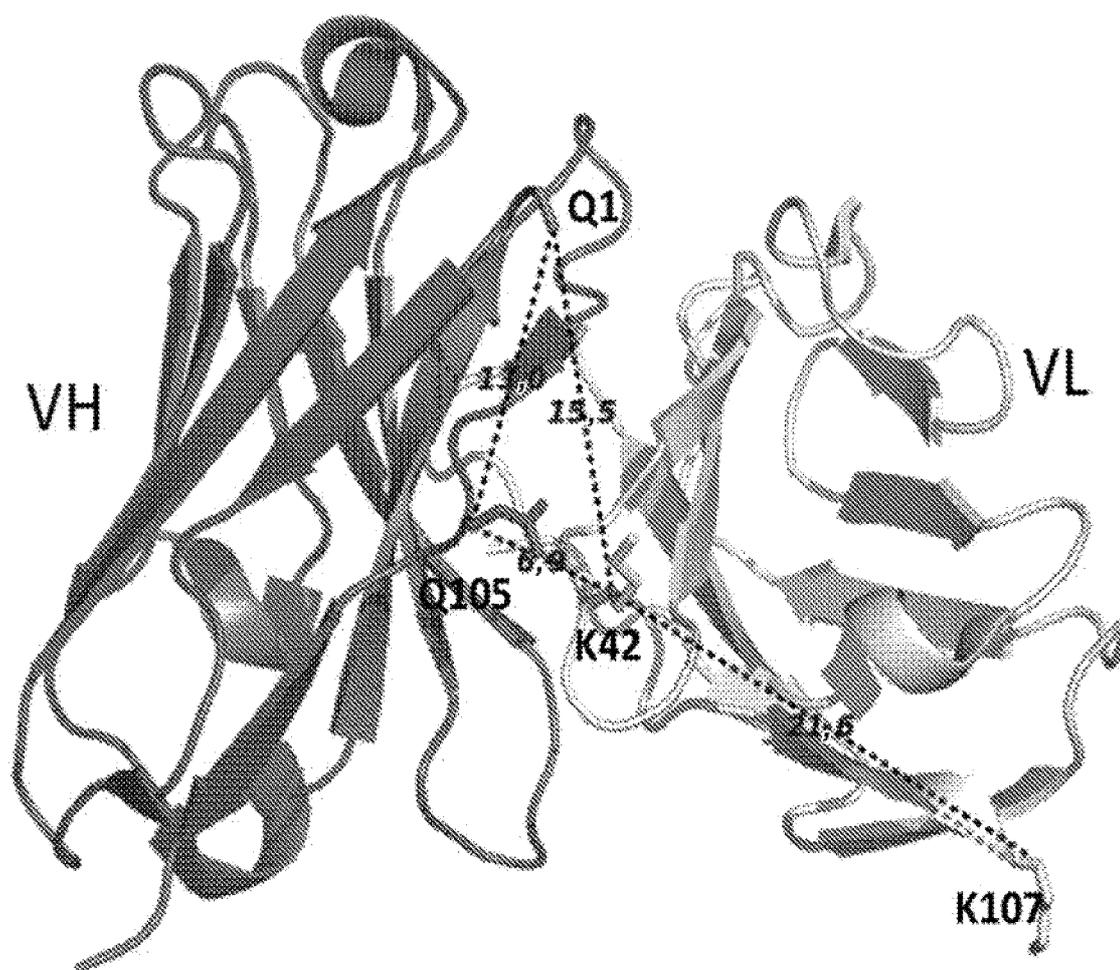
124. Гетерологичная молекула по п. 122 или 123, в которой средство включает образование дисульфидной связи между VH и L, между VL и L или между VH и L и между VL и L.

125. Средство для получения композиции по любому из пп. 116-118.

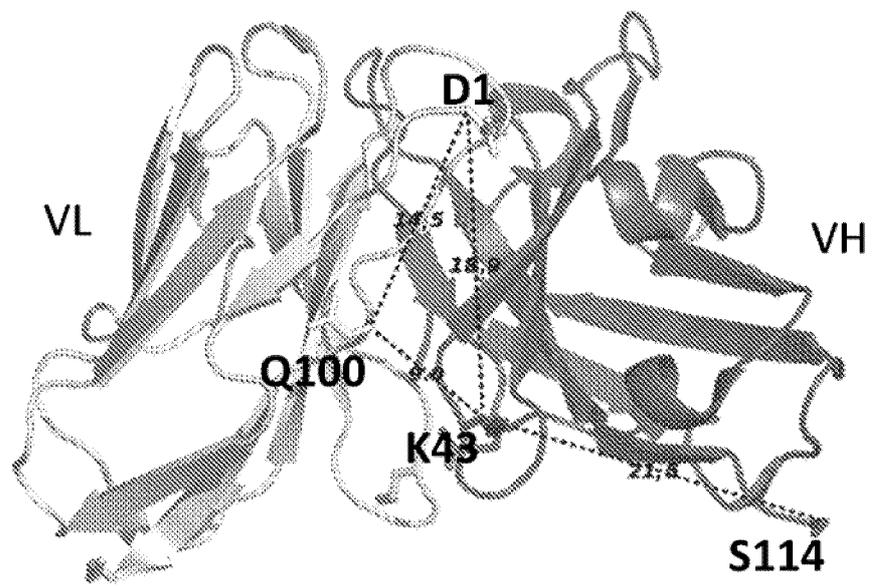
126. Средство для получения мультиспецифической молекулы по любому из пп. 119-121.

127. Средство для получения гетерологичной молекулы по любому из пп. 122-124.

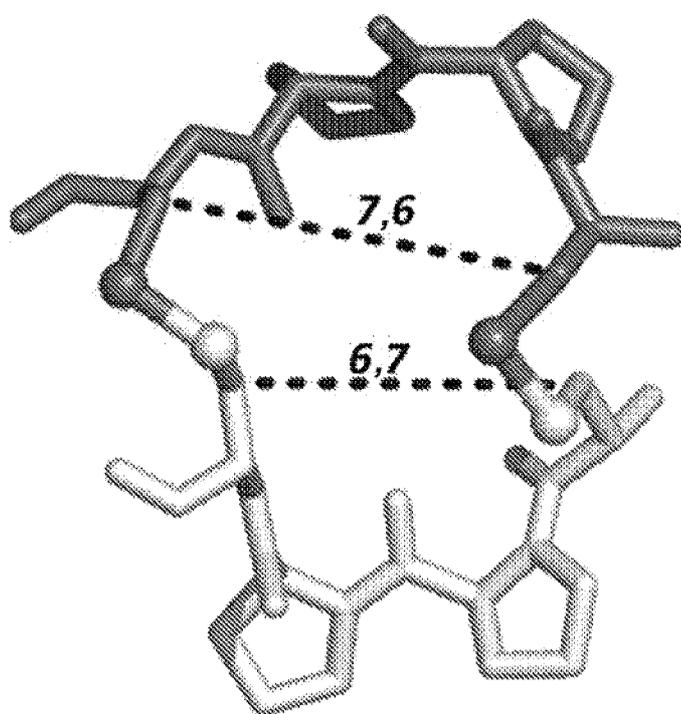
По доверенности



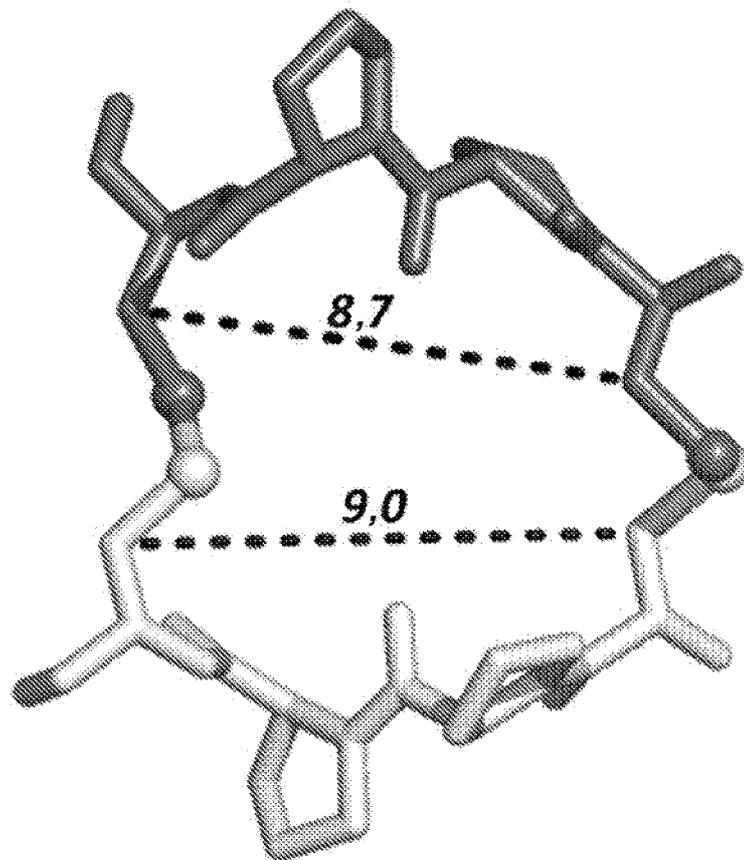
ФИГ. 2



ФИГ. 3



ФИГ. 4



ФИГ. 5

VL:

	10	20	30abc	40	50	60
GLk1VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ	---	SYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS			
GLk2VL	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQ	---	SYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPD			
CAT2200VL	NFMLTQPHS-VSESPGKTVTISCTRSSG	SLAN-	YYVQWYQQRPGSSPTIVIFANNQRPSGVPD			
CAT2200bVL	NFMLTQPHS-VSESPGKTVTISCTRSSG	SLAN-	YYVQWYQQRPGSSPTIVIFANNQRPSGVPD			

1

	ab	70	80	90	a	100
GLk1VL	RFSGSG--SGTDFTLTIS	SLQPEDFATYYCQQSYSTP-LTFG	Q	GTKVEIK		
GLk2VL	RFSGSG--SGTDFTLTIS	RLQPEDFAVYYCQDYGF	WTFG	Q	GTKVEIK	
CAT2200VL	RFSGSIDSSSNSASLTIS	GLKTEDEADYYCQTYDPYS-VVFGG	G	GTKLTVL		
CAT2200bVL	RFSGSIDSSSNSASLTIS	GLKTEDEADYYCQTYDPYS-VVFGG	G	GTKLTVL		

2

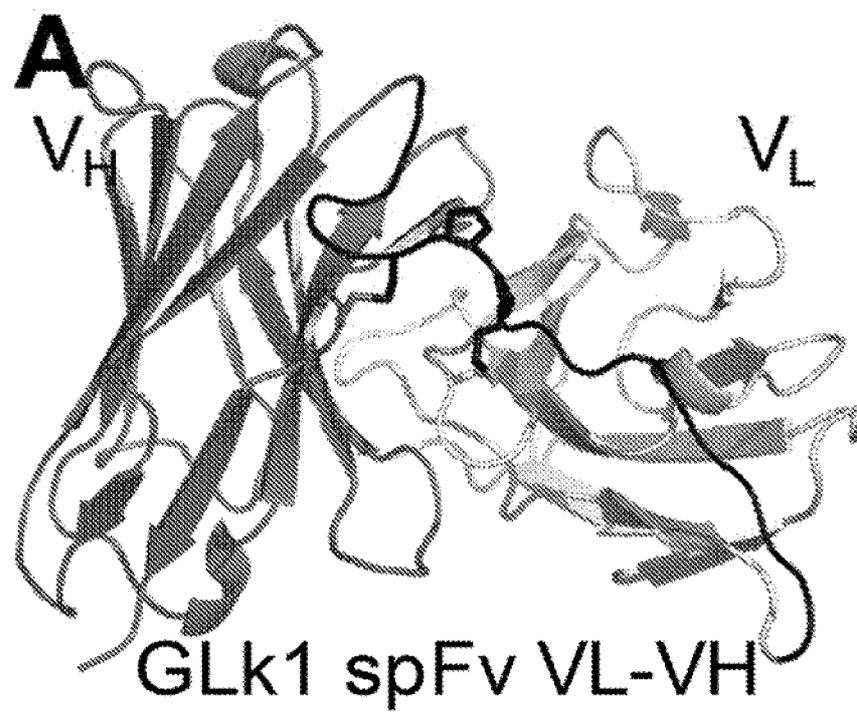
6/26

ФИГ. 6

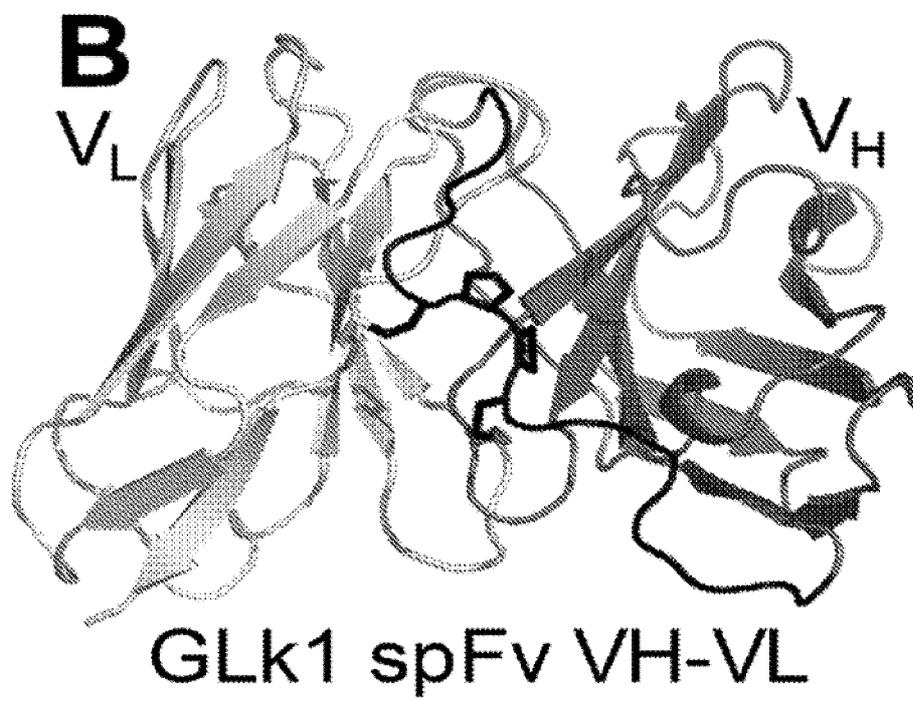
VH:

	10	20	30 ab	40	50 abc	60
GLk1VH	EVQLLESGGGLVQP	GGSLRLSCAASGFTFSS	--YAMSWVRQAPGK	GLEWVSAISG	--SGGSTYYA	
GLk2VH	EVQLVQSGAEVKKP	GESLKISCKGSGYSFTS	--YWISWVRQMPGK	GLEWMGIIDP	--SDSDTRYS	
CAT2200aVH	EVQLLESGGGLVQP	GGSLRLSCAASGFGFSS	--YAMSWVRQAPGK	GLEWVSAISG	--SGGSTYYA	
				2		
	70	80 abc	90	100abcdef	110	
GLk1VH	DSVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYDGIYGEL	----DFWG	Q	GTLVTVSS	
GLk2VH	PSFQGQVTISADK	SISTAYLQWSSLKASDTAMYVCARGDGSTD	----DYWG	Q	GTLVTVSS	
CAT2200aVH	DSVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLIHGVT	----RNWG	Q	GTLVTVSS	
				1		

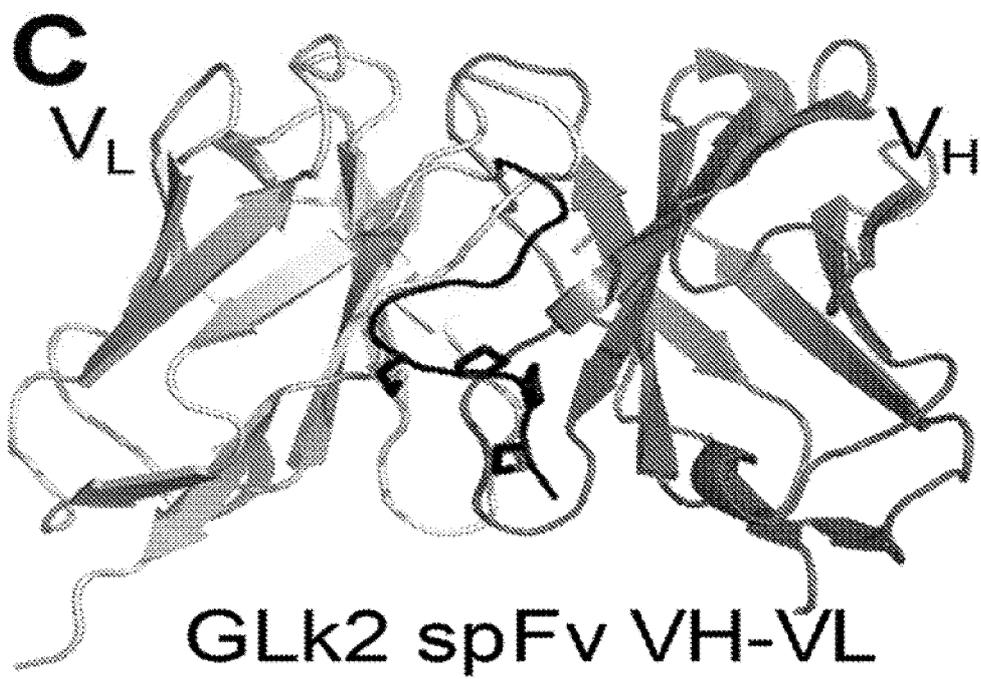
ФИГ. 7



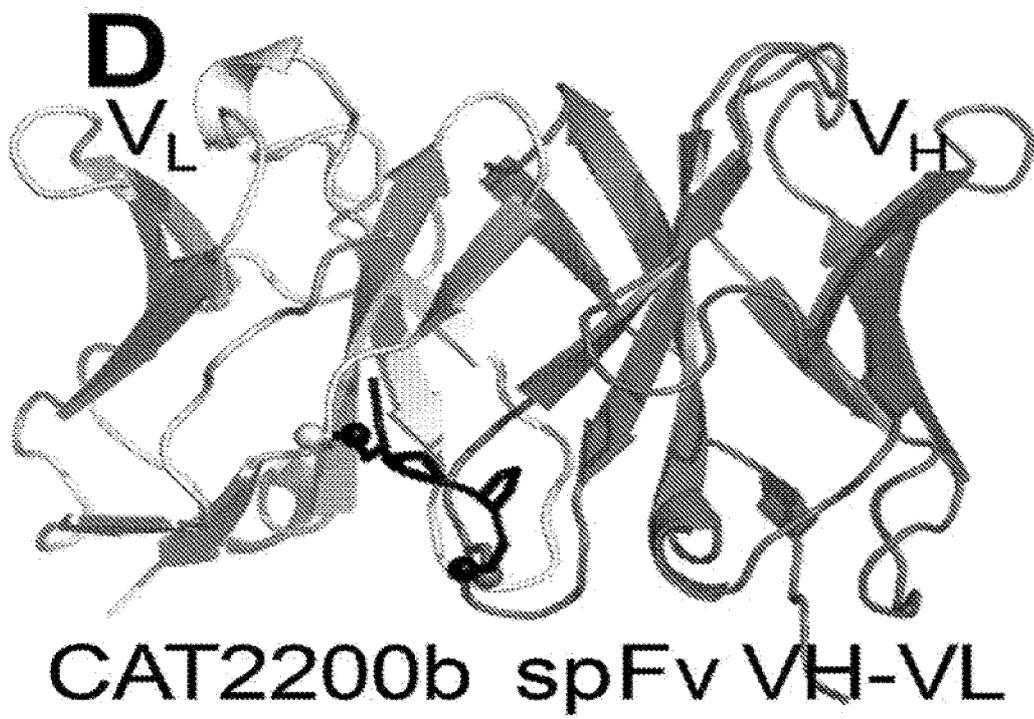
ФИГ. 8



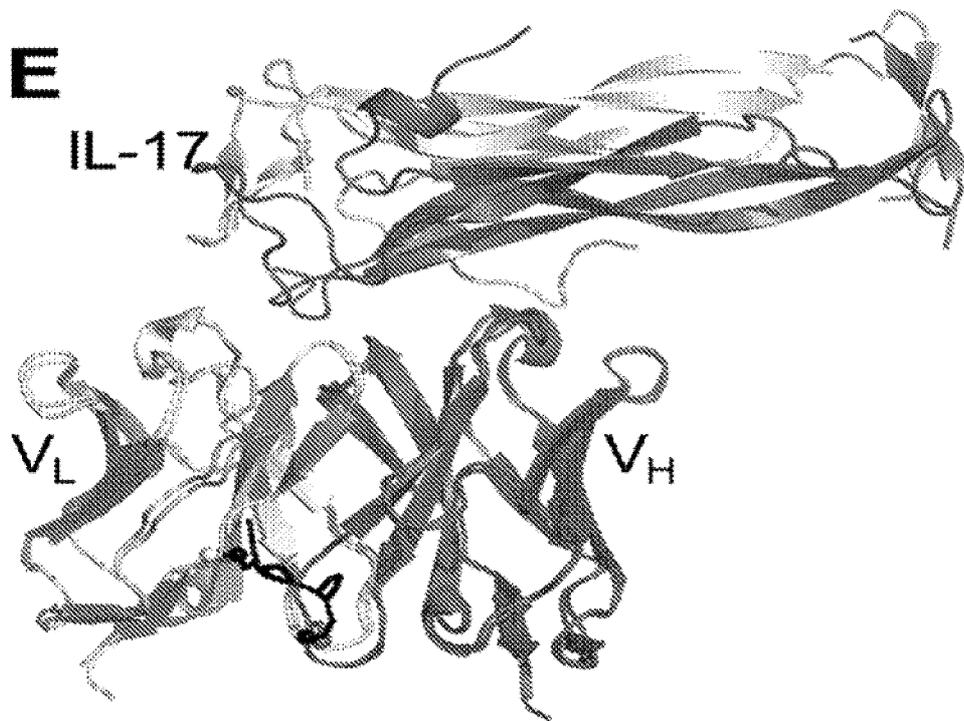
ФИГ. 9



ФИГ. 10

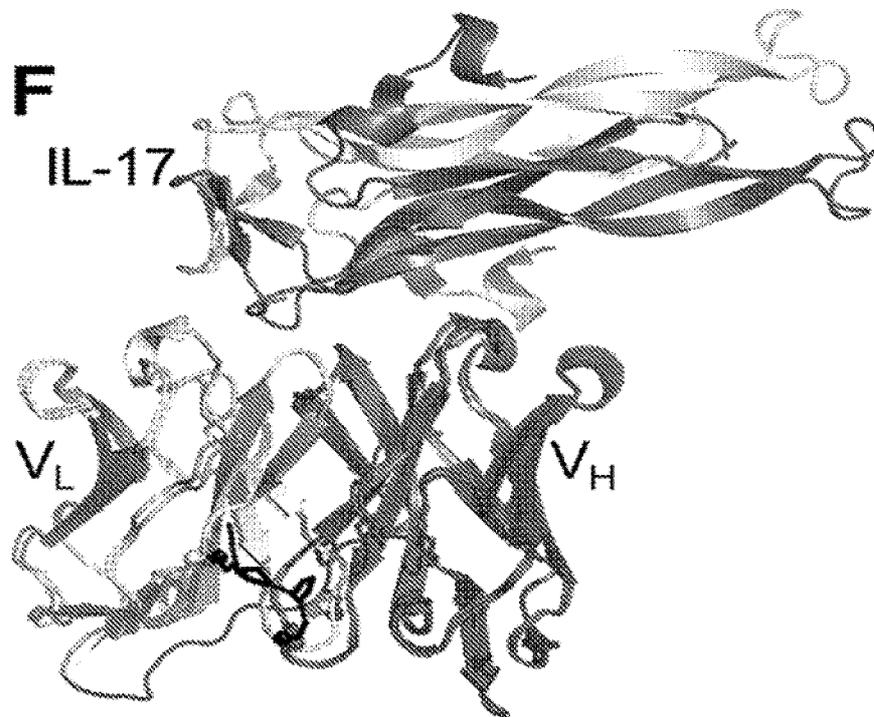


ФИГ. 11



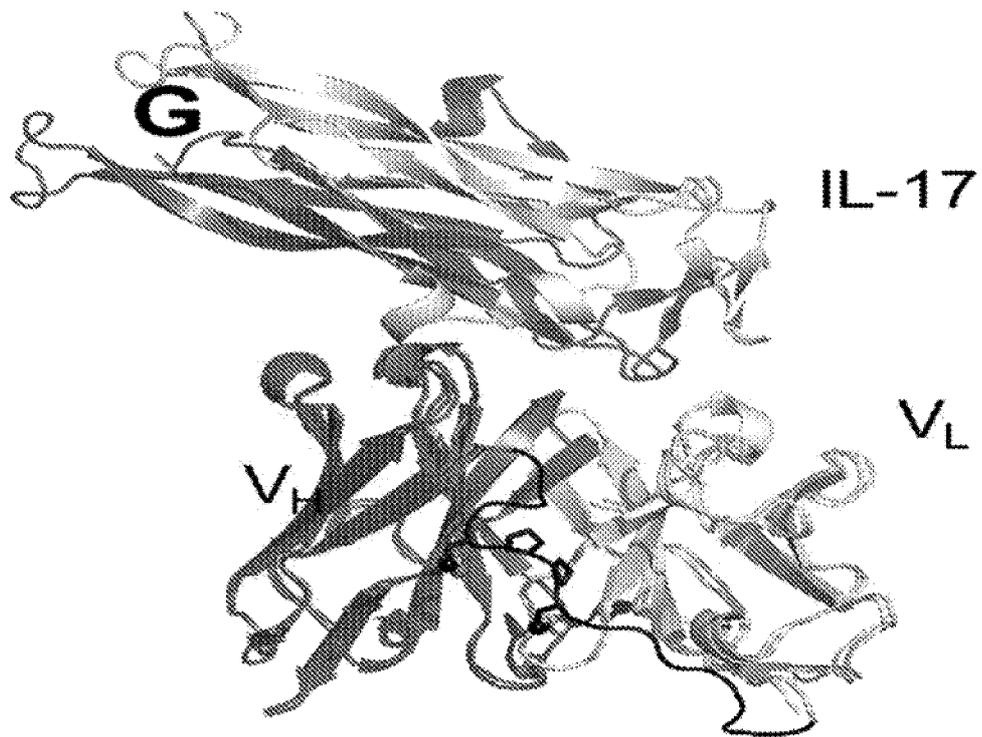
spFv-VHVL-несвязанный
по сравнению с
scFv-VLVH-связанным

ФИГ. 12



spFv-VHVL-несвязанный
по сравнению с scFv-VLVH-
связанным (спереди)

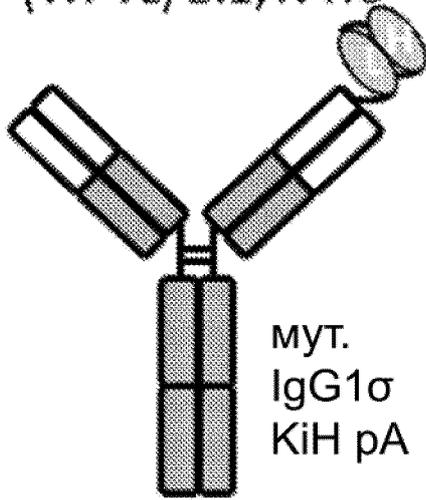
ФИГ. 13



spFv-VHVL-несвязанный
по сравнению с scFv-VLVH-
связанным (сзади)

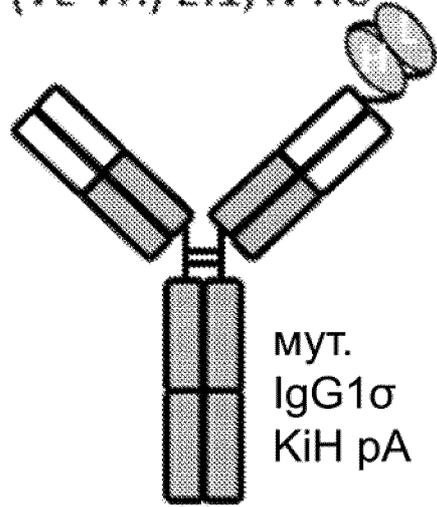
ФИГ. 14

B21M-spScFvLTBRmAb1
(VH-VL) 2:1; N-НС



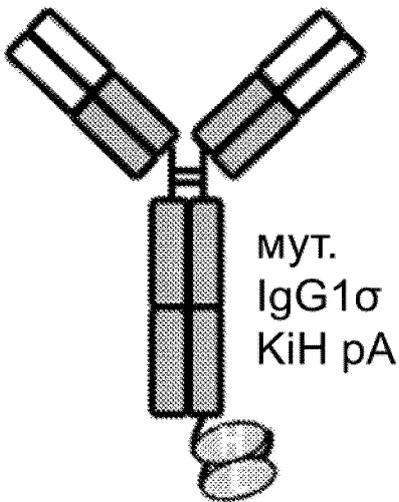
COVA1484
ФИГ. 15А

B21M-spScFvLTBRmAb1
(VL-VH) 2:1; N-НС



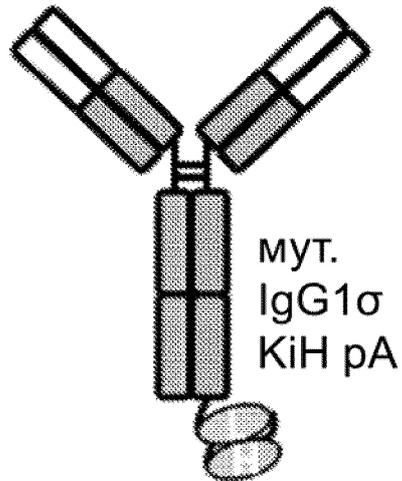
COVA1485
ФИГ. 15В

B21M-spScFvLTBRmAb1
(VH-VL) 2:1; C-НС



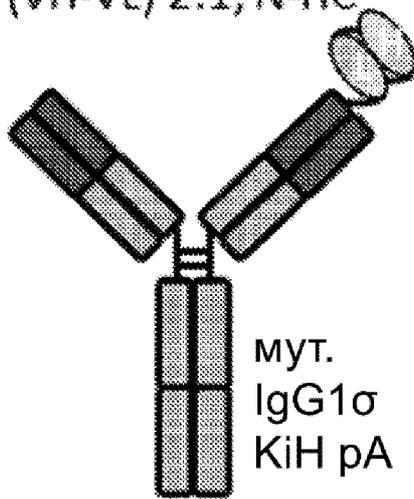
COVA1486
ФИГ. 15С

B21M-spScFvLTBRmAb1
(VL-VH) 2:1; C-НС



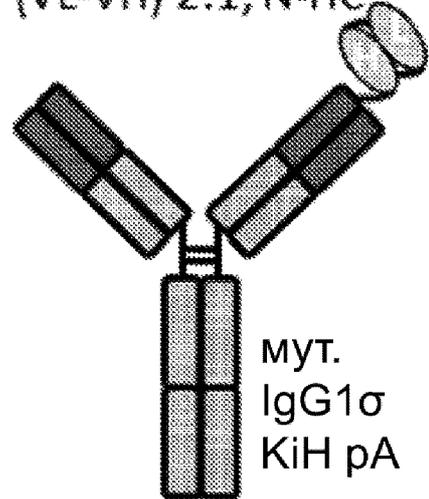
COVA1487
ФИГ. 15D

EDBmAb1-spScFvLTBRmAb1
(VH-VL) 2:1; N-HC



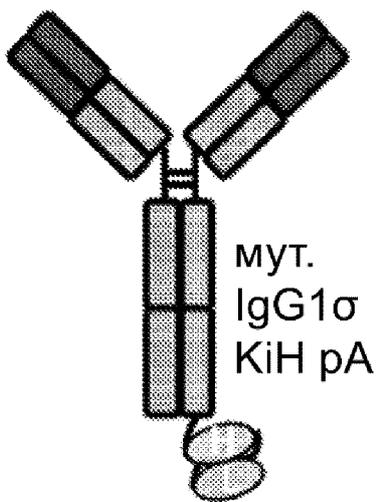
COVA1480
ФИГ. 15Е

EDBmAb1-spScFvLTBRmAb1
(VL-VH) 2:1; N-HC



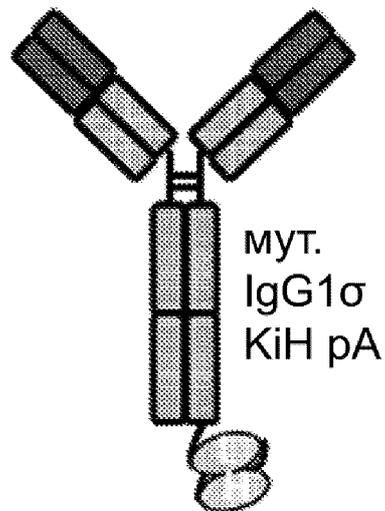
COVA1481
ФИГ. 15F

EDBmAb1-spScFvLTBRmAb1
(VH-VL) 2:1; C-HC



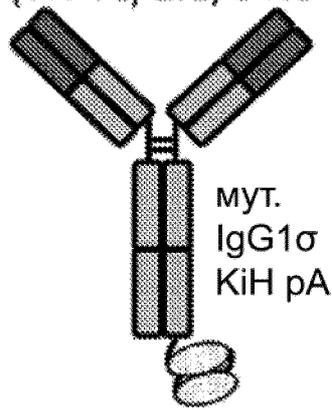
COVA1482
ФИГ. 15G

EDBmAb1-spScFvLTBRmAb1
(VL-VH) 2:1; C-HC



COVA1483
ФИГ. 15H

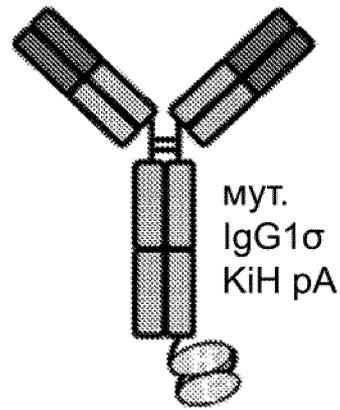
EDBmAb1-
spscFv VL3_Y36F_S49Y_F87Y LTBRmAb1
(VH-VL) 2:1; C-HC



COVA14107

ФИГ. 15I

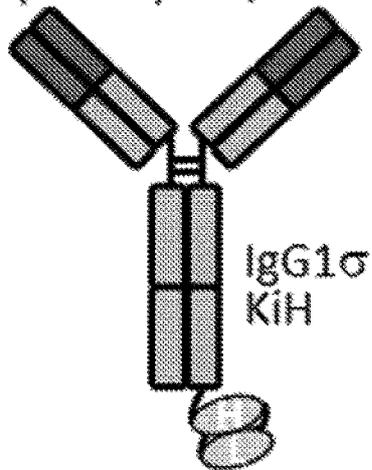
EDBmAb1-
spscFv VH_CDR1_Y33A LTBRmAb1
(VH-VL) 2:1; C-HC fusion



COVA14108

ФИГ. 15J

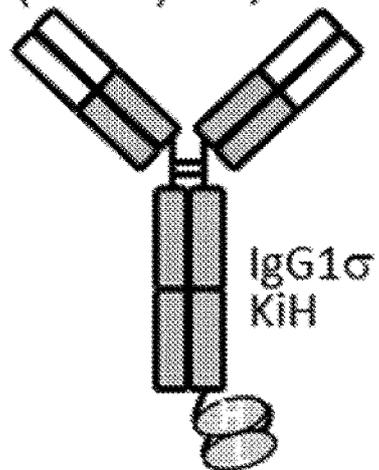
EDBmAb1-spscFvLTBRmAb1
(VH-VL) 2:1; C-HC



COVA14133

ФИГ. 15K

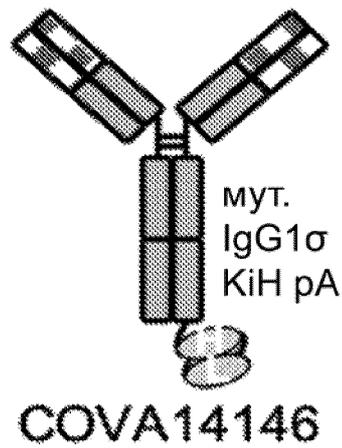
B21M-spscFvLTBRmAb1
(VH-VL) 2:1; C-HC



COVA14136

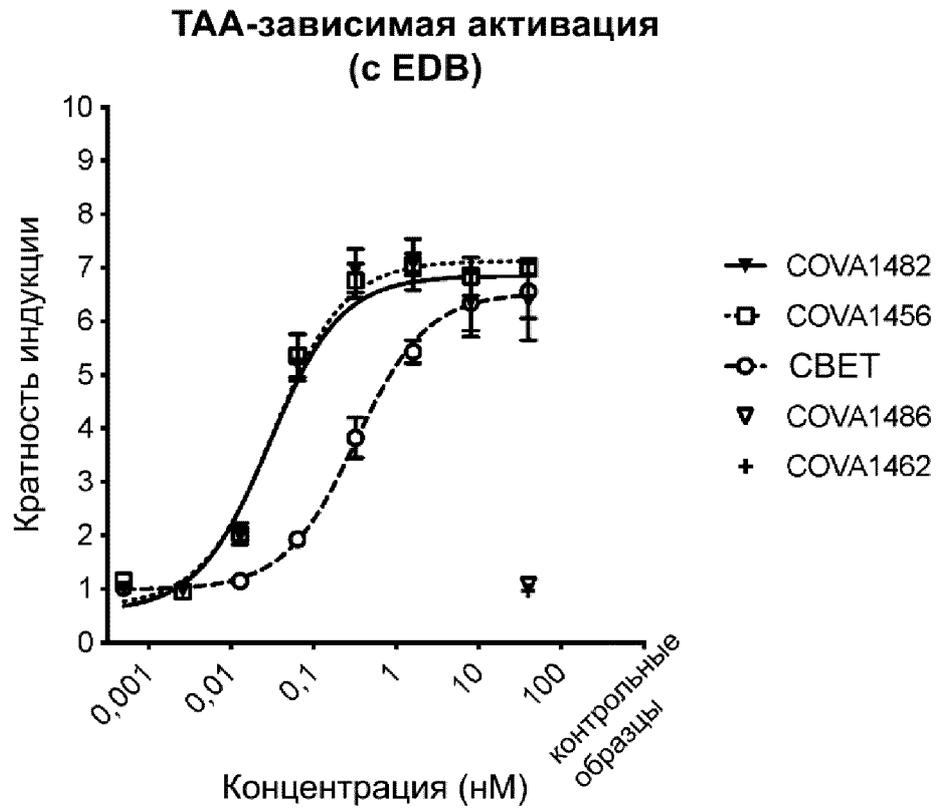
ФИГ. 15L

MSLNmAb1-spScFvLTBRmAb1
(VH-VL) 2:1; C-HC

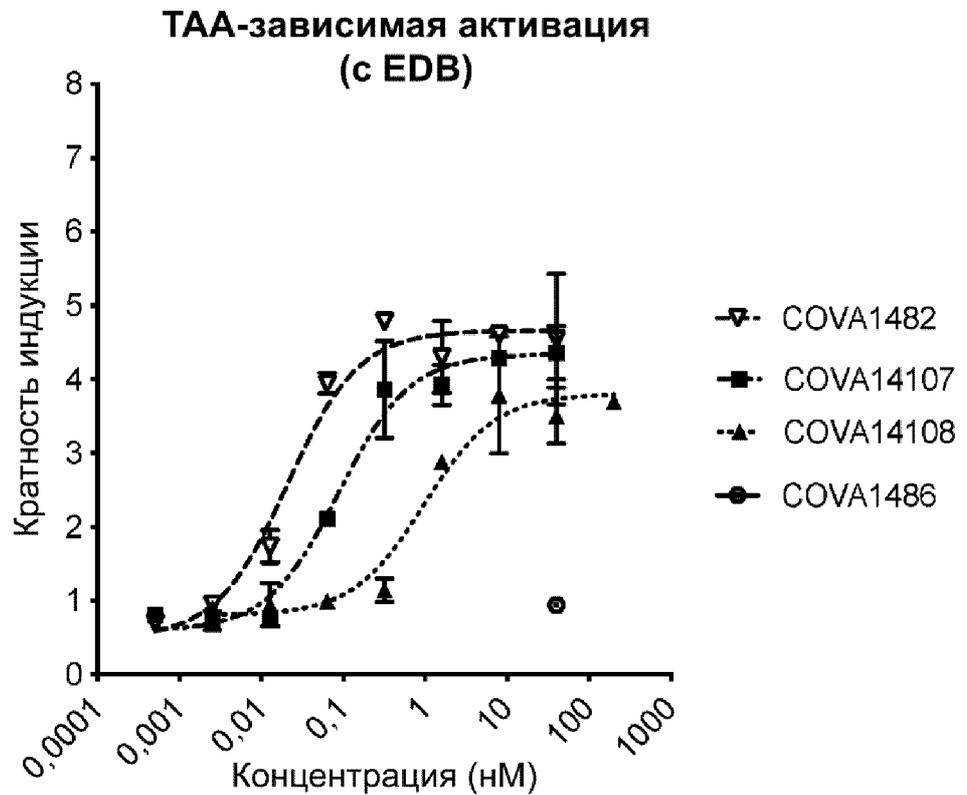


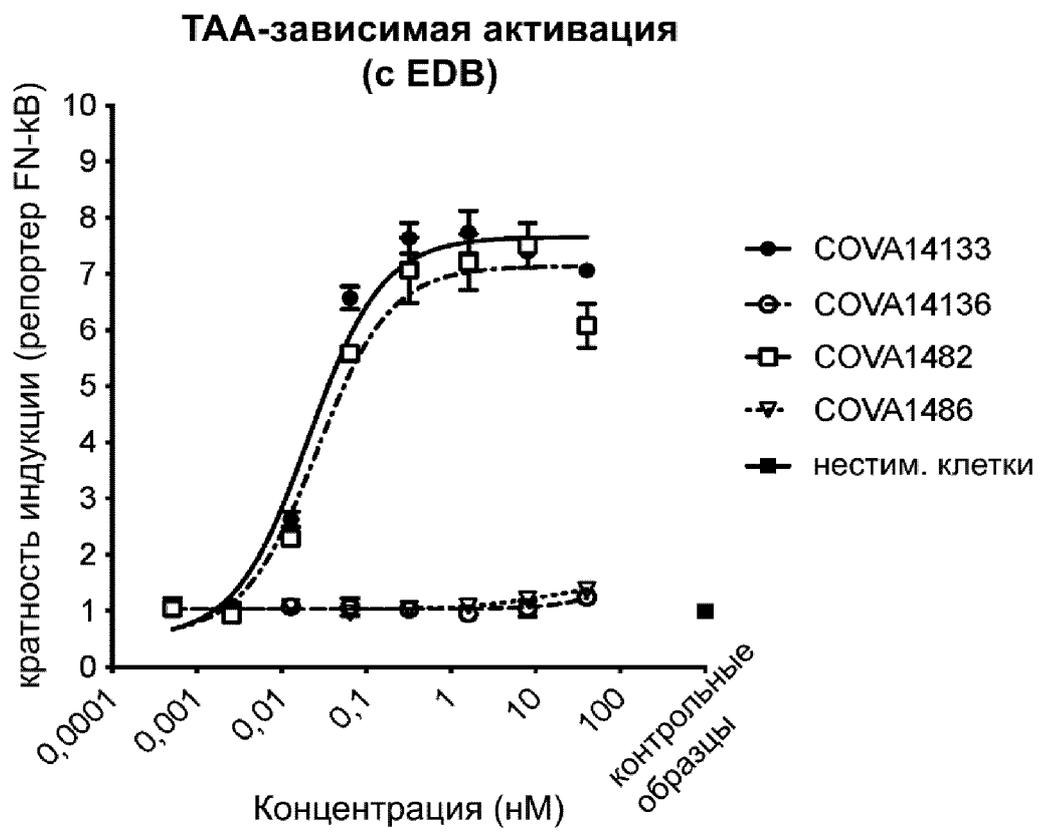
Фиг. 15М

ФИГ. 16А



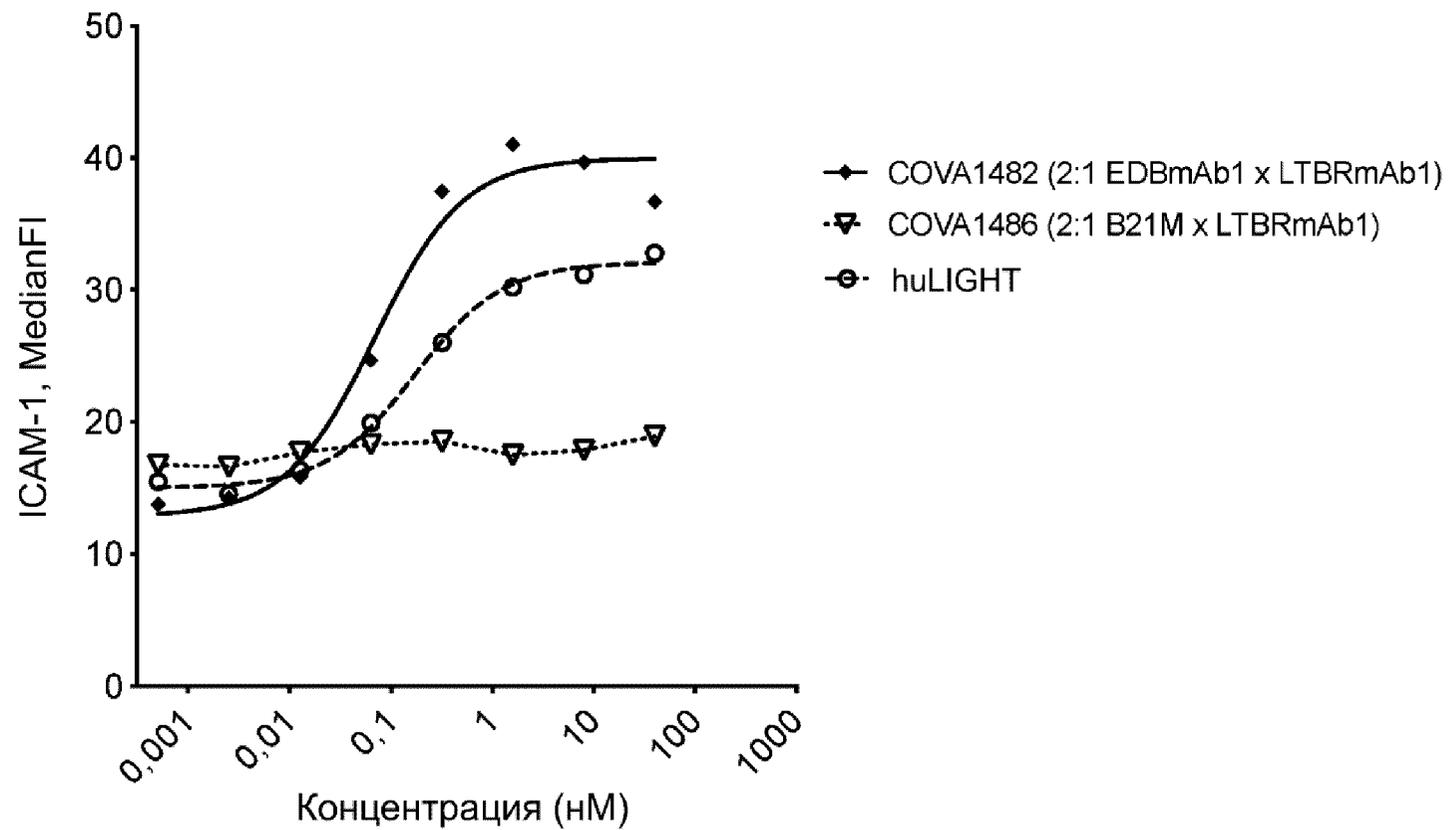
ФИГ. 16В





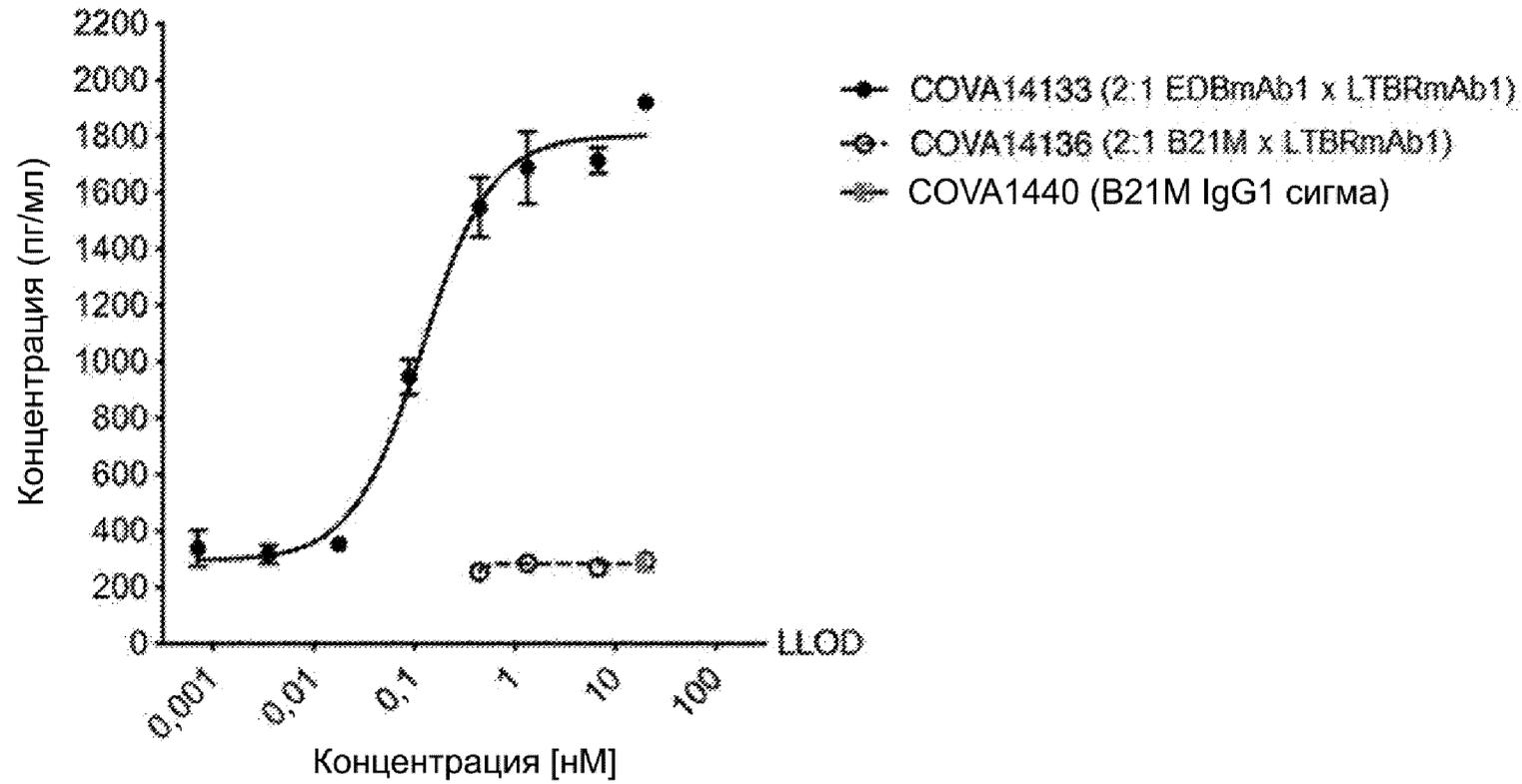
ФИГ. 16С

Окрашивание ICAM-1 на A375



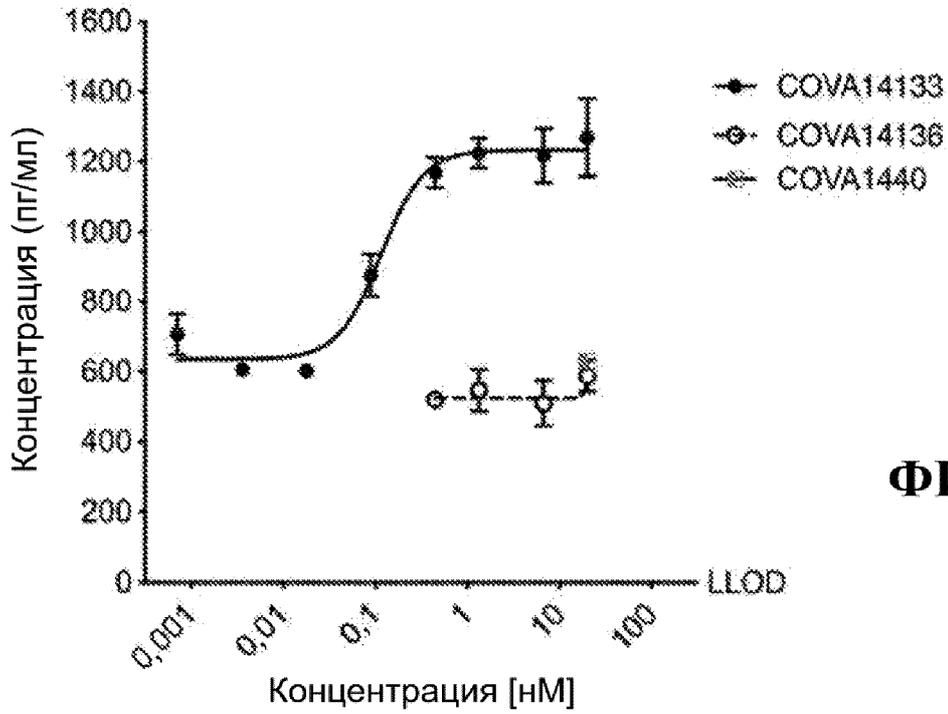
ФИГ. 17

hu RANTES



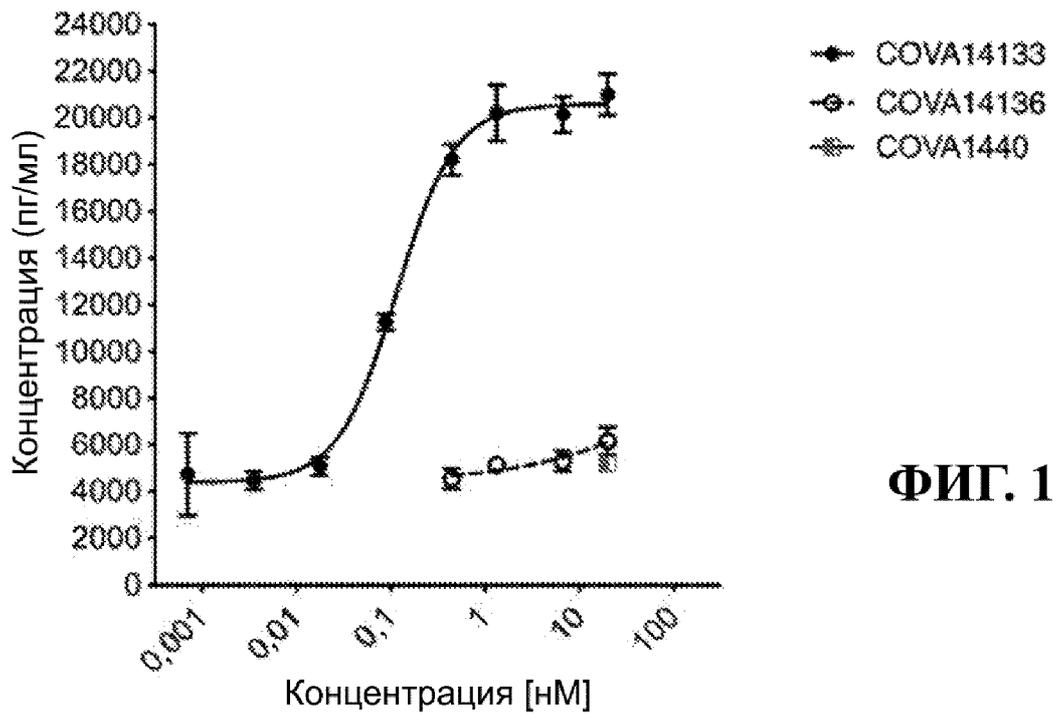
ФИГ. 18А

Чел. IL-6



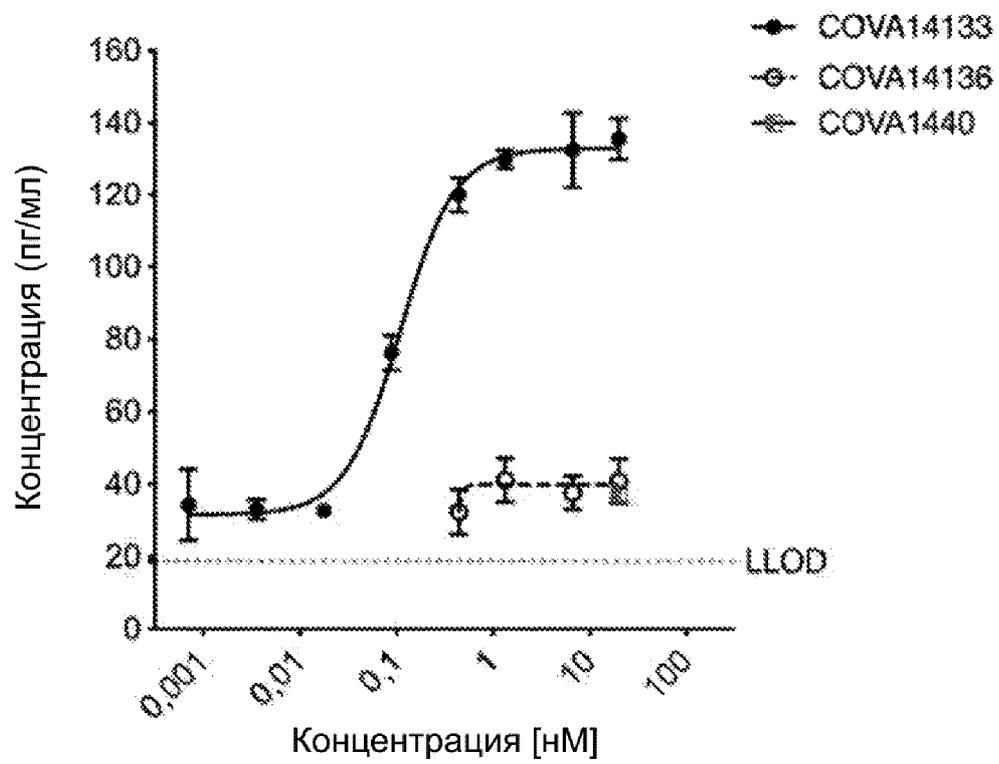
ФИГ. 18В

Чел. IL-8

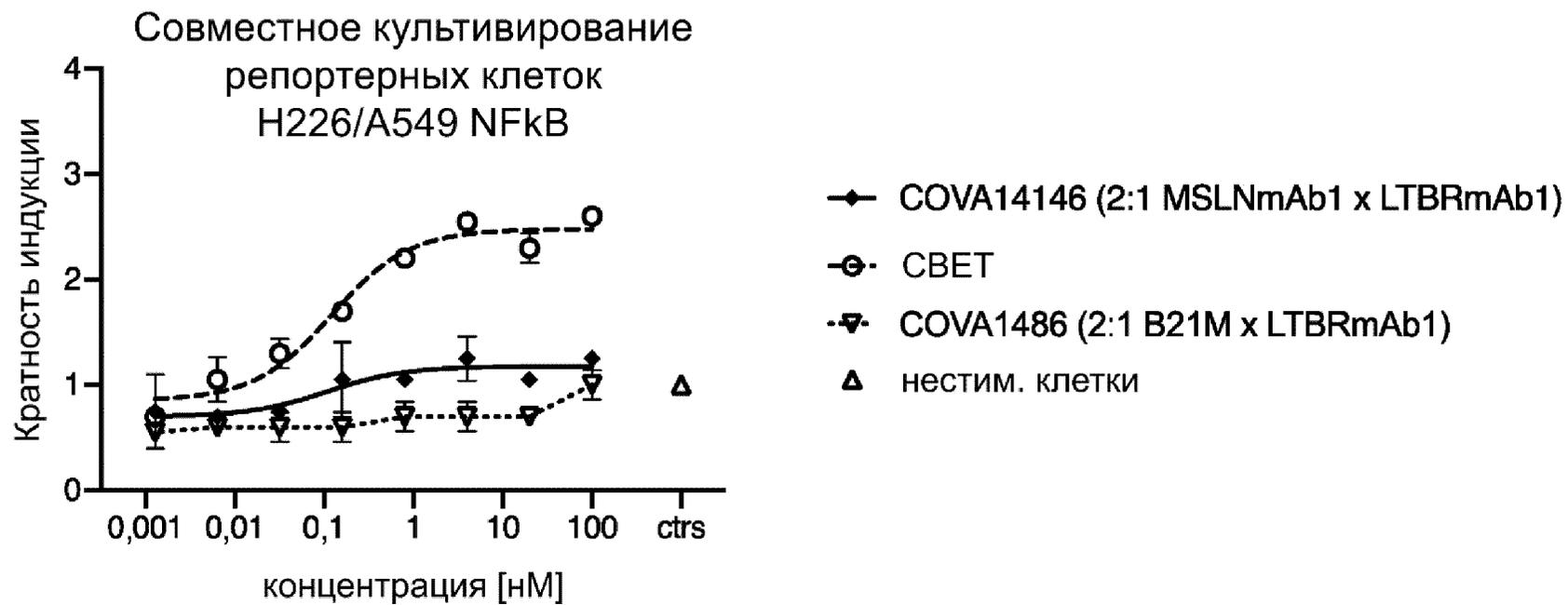


ФИГ. 18С

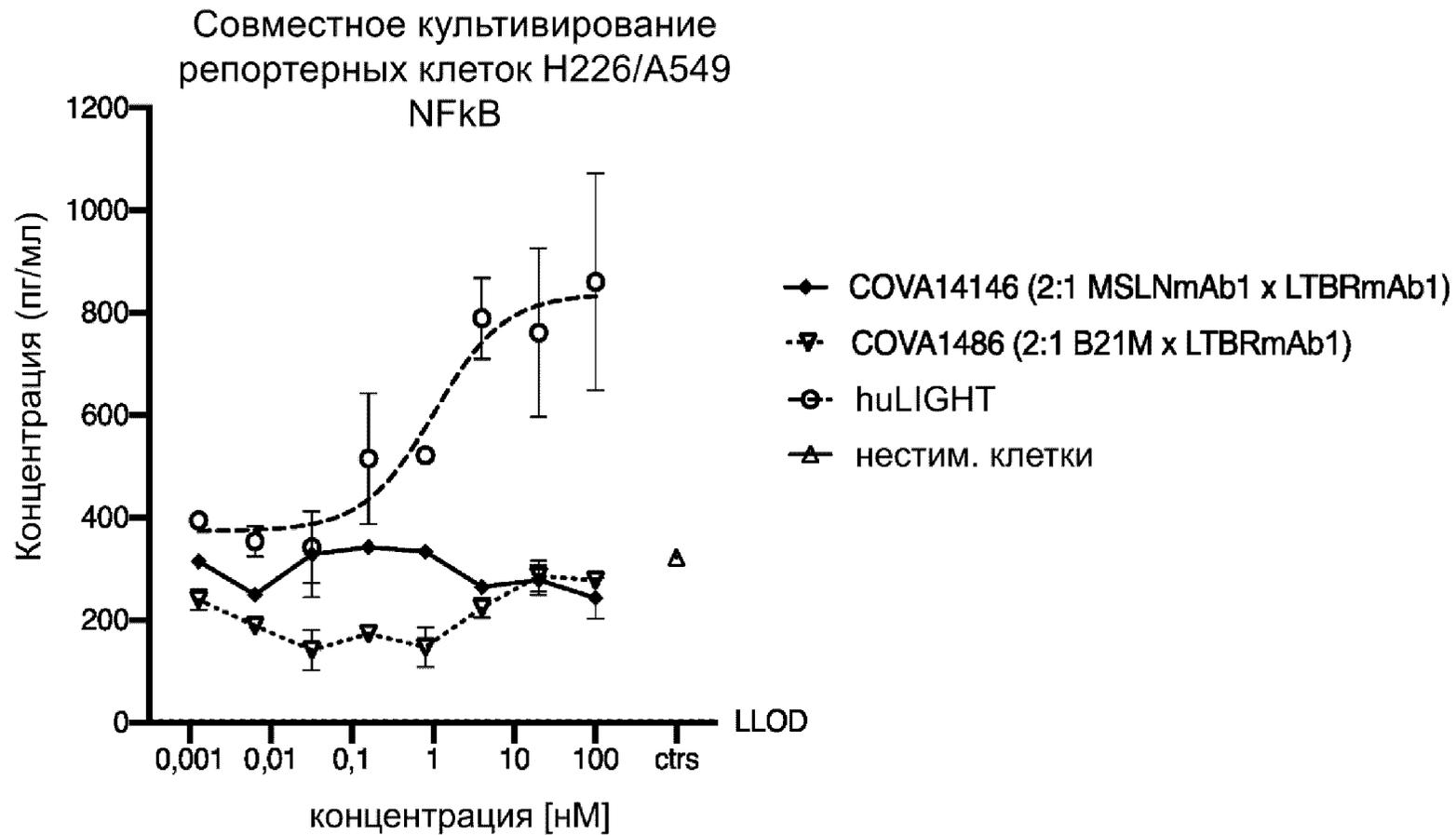
Чел. МIP-3b



ФИГ. 18D



ФИГ. 19А



ФИГ. 19В