

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390900** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.07.06

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.09.17

(54) **АНТИТЕЛО К HLA-DQ2.5 И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГЛЮТЕНОВОЙ ЭНТЕРОПАТИИ**

(31) **2020-157873**

(32) **2020.09.18**

(33) **JP**

(86) **PCT/JP2021/034240**

(87) **WO 2022/059766 2022.03.24**

(71) Заявитель:
**ЧУГАИ СЕЙЯКУ КАБУСИКИ
КАЙСЯ (JP)**

(72) Изобретатель:

**Икава Юри (SG), Окура Ю,
Мидзороки Акихико (JP)**

(74) Представитель:

**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)**

(57) В изобретении описаны антитела к HLA-DQ2.5 и их применение для лечения глютенной энтеропатии. В изобретении описаны модифицированные антитела к HLA-DQ2.5. Антитела к HLA-DQ2.5, предлагаемые в изобретении, обладают связывающей активностью в отношении комплексов, образованных HLA-DQ2.5 и глютенным пептидом, но практически не обладают связывающей активностью в отношении комплексов, образованных HLA-DQ2.5 и нерелевантным пептидом. Кроме того, установлено, что антитела, предлагаемые в изобретении, обладают ингибирующими действиями в отношении активации Т-клеток глютенными пептидами.

A1

202390900

202390900

A1

АНТИТЕЛО К HLA-DQ2.5 И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ
ГЛЮТЕНОВОЙ ЭНТЕРОПАТИИ

5

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к антителам к HLA-DQ2.5 и их применению для лечения глютенной энтеропатии.

Предпосылки создания изобретения

10 Глютенная энтеропатия (целиакия) представляет собой аутоиммунное нарушение, при котором прием глютена вызывает повреждение тонкого кишечника у генетически чувствительных (предрасположенных) пациентов (NPL 1-5). Считается, что примерно 1% западной популяции, т.е. 8 миллионов человек в Соединенных Штатах и в Европейском Союзе, страдают глютенной энтеропатией; однако с тех пор, как заболевание было обнаружено в 1940-е
15 годы, никаких заметных терапевтических достижений не было достигнуто.

Человеческие лейкоцитарные антигены (HLA) относятся к молекулам класса II главного комплекса гистосовместимости (MHC), которые включают молекулы HLA-DR, HLA-DP и HLA-DQ, такие как изоформа HLA-DQ2.5
20 (обозначена далее в настоящем описании как «HLA-DQ2.5»), которые образуют состоящие из альфа- и бета-цепей гетеродимеры на клеточной поверхности. Большинство (>90%) пациентов с глютенной энтеропатией имеют аллель гаплотипа HLA-DQ2.5 (NPL 6). Предполагается, что эта изоформа обладает более сильной аффинностью к пептидам глютена. Так же как в случае других
25 изоформ, HLA-DQ2.5 презентует процессированные антигены, имеющие происхождение из экзогенных источников, Т-клеточному рецептору (TCR) на Т-клетках. В результате переваривания богатой глютенной пищи, такой как хлеб, у пациентов с глютенной энтеропатией образуются иммуногенные глютенные пептиды, такие как глиадиновые пептиды (NPL 2). Эти пептиды
30 транспортируются через эпителий тонкого кишечника в собственную пластинку и дезамидируются тканевой трансглутаминазой, такой как трансглутаминаза 2 (TG2). Дезамидированные пептиды глиадина процессируются антигенпрезентирующими клетками (APC), которые «загружают» их на HLA-

DQ2.5. «Загруженные» пептиды презентуются Т-клеткам с рестрикцией по HLA-DQ2.5 и активируют врожденные и адаптивные иммунные ответы. Это вызывает воспалительное повреждение слизистой тонкого кишечника и симптомы, включающие различные типы желудочно-кишечных расстройств, дефицит питательных веществ и системные симптомы (NPL8, 9 и 10).
5 Установлено, что нейтрализующее антитело к HLA DQ ингибирует зависимую от глютенных пептидов активацию Т-клеток у пациентов с глютенной энтеропатией (NPL7).

В настоящее время принятым методом лечения глютенной энтеропатии является соблюдение в течение всей жизни безглютеновой диеты (GFD). Однако в реальности трудно полностью исключить воздействие глютена, даже, соблюдая GFD. Переносимая доза глютена для таких пациентов составляет лишь примерно 10-50 мг/день (NPL 11). Перекрестное загрязнение может часто иметь место при производстве продуктов для GFD, и следовые количества глютена могут
15 вызывать симптомы глютенной энтеропатии даже у пациентов, которые в достаточной степени соблюдают требования GFD. При наличии такого риска непреднамеренного воздействия глютена существует необходимость в дополнительной к GFD терапии.

Перечень процитированных документов

Непатентная литература

- [NPL 1] N Engl J Med, 357, 2007, сс.1731-1743.
[NPL 2] J Biomed Sci., 19(1), 2012, с. 88.
[NPL 3] N Engl J Med, 348, 2003, сс. 2517-2524.
[NPL 4] Gut, 52, 2003, сс. 960-965.
25 [NPL 5] Dig Dis Sci 49, 2004, сс. 1479-1484.
[NPL 6] Gastroenterology, 141, 2011, сс. 610-620.
[NPL 7] Gut, 54, 2005, сс. 1217-1223.
[NPL 8] Gastroenterology, 146, 2014, сс. 1649-1658.
[NPL 9] Nutrients, 5(10), октябрь 2013 г., сс 3975-3992.
30 [NPL 10] J Clin Invest., 117(1), 2007, сс. 41-49.
[NPL 11] Am J Clin Nutr, 85, 2007, сс. 160-166.

Краткое изложение сущности изобретения

Задача, положенная в основу изобретения

С учетом вышеуказанных обстоятельств, связанных с потребностью во вспомогательной терапии, в настоящем изобретении предложены анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающие молекулы.

Решение задачи

Антигенсвязывающие молекулы, предлагаемые в настоящем изобретении, были изменены, и они приобрели способность связываться с двумя или большим количеством комплексов, образованных HLA-DQ2.5 и глютенным пептидом.

10 Более конкретно, в настоящем описании предложены следующие варианты:

[1] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая содержит:

(I) первый антигенсвязывающий фрагмент, который обладает связывающей активностью в отношении HLA-DQ2.5 в форме комплекса с глютенным пептидом; и

(II) второй антигенсвязывающий фрагмент, который обладает связывающей активностью в отношении HLA-DQ2.5 в форме комплекса с глютенным пептидом;

15 где антигенсвязывающая молекула связывается с двумя или большим количеством комплексов HLA-DQ2.5 и глютенных пептидов,

где по меньшей мере один из глютенных пептидов в комплексах, с которыми связывается первый антигенсвязывающий фрагмент, отличается от по меньшей мере одного из глютенных пептидов в комплексах, с которыми связывается второй антигенсвязывающий фрагмент; и

25 где антигенсвязывающая молекула практически не обладает связывающей активностью в отношении либо HLA-DQ2.5-позитивной В-клетки РВМС, либо Ва/Ф3-клетки, которая экспрессирует HLA-DQ2.5, либо обоих типов клеток,

где антигенсвязывающая молекула является гуманизированной, и

30 где одна или несколько аминокислот в тяжелой цепи и/или легкой цепи первого антигенсвязывающего фрагмента и/или второго антигенсвязывающего фрагмента в мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы изменена(ы).

[1a] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [1], где антигенсвязывающая молекула практически не обладает связывающей активностью в отношении Ва/F3-клетки, которая экспрессирует HLA-DQ2.2.

5 [1-1] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [1] или п. [1a], где одна или несколько аминокислот в тяжелой цепи и/или легкой цепи первого антигенсвязывающего фрагмента и/или второго антигенсвязывающего фрагмента в мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы заменена(ы)

10 [1-2] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [1-1], которая содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену в вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере одну аминокислотную замену в константной области тяжелой цепи; по меньшей мере одну аминокислотную замену в вариабельной области легкой цепи; и по меньшей мере одну аминокислотную замену в константной области легкой цепи.

15 [2] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. [1]-[1-2], где глютенный пептид представляет собой иммунодоминантный пептид, связанный с глютенной энтеропатией.

20 [3] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. [1]-[2], где глютенный пептид выбирают из группы, которая состоит из: 33-мерного пептида глиаина, пептида альфа 1 глиаина, пептида альфа 2 глиаина, пептида гамма 1 глиаина, пептида гамма 2 глиаина, пептида омега 1 глиаина, пептида омега 2 глиаина, пептида ВС-гордеина, пептида альфа 3 глиаина, пептида альфа 1b глиаина, пептида гамма 4a глиаина, пептида гамма 4b глиаина, пептида авенина 1, пептида авенина 2, пептида авенина 3, пептида гордеина 1, пептида гордеина 2, пептида секалина 1, пептида секалина 2 и 26-
25 мерного пептида глиаина.

30 [3-1] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. [1]-[2], где глютенный(ые) пептид(ы) представляет(ют) собой один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или все пептиды из: 33-мерного пептида глиаина, пептида альфа 1 глиаина, пептида альфа 2 глиаина, пептида гамма 1 глиаина, пептида гамма 2 глиаина, пептида омега 1 глиаина, пептида омега 2 глиаина, пептида ВС-гордеина, пептида альфа 3 глиаина, пептида альфа 1b глиаина, пептида гамма 4a глиаина, пептида гамма 4b глиаина, пептида авенина 1,

пептида авенина 2, пептида авенина 3, пептида гордеина 1, пептида гордеина 2, пептида секалина 1, пептида секалина 2 и 26-мерного пептида глиаина.

[3-2] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. [1]-[2], где глютенный пептид выбирают из группы, которая состоит из: 33-
5 мерного пептида глиаина, пептида альфа 1 глиаина, пептида альфа 2 глиаина, пептида гамма 1 глиаина, пептида омега 1 глиаина, пептида омега 2 глиаина, пептида ВС-гордеина, пептида альфа 3 глиаина, пептида альфа 1b глиаина, пептида гамма 4a глиаина, пептида гамма 4b глиаина, пептида авенина 1, пептида авенина 2, пептида авенина 3, пептида гордеина 1, пептида гордеина 2,
10 пептида секалина 1, пептида секалина 2 и 26-мерного пептида глиаина.

[3-3] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. [1]-[2], где глютенный(ые) пептид(ы) представляет(ют) собой один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать,
15 13, 14, 15, 16, 17, 18 или все пептиды из: 33-мерного пептида глиаина, пептида альфа 1 глиаина, пептида альфа 2 глиаина, пептида гамма 1 глиаина, пептида омега 1 глиаина, пептида омега 2 глиаина, пептида ВС-гордеина, пептида альфа 3 глиаина, пептида альфа 1b глиаина, пептида гамма 4a глиаина, пептида гамма 4b глиаина, пептида авенина 1, пептида авенина 2, пептида авенина 3, пептида гордеина 1, пептида гордеина 2, пептида секалина 1, пептида
20 секалина 2 и 26-мерного пептида глиаина.

[4] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. [1]-[3-3], которая практически не обладает связывающей активностью в отношении HLA-DQ2.5 в форме комплекса с нерелевантным пептидом, где нерелевантный пептид представляет собой по меньшей мере один пептид,
25 выбранный из группы, которая состоит из: CLIP-пептида, пептида вируса гепатита В 1, пептида *Salmonella*, пептида *Mycobacterium bovis* и пептида тиропероксидазы.

[4-1] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. [1]-[3-3], которая практически не обладает связывающей активностью в отношении HLA-DQ2.5 в форме комплексов с нерелевантными пептидами, где нерелевантные пептиды представляют собой все следующие пептиды: CLIP-пептид, пептид вируса гепатита В 1, пептид *Salmonella*, пептид *Mycobacterium bovis* и пептид тиропероксидазы.
30

[5] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. [1]-[4-1], которая практически не обладает связывающей активностью в отношении HLA-DP, HLA-DR, HLA-DQ5.1, HLA-DQ6.3, HLA-DQ7.3, HLA-DQ7.5 и HLA-DQ8.

5 [6] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. [1]-[5], которая блокирует (I) взаимодействие между комплексом HLA-DQ2.5/глютенный пептид и CD4+ Т-клеткой с рестрикцией по комплексу HLA-DQ2.5/глютенный пептид; и/или (II) взаимодействие между комплексом HLA-DQ2.2/глютенный пептид и CD4+ Т-клеткой с рестрикцией по комплексу HLA-DQ2.2/глютенный пептид.

10 [6-2] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [6], где глютенный пептид выбирают из группы, состоящей из: пептида альфа 1 глиаина, пептида альфа 1b глиаина, пептида альфа 2 глиаина, пептида омега 1 глиаина, пептида омега 2 глиаина, пептида гамма 1 глиаина, пептида гамма 2 глиаина, пептида гамма 3 глиаина, пептида гамма 4a глиаина, пептида гамма 4d глиаина и пептида ВС-гордеина.

15 [7] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. [1]-[6-2], где антигенсвязывающая молекула обладает более высокой связывающей активностью в отношении комплекса, образованного HLA-DQ2.5 и глютенным пептидом, по сравнению с активностью до указанных гуманизации и изменения.

20 [8] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. [1]- [7], где антигенсвязывающая молекула обладает более высокой перекрестной реактивностью в отношении глютенных пептидов по сравнению с реактивностью до указанных гуманизации и изменения.

25 [8-1] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [8], где глютенные пептиды представляют собой пептид омега 2 глиаина, пептид ВС-гордеина, пептид гамма 1 глиаина, пептид гамма 2 глиаина, пептид гамма 4a глиаина и пептид гамма 4d глиаина.

30 [9] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. [1]-[8-1], в которой один, два, три или все наборы аминокислотных остатков, выбранных из группы, которая состоит из наборов аминокислотных остатков, указанных ниже в подпунктах (а)-(г), в тяжелой цепи и легкой цепи

антигенсвязывающей молекулы, представляют собой аминокислотные остатки, которые электростатически отталкиваются друг от друга:

5 (а) аминокислотный остаток в константной области тяжелой цепи (СН1), который находится в положении 175 согласно EU-нумерации, и аминокислотный остаток в константной области легкой цепи (СL), который находится в положении 131 согласно нумерации Кэбота,

(б) аминокислотный остаток в СН1, который находится в положении 175 согласно EU-нумерации, и аминокислотный остаток в СL, который находится в положении 160 согласно нумерации Кэбота,

10 (в) аминокислотный остаток в СН1, который находится в положении 175 согласно EU-нумерации, и аминокислотные остатки в СL, которые находятся в положениях 131 и 160 согласно нумерации Кэбота,

(г) аминокислотные остатки в СН1, которые находятся в положениях 147 и 175 согласно EU-нумерации, и аминокислотные остатки в СL, которые находятся в положениях 131 и 160 согласно нумерации Кэбота.

15 [10] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [9], в которой дополнительно два или большее количество аминокислотных остатков, которые образуют поверхность раздела между вариабельной областью тяжелой цепи и вариабельной областью легкой цепи, представляют собой
20 аминокислотные остатки, которые электростатически отталкиваются друг от друга.

[11] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [10], в которой аминокислотные остатки, которые электростатически отталкиваются друг от друга, представляют собой один или два набора аминокислотных
25 остатков, выбранных из группы, которая состоит из наборов аминокислотных остатков, указанных ниже в подпунктах (а) и (б):

(а) аминокислотный остаток в вариабельной области тяжелой цепи, который находится в положении 39 согласно нумерации Кэбота, и аминокислотный остаток в вариабельной области легкой цепи, который
30 находится в положении 38 согласно нумерации Кэбота,

(б) аминокислотный остаток в вариабельной области тяжелой цепи, который находится в положении 45 согласно нумерации Кэбота, и

аминокислотный остаток в вариабельной области легкой цепи, который находится в положении 44 согласно нумерации Кэбота.

[12] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. [9]-[11], в которой аминокислотные остатки, которые электростатически отталкиваются друг от друга, выбраны из аминокислотных остатков, входящих в любой из наборов (X) или (Y), указанных ниже:

(X) глутаминовая кислота (E), аспарагиновая кислота (D),

(Y) лизин (K), аргинин (R), гистидин (H).

[13] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. [9]-[12], которая дополнительно содержит Fc-домен, обладающий пониженной аффинностью связывания с человеческим Fc-гамма рецептором по сравнению с нативным Fc-доменом человеческого IgG1.

[14] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [13], в которой Fc-домен содержит Arg в положении 235 и Arg в положении 236, где нумерация аминокислотных положений соответствует EU-нумерации.

[15] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [13] или п. [14], в которой Fc-домен состоит из первой субъединицы Fc-области и второй субъединицы Fc-области, которые обладают способностью к стабильной ассоциации.

[16] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [15], в которой Fc-домен содержит вариант (д1) или (д2), указанный ниже:

(д1) первую субъединицу Fc-области, содержащую Cys в положении 349, Ser в положении 366, Ala в положении 368 и Val в положении 407, и вторую субъединицу Fc-области, содержащую Cys в положении 354 и Trp в положении 366;

(д2) первую субъединицу Fc-области, содержащую Glu в положении 439, и вторую субъединицу Fc-области, содержащую Lys в положении 356, где нумерация аминокислотных положений соответствует EU-нумерации.

[17] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. [13]-[16], в которой Fc-домен обладает дополнительно более сильной FcRn-связывающей аффинностью с человеческим FcRn, по сравнению с нативным Fc-доменом человеческого IgG1.

[18] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [16], в которой первая и/или вторая субъединица Fc-области содержит Leu в положении 428, Ala в положении 434, Arg в положении 438 и Glu в положении 440,

5 где нумерация аминокислотных положений соответствует EU-нумерации.

[19] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. [1]-[8], где мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит один или несколько аминокислотных остатков, указанных ниже в подпунктах (I)-(XII):

10 (I) глутаминовая кислота или лизин в положении 175 (EU-нумерация) в константной области тяжелой цепи;

(II) глутаминовая кислота в положении 147 (EU-нумерация) в константной области тяжелой цепи;

15 (III) глутаминовая кислота или лизин в положении 131 (нумерация Кэбота) в константной области легкой цепи;

(IV) глутаминовая кислота или лизин в положении 160 (нумерация Кэбота) в константной области легкой цепи;

(V) аргинин в положении 235 (EU-нумерация) в константной области тяжелой цепи;

20 (VI) аргинин в положении 236 (EU-нумерация) в константной области тяжелой цепи;

(VII) лизин в положении 356 (EU-нумерация) в константной области тяжелой цепи;

25 (VIII) лейцин в положении 428 (EU-нумерация) в константной области тяжелой цепи;

(IX) аланин в положении 434 (EU-нумерация) в константной области тяжелой цепи;

(X) аргинин в положении 438 (EU-нумерация) в константной области тяжелой цепи;

30 (XI) глутаминовая кислота в положении 439 (EU-нумерация) в константной области тяжелой цепи;

(XII) глутаминовая кислота в положении 440 (EU-нумерация) в константной области тяжелой цепи.

[19-1] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [19], которая представляет собой биспецифическое антитело, содержащее:

5 первую тяжелую цепь, которая содержит лизин в положении 175 (EU-нумерация), аргинин в положении 235 (EU-нумерация), аргинин в положении 236 (EU-нумерация), лейцин в положении 428 (EU-нумерация), аланин в положении 434 (EU-нумерация), аргинин в положении 438 (EU-нумерация), глутаминовую кислоту в положении 439 (EU-нумерация) и глутаминовую кислоту в положении 440 (EU-нумерация);

10 первую легкую цепь, которая содержит глутаминовую кислоту в положении 131 (нумерация Кэбота) и глутаминовую кислоту в положении 160 (нумерация Кэбота);

15 вторую тяжелую цепь, которая содержит глутаминовую кислоту в положении 147 (EU-нумерация), глутаминовую кислоту в положении 175 (EU-нумерация), аргинин в положении 235 (EU-нумерация), аргинин в положении 236 (EU-нумерация), лизин в положении 356 (EU-нумерация), лейцин в положении 428 (EU-нумерация), аланин в положении 434 (EU-нумерация), аргинин в положении 438 (EU-нумерация) и глутаминовую кислоту в положении 440 (EU-нумерация); и

20 вторую легкую цепь, которая содержит лизин в положении 131 (нумерация Кэбота) и лизин в положении 160 (нумерация Кэбота).

[19-2] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [19-1], в которой:

25 первая тяжелая цепь дополнительно содержит глутаминовую кислоту в положении 419 (EU-нумерация) и пролин в положении 445 (EU-нумерация) и аминокислотную делецию в положениях 446 и 447 (EU-нумерация); и

вторую тяжелую цепь дополнительно содержит лизин в положении 196 (EU-нумерация), пролин в положении 445 (EU-нумерация) и аминокислотную делецию в положениях 446 и 447 (EU-нумерация).

30 [19-3] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [19-1] или п. [19-2], в которой:

первая тяжелая цепь дополнительно содержит глицин в положении 16 (нумерация Кэбота), аланин в положении 32 (нумерация Кэбота), лизин в положении 61 (нумерация Кэбота), валин в положении 35а (нумерация Кэбота),

аланин в положении 50 (нумерация Кэбота), глутаминовую кислоту в положении 64 (нумерация Кэбота), треонин в положении 73 (нумерация Кэбота), глутаминовую кислоту в положении 95 (нумерация Кэбота) и валин в положении 102 (нумерация Кэбота);

5 первая легкая цепь дополнительно содержит глутаминовую кислоту в положении 28 (нумерация Кэбота), тирозин в положении 55 (нумерация Кэбота), глутаминовую кислоту или тирозин в положении 56 (нумерация Кэбота), глутаминовую кислоту в положении 92 (нумерация Кэбота), валин в положении 94 (нумерация Кэбота) и аланин в положении 95а (нумерация Кэбота);

10 вторая тяжелая цепь дополнительно содержит глутаминовую кислоту в положении 28 (нумерация Кэбота), аланин или глутаминовую кислоту в положении 30 (нумерация Кэбота), глутаминовую кислоту в положении 31 (нумерация Кэбота), триптофан в положении 32 (нумерация Кэбота), фенилаланин в положении 34 (нумерация Кэбота), метионин в положении 35
15 (нумерация Кэбота), серин в положении 35а (нумерация Кэбота), серин в положении 50 (нумерация Кэбота), глутаминовую кислоту или глицин в положении 61 (нумерация Кэбота), глутаминовую кислоту в положении 64 (нумерация Кэбота) и глутаминовую кислоту в положении 65 (нумерация Кэбота); и

20 вторая легкая цепь дополнительно содержит треонин в положении 25 (нумерация Кэбота), лизин в положении 54 (нумерация Кэбота), глутаминовую кислоту в положении 56 (нумерация Кэбота), лейцин в положении 67 (нумерация Кэбота), глутамин в положении 79 (нумерация Кэбота) и лизин в положении 94 (нумерация Кэбота).

25 [19а] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. [1]-[19-3], где мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула практически не обладает связывающей активностью в отношении самого глютенowego пептида.

[20] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая
30 первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент;

в которой первый антигенсвязывающий фрагмент содержит любой из вариантов, указанных ниже в подпунктах (а1)-(а3):

(a1) первую переменную область антитела, которая содержит определяющую комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 129, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 130, CDR 3, имеющий of SEQ ID NO: 131, и вторую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 132, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 133, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 134;

(a2) первую переменную область антитела, которая содержит определяющую комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 164, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 165, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 166, и вторую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 167, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 168, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 169; и

(a3) первую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности первой переменной области антитела, указанной в подпункте (a1) или (a2), и вторую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности второй переменной области антитела, указанной в подпункте (a1) или (a2).

[21] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [20], в которой второй антигенсвязывающий фрагмент содержит любой из вариантов, указанных ниже в подпунктах (b1)-(b8):

(b1) третью переменную область антитела, которая содержит определяющую комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 135, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 136, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 137, и четвертую переменную область антитела, которая содержит переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 138, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 139, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 140;

(b2) третью переменную область антитела, которая содержит определяющую комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 135, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 136, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 137, и четвертую переменную область антитела, которая содержит переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 141, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 142, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 143;

(б3) третью переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарный участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 144, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 145, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 146, и четвертую переменную область антитела, которая содержит переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 141, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 142, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 143;

(б4) третью переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарный участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 147, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 148, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 149, и четвертую переменную область антитела, которая содержит переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 150, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 151, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 152;

(б5) третью переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарный участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 153, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 154, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 155, и четвертую переменную область антитела, которая содержит переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 150, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 151, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 152;

(б6) третью переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарный участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 156, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 157, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 158, и четвертую переменную область антитела, которая содержит переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 150, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 151, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 152;

(б7) третью переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарный участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 159, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 160, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 161, и четвертую переменную область антитела, которая содержит переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 141, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 142, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 143; и

(б8) третью аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности третьей переменной области антитела, указанной в одном из подпунктов (б1)-(б7), и

четвертую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности четвертой вариабельной области антитела, указанной в одном из подпунктов (б1)-(б7).

5 [21-2] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент,

в которой второй антигенсвязывающий фрагмент содержит любой из вариантов, указанных ниже в подпунктах (б1)-(б8):

10 (б1) первую вариабельную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 135, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 136, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 137, и вторую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 138, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 139, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 140;

15 (б2) первую вариабельную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 135, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 136, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 137, и вторую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 141, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 142, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 143;

20 (б3) первую вариабельную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 144, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 145, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 146, и вторую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 141, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 142, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 143;

25 (б4) первую вариабельную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 147, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 148, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 149, и вторую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 150, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 151, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 152;

30 (б5) первую вариабельную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 153, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 154, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 155, и вторую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 150, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 151, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 152;

(б6) первую переменную область антитела, которая содержит определяющую комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 156, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 157, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 158, и вторую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 150, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 151, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 152;

(б7) первую переменную область антитела, которая содержит определяющую комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 159, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 160, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 161, и вторую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 141, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 142, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 143; и

(б8) первую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности первой переменной области антитела, указанной в одном из подпунктов (б1)-(б7), и вторую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности второй переменной области антитела, указанной в одном из подпунктов (б1)-(б7).

[22] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент,

в которой первый антигенсвязывающий фрагмент содержит любой из вариантов, указанных ниже в подпунктах (в1)-(в3):

(в1) первую переменную область антитела, которая содержит определяющую комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 129, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 130, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 131, и вторую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 132, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 133, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 134;

(в2) первую переменную область антитела, которая содержит определяющую комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 164, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 165, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 166, и вторую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 167, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 168, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 169;

и

(в3) первую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности первой
вариабельной области антитела, указанной подпункте (в1) или (в2), и вторую
аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%,
5 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности второй вариабельной области
антитела, указанной подпункте (в1) или (в2),

в которой второй антигенсвязывающий фрагмент содержит любой из
вариантов, указанных ниже в подпунктах (г1)-(г8):

(г1) третью вариабельную область антитела, которая содержит
10 определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 135,
CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 136, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 137, и
четвертую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий
SEQ ID NO: 138, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 139, CDR 3, имеющий SEQ ID
NO: 140;

15 (г2) третью вариабельную область антитела, которая содержит
определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 135,
CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 136, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 137, и
четвертую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий
SEQ ID NO: 141, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 142, CDR 3, имеющий SEQ ID
20 SEQ ID NO: 143;

(г3) третью вариабельную область антитела, которая содержит
определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 144,
CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 145, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 146, и
четвертую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий
25 SEQ ID NO: 141, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 142, CDR 3, имеющий SEQ ID
NO: 143;

(г4) третью вариабельную область антитела, которая содержит
определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 147,
CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 148, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 149, и
30 четвертую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий
SEQ ID NO: 150, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 151, CDR 3, имеющий SEQ ID
NO: 152;

(г5) третью переменную область антитела, которая содержит определяющую комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 153, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 154, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 155, и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 150, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 151, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 152;

(г6) третью переменную область антитела, которая содержит определяющую комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 156, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 157, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 158, и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 150, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 151, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 152;

(г7) третью переменную область антитела, которая содержит определяющую комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 159, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 160, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 161, и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 141, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 142, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 143; и

(г8) третью аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности третьей переменной области антитела, указанной в одном из подпунктов (г1)-(г7), и четвертую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности четвертой переменной области антитела, указанной в одном из подпунктов (г1)-(г7).

[22-2] Мультиспецифическая антигенсвязывающая, которая содержит первый антигенсвязывающий фрагмент, содержащий первую и вторую переменные области антитела, и второй антигенсвязывающий фрагмент, который содержит третью и четвертую переменные области антитела, где мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит любой из вариантов, указанных ниже в подпунктах (1)-(15):

(1) первую переменную область антитела, которая содержит определяющую комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 129, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 130, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 131; вторую

вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 132, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 133, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 134; третью вариабельную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 135, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 136, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 137; и четвертую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 138, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 139, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 140;

(2) первую вариабельную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 129, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 130, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 131; вторую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 132, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 133, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 134; третью вариабельную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 135, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 136, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 137; и четвертую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 141, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 142, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 143;

(3) первую вариабельную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 129, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 130, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 131; вторую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 132, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 133, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 134; третью вариабельную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 144, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 145, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 146; и четвертую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 141, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 142, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 143;

(4) первую вариабельную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 129, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 130, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 131; вторую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 132, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 133, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 134; третью вариабельную область антитела, которая содержит определяющий

комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 147, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 148, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 149; и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 150, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 151, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 152;

5 (5) первую переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 129, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 130, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 131; вторую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 132, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 133, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 134;

10 третью переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 153, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 154, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 155; и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 150, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 151, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 152;

15 (6) первую переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 129, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 130, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 131; вторую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 132, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 133, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 134;

20 третью переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 156, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 157, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 158; и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 150, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 151, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 152;

25 (7) первую переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 129, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 130, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 131; вторую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 132, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 133, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 134;

30 третью переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 159, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 160, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 161; и четвертую

вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 141, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 142, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 143;

и

5 (8) первую вариабельную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 164, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 165, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 166; вторую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 167, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 168, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 169; третью вариабельную область антитела, которая содержит определяющий
10 комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 135, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 136, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 137; и четвертую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 138, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 139, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 140;

(9) первую вариабельную область антитела, которая содержит
15 определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 164, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 165, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 166; вторую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 167, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 168, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 169; третью вариабельную область антитела, которая содержит определяющий
20 комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 135, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 136, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 137; и четвертую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 141, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 142, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 143;

(10) первую вариабельную область антитела, которая содержит
25 определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 164, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 165, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 166; вторую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 167, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 168, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 169; третью вариабельную область антитела, которая содержит определяющий
30 комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 144, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 145, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 146; и четвертую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 141, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 142, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 143;

(11) первую переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарный участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 164, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 165, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 166; вторую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 167, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 168, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 169; третью переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарный участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 147, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 148, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 149; и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 150, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 151, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 152;

(12) первую переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарный участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 164, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 165, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 166; вторую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 167, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 168, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 169; третью переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарный участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 153, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 154, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 155; и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 150, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 151, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 152;

(13) первую переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарный участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 164, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 165, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 166; вторую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 167, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 168, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 169; третью переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарный участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 156, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 157, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 158; и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 150, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 151, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 152;

(14) первую переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарный участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 164, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 165, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 166; вторую

вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 167, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 168, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 169; третью вариабельную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 159, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 160, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 161; и четвертую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 141, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 142, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 143;

и

(15) первую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности первой вариабельной области антитела, указанной в одном из подпунктов (1)-(14); вторую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности второй вариабельной области антитела, указанной в одном из подпунктов (1)-(14); третью аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности третьей вариабельной области антитела, указанной в одном из подпунктов (1)-(14); и четвертую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности четвертой вариабельной области антитела, указанной в одном из подпунктов (1)-(14).

[23] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. [20]-[22-2], в которой вариабельная область антитела, входящая в первый и/или второй антигенсвязывающий фрагмент, содержит каркасные участки человеческого антитела или каркасные участки гуманизированного антитела.

[24] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент;

в которой первый антигенсвязывающий фрагмент содержит любой из вариантов, указанных ниже в подпунктах (д1)-(д3):

(д1) первую вариабельную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88, и вторую вариабельную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90;

(д2) первую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89, и вторую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91; и

5 (д3) первую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности первой переменной области антитела, указанной подпункте (д1) или (д2), и вторую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности второй переменной области антитела, указанной в подпункте (д1) или (д2).

10 [25] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [24], в которой второй антигенсвязывающий фрагмент содержит любой из вариантов, указанных ниже в подпунктах (е1)-(е8):

(е1) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98;

20 (е2) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99;

25 (е3) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99;

(е4) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100;

30 (е5) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100;

(е6) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100;

5 (е7) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99; и

10 (е8) третью аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности третьей переменной области антитела, указанной в одном из подпунктов (е1)-(е7); и четвертую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности четвертой переменной области антитела, указанной в одном из подпунктов (е1)-(е7).

15 [26] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент;

в которой первый антигенсвязывающий фрагмент содержит любой из вариантов, указанных ниже в подпунктах (д1)-(д3):

20 (д1) первую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88, и вторую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90;

25 (д2) первую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89, и вторую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91; и

30 (д3) первую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности первой переменной области антитела, указанной подпункте (д1) или (д2), и вторую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности второй переменной области антитела, указанной в подпункте (д1) или (д2), и

в которой второй антигенсвязывающий фрагмент содержит любой из вариантов, указанных ниже в подпунктах (e1)-(e8):

(e1) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98;

(e2) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99;

(e3) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99;

(e4) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100;

(e5) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100;

(e6) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100;

(e7) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99; и

(e8) третью аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности третьей переменной области антитела, указанной в одном из подпунктов (e1)-(e7); и

четвертую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности четвертой вариабельной области антитела, указанной в одном из подпунктов (e1)-(e7).

5 [26-2] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая содержит первый антигенсвязывающий фрагмент, содержащий первую и вторую вариабельные области антитела, и второй антигенсвязывающий фрагмент, содержащий третью и четвертую вариабельные области антитела, где мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит любой из вариантов, указанных ниже в подпунктах (1)-(15):

10 (1) первую вариабельную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88; вторую вариабельную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90; третью вариабельную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92; и четвертую вариабельную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98;

15 (2) первую вариабельную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88; вторую вариабельную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90; третью вариабельную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92; и четвертую вариабельную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99;

20 (3) первую вариабельную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88; вторую вариабельную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90; третью вариабельную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93; и четвертую вариабельную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99;

25 (4) первую вариабельную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88; вторую вариабельную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90; третью вариабельную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93; и четвертую вариабельную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99;

ID NO: 90; третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94; и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100;

5 (5) первую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88; вторую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90; третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95; и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100;

10 (6) первую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88; вторую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90; третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96; и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100;

15 (7) первую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88; вторую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90; третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97; и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99;

20 (8) первую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89; вторую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91; третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92; и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98;

область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100;

(14) первую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89; вторую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91; третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97; и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99;

(15) первую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности первой переменной области антитела, указанной в одном из подпунктов (1)-(14); вторую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности второй переменной области антитела, указанной в одном из подпунктов (1) - (14); третью аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности третьей переменной области антитела, указанной в одном из подпунктов (1)-(14); и четвертую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности четвертой переменной области антитела, указанной в одном из подпунктов (1)-(14).

[27] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая содержит комбинацию двух полипептидных цепей, выбранных из группы, которая состоит из вариантов, указанных ниже в подпунктах (A1)-(A3):

(A1) первая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, и первая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43;

(A2) первая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и первая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46; и

(A3) первая аминокислотная последовательность, идентичная по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности первой тяжелой цепи, указанной в подпункте (A1) или (A2), и вторая аминокислотная

последовательность, идентичная по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности первой легкой цепи, указанной в подпункте (A1) или (A2).

5 [27-2] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая содержит комбинацию двух полипептидных цепей, выбранных из группы, которая состоит из вариантов, указанных ниже в подпунктах (A1)-(A3):

(A1) первая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, и первая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43;

10 (A2) первая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, и первая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46; и

15 (A3) первая аминокислотная последовательность, идентичная по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности первой тяжелой цепи, указанной в подпункте (A1) или (A2), и вторая аминокислотная последовательность, идентичная по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности первой легкой цепи, указанной в подпункте (A1) или (A2).

20 [28] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [27] или п. [27-2], которая дополнительно содержит комбинацию двух полипептидных цепей, выбранных из группы, которая состоит из вариантов, указанных ниже в подпунктах (B1)-(B8):

25 (B1) вторая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и вторая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55;

(B2) вторая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и вторая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56;

30 (B3) вторая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58, и вторая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56;

(Б4) вторая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и вторая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61;

5 (Б5) вторая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63, и вторая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61;

(Б6) вторая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, и вторая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61;

10 (Б7) вторая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, и вторая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56; и

15 (Б8) третья аминокислотная последовательность, идентичная по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности второй тяжелой цепи, указанной в одном из подпунктов (Б1)-(Б7), и четвертая аминокислотная последовательность, идентичная по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности второй легкой цепи, указанной в одном из подпунктов (Б1)-(Б7).

20 [28-2] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [27] или п. [27-2], которая дополнительно содержит комбинацию двух полипептидных цепей, выбранных из группы, которая состоит из вариантов, указанных ниже в подпунктах (Б1)-(Б8):

25 (Б1) вторая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и вторая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55;

(Б2) вторая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и вторая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56;

30 (Б3) вторая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57, и вторая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56;

(Б4) вторая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, и вторая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61;

5 (Б5) вторая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62, и вторая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61;

(Б6) вторая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, и вторая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61;

10 (Б7) вторая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, и вторая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56; и

(Б8) третья аминокислотная последовательность, идентичная по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности второй тяжелой цепи, указанной в одном из подпунктов (Б1)-(Б7), и четвертая аминокислотная последовательность, идентичная по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности второй легкой цепи, указанной в одном из подпунктов (Б1)-(Б7).

20 [29] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая содержит комбинацию четырех полипептидных цепей, выбранных из группы, которая состоит из вариантов, указанных ниже в подпунктах (1)-(15):

(1) первая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, и первая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, и вторая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и вторая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55;

25 (2) первая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, и первая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, и вторая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и вторая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56;

30 (3) первая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, и первая легкая цепь, содержащая аминокислотную

(10) первая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и первая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и вторая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, и вторая легкая цепь,
5 содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56;

(11) первая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, и первая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, и вторая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, и вторая легкая цепь,
10 содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61;

(12) первая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, и первая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, и вторая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, и вторая легкая цепь,
15 содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56;

(13) первая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и первая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и вторая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63, и вторая легкая цепь,
20 содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61;

(14) первая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и первая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и вторая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и вторая легкая цепь,
25 содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61; и

(15) первая аминокислотная последовательность, идентичная по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности первой тяжелой цепи, указанной в одном из подпунктов (1)-(14); вторая аминокислотная последовательность, идентичная по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности первой легкой цепи, указанной в одном из подпунктов (1)-(14); третья аминокислотная последовательность, идентичная по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности второй тяжелой цепи, указанной в одном из подпунктов (1)-(14); и четвертая
30

аминокислотная последовательность, идентичная по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности второй легкой цепи, указанной в одном из подпунктов (1)-(14).

5 [29-2] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая содержит комбинацию четырех полипептидных цепей, выбранных из группы, которая состоит из вариантов, указанных ниже в подпунктах (1)-(15):

10 (1) первая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, и первая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, и вторая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и вторая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55;

15 (2) первая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, и первая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, и вторая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и вторая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56;

20 (3) первая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, и первая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, и вторая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57, и вторая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56;

25 (4) первая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, и первая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, и вторая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, и вторая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61;

30 (5) первая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, и первая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, и вторая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62, и вторая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61;

(6) первая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, и первая легкая цепь, содержащая аминокислотную

(13) первая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, и первая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и вторая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62, и вторая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61;

(14) первая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, и первая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и вторая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, и вторая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61;

и

(15) первая аминокислотная последовательность, идентичная по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности первой тяжелой цепи, указанной в одном из подпунктов (1)-(14); вторая аминокислотная последовательность, идентичная по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности первой легкой цепи, указанной в одном из подпунктов (1)-(14); третья аминокислотная последовательность, идентичная по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности второй тяжелой цепи, указанной в одном из подпунктов (1)-(14); и четвертая аминокислотная последовательность, идентичная по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности второй легкой цепи, указанной в одном из подпунктов (1)-(14).

[29a] Комбинация по одному из п.п. (I)-(III), указанных ниже:

(I) мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая содержит последовательности, указанные в одном из подпунктов (a1)-(a3) в п. [20], и мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая содержит последовательности, указанные в одном из подпунктов (b1)-(b8) в п. [21];

(II) мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая содержит последовательности, указанные в одном из подпунктов (d1)-(d3) в п. [24], и мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая содержит последовательности, указанные в одном из подпунктов (e1)-(e8) в п. [25]; и

(III) мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая содержит последовательности, указанные в одном из подпунктов (A1)-(A3) в п.

[27] или п. [27-2], и мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая содержит последовательности, указанные в одном из подпунктов (Б1)-(Б8) в п. [28] или п. [28-2].

5 [30] Нуклеиновая кислота, кодирующая мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу по одному из п.п. [1]-[29].

[31] Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. [30].

[32] Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по п. [30] или вектор по п. [31].

10 [33] Способ получения мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы, включающий культивирование клетки по п. [32] с получением мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы.

[34] Способ по п. [33], дополнительно включающий выделение мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы из клеточной культуры.

15 [35] Фармацевтическая композиция, содержащая мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу по одному из п.п. [1]-[29] или комбинацию по п. [29a] и фармацевтически приемлемый носитель.

[36] Композиция по п. [35], представляющая собой фармацевтическую композицию, предназначенную для применения для лечения и/или предупреждения глютеновой энтеропатии.

20 [37] Применение мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы по одному из п.п. [1]-[29] или комбинации по п. [29a] для приготовления лекарственного средства.

25 [38] Применение по п. [37], в котором лекарственное средство представляет собой лекарственное средство, предназначенное для лечения и/или предупреждения глютеновой энтеропатии.

[39] Способ лечения индивидуума, имеющего глютеновую энтеропатию, который включает введение индивидууму в эффективном количестве мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы по одному из п.п. [1]-[29] или комбинации по п. [29a].

30 [40] Набор, предназначенный для лечения и/или предупреждения глютеновой энтеропатии, который содержит по меньшей мере мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу по одному из п.п. [1]-[29] или комбинацию по п. [29a] и инструкции по применению.

Краткое описание чертежей

На чертежах показано:

- на фиг. 1 – результаты оценки связывания антитела к HLA-DQ (вариант DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6) с клеточными линиями Ва/F3, экспрессирующими HLA класса II (все антитела тестировали в концентрации 0,05 микрограммов (мкг)/мл, а контрольные антитела DQN0139bb (DQN0139bb-SG181) (WO2018/155692) и IC17dK тестировали в концентрации 1 мкг/мл). В названиях глютеных пептидов «а», «g» и «w» означают «альфа» «гамма» и «омега» соответственно;
- 10 на фиг. 1-2 – результаты оценки связывания антитела к HLA-DQ (вариант DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6) с клеточными линиями Ва/F3, экспрессирующими HLA класса II (все антитела тестировали в концентрации 0,05 мкг/мл, а контрольные антитела DQN0139bb и IC17dK тестировали в концентрации 1 мкг/мл);
- 15 на фиг. 1-3 - результаты оценки связывания антитела к HLA-DQ (вариант DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6) с клеточными линиями Ва/F3, экспрессирующими HLA класса II (все антитела тестировали в концентрации 0,05 мкг/мл, а контрольные антитела DQN0139bb и IC17dK тестировали в концентрации 1 мкг/мл);
- 20 на фиг. 1-4 - результаты оценки связывания антитела к HLA-DQ (вариант DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6) с клеточными линиями Ва/F3, экспрессирующими HLA класса II (все антитела тестировали в концентрации 0,05 мкг/мл, а контрольные антитела DQN0139bb и IC17dK тестировали в концентрации 1 мкг/мл);
- 25 на фиг. 1-5 - результаты оценки связывания антитела к HLA-DQ (вариант DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6) с клеточными линиями Ва/F3, экспрессирующими HLA класса II (все антитела тестировали в концентрации 0,05 мкг/мл, а контрольные антитела DQN0139bb и IC17dK тестировали в концентрации 1 мкг/мл);
- 30 на фиг. 1-6 - результаты оценки связывания антитела к HLA-DQ (вариант DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6) с клеточными линиями Ва/F3, экспрессирующими HLA класса II (все антитела тестировали в концентрации

0,05 мкг/мл, а контрольные антитела DQN0139bb и IC17dK тестировали в концентрации 1 мкг/мл);

на фиг. 1- 7- результаты оценки связывания антитела к HLA-DQ (вариант DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6) с клеточными линиями Ва/F3, экспрессирующими HLA класса II (все антитела тестировали в концентрации 0,05 мкг/мл, а контрольные антитела DQN0139bb и IC17dK тестировали в концентрации 1 мкг/мл);

на фиг. 1-8 - результаты оценки связывания антитела к HLA-DQ (вариант DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6) с клеточными линиями Ва/F3, экспрессирующими HLA класса II (все антитела тестировали в концентрации 0,05 мкг/мл, а контрольные антитела DQN0139bb и IC17dK тестировали в концентрации 1 мкг/мл);

на фиг. 1-9 - результаты оценки связывания антитела к HLA-DQ (вариант DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6) с клеточными линиями Ва/F3, экспрессирующими HLA класса II (все антитела тестировали в концентрации 0,05 мкг/мл, а контрольные антитела DQN0139bb и IC17dK тестировали в концентрации 1 мкг/мл);

на фиг. 1-10 - результаты оценки связывания антитела к HLA-DQ (вариант DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6) с клеточными линиями Ва/F3, экспрессирующими HLA класса II (все антитела тестировали в концентрации 0,05 мкг/мл, а контрольные антитела DQN0139bb и IC17dK тестировали в концентрации 1 мкг/мл);

на фиг. 1-11 - результаты оценки связывания антитела к HLA-DQ (вариант DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1521/L0605-F6) с клеточными линиями Ва/F3, экспрессирующими HLA класса II (антитела тестировали в концентрации 0,05 мкг/мл, а контрольные антитела DQN0139bb и IC17dK тестировали в концентрации 1 мкг/мл); (#) в случае HLA-DQ2.5 и HLA-DQ2.5/hCLIP антитела тестировали в концентрации 0,313 мкг/мл, а контрольные антитела DQN0139bb и IC17dK тестировали в концентрации 20 мкг/мл);

на фиг. 1-12 - результаты оценки связывания антитела к HLA-DQ (вариант DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1353/L0681-F6) с клеточными линиями Ва/F3, экспрессирующими HLA класса II (антитела тестировали в концентрации 0,05 мкг/мл, а контрольные антитела DQN0139bb и IC17dK тестировали в

концентрации 1 мкг/мл); (#) в случае HLA-DQ2.5 и HLA-DQ2.5/hCLIP антитела тестировали в концентрации 0,313 мкг/мл, а контрольные антитела DQN0139bb и IC17dK тестировали в концентрации 20 мкг/мл);

на фиг. 1-13 - результаты оценки связывания антитела к HLA-DQ (вариант DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1255/L0605-F6) с клеточными линиями Ba/F3, экспрессирующими HLA класса II (антитела тестировали в концентрации 0,05 мкг/мл, а контрольные антитела DQN0139bb и IC17dK тестировали в концентрации 1 мкг/мл); (#) в случае HLA-DQ2.5 и HLA-DQ2.5/hCLIP антитела тестировали в концентрации 0,313 мкг/мл, а контрольные антитела DQN0139bb и IC17dK тестировали в концентрации 20 мкг/мл);

на фиг. 1-14 – результаты оценки связывания антитела к HLA-DQ (вариант с HLA-DP, DR, DQ5.1 и DQ6.3 (все антитела тестировали в концентрации 0,05 мкг/мл, а контрольные антитела DQN0139bb и IC17dK тестировали в концентрации 1 мкг/мл);

на фиг. 1-15 - результаты оценки связывания DQN0139bb с клеточными линиями Ba/F3, экспрессирующими HLA класса II (контрольное антитело DQN0139bb тестировали в концентрации 1 мкг/мл);

на фиг. 1-16 - результаты оценки связывания IC17dK с клеточными линиями Ba/F3, экспрессирующими HLA класса II (контрольное антитело IC17dK тестировали в концентрации 1 мкг/мл);

на фиг. 2 - результаты оценки связывания антител с имеющими происхождение из PBMC CD19+ B-клетками (антитела тестировали в концентрации 0,05 мкг/мл, а контрольные антитела DQN0139bb и IC17dK тестировали в концентрации 1 мкг/мл); (#) в случае HLA-DQ2.5 и HLA-DQ2.5-CLIP антитела тестировали в концентрации 0,313 мкг/мл, а контрольные антитела DQN0139bb и IC17dK тестировали в концентрации 20 мкг/мл);

на фиг. 3-1 – ингибирующее действие антител к HLA-DQ в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/альфа 1 глиадин активации Т-клеток Jurkat;

на фиг. 3-2 – ингибирующее действие антител к HLA-DQ в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/альфа 2 глиадин активации Т-клеток Jurkat;

на фиг. 3-3 – ингибирующее действие антител к HLA-DQ в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/альфа 1b глиадин активации Т-клеток Jurkat;

на фиг. 3-4 – ингибирующее действие антител к HLA-DQ в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/омега 1 глиадин активации Т-клеток Jurkat;

на фиг. 3-5 – ингибирующее действие антител к HLA-DQ в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/омега 2 глиадин активации Т-клеток Jurkat;

5 на фиг. 3-6 – ингибирующее действие антител к HLA-DQ в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/BC гордеин активации Т-клеток Jurkat;

на фиг. 3-7 - ингибирующее действие антител к HLA-DQ в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/гамма 1 глиадин активации Т-клеток Jurkat;

10 на фиг. 3-8 - ингибирующее действие антител к HLA-DQ в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/гамма 2 глиадин активации Т-клеток Jurkat;

на фиг. 3-9 - ингибирующее действие антител к HLA-DQ в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/гамма 3 глиадин активации Т-клеток Jurkat;

15 на фиг. 3-10 - - ингибирующее действие антител к HLA-DQ в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/гамма 4а глиадин активации Т-клеток Jurkat;

на фиг. 4-1 - ингибирующее действие антител к HLA-DQ в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/альфа 1 глиадин активации Т-клеток Jurkat;

на фиг. 4-2 – ингибирующее действие антител к HLA-DQ в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/альфа 2 глиадин активации Т-клеток Jurkat;

20 на фиг. 4-3 – ингибирующее действие антител к HLA-DQ в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/альфа 1b глиадин активации Т-клеток Jurkat;

на фиг. 4-4 – ингибирующее действие антител к HLA-DQ в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/омега 1 глиадин активации Т-клеток Jurkat;

25 на фиг. 4-5 – ингибирующее действие антител к HLA-DQ в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/омега 2 глиадин активации Т-клеток Jurkat;

на фиг. 4-6 – ингибирующее действие антител к HLA-DQ в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/BC гордеин активации Т-клеток Jurkat;

30 на фиг. 4-7 - ингибирующее действие антител к HLA-DQ в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/гамма 1 глиадин активации Т-клеток Jurkat;

на фиг. 4-8 - ингибирующее действие антител к HLA-DQ в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/гамма 2 глиадин активации Т-клеток Jurkat;

на фиг. 4-9 - ингибирующее действие антител к HLA-DQ в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/гамма 3 глиадин активации Т-клеток Jurkat;

на фиг. 4-10 - ингибирующее действие антител к HLA-DQ в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/гамма 4а глиадин активации Т-клеток

5 Jurkat;

на фиг. 5-1 – опосредуемая 33-мерным глиадином зависящая от комплекса HLA-DQ2.2/альфа 1а глиадин активация Т-клеток Jurkat;

на фиг. 5-2 – опосредуемая 33-мерным глиадином зависящая от комплекса HLA-DQ2.2/альфа 2 глиадин активация Т-клеток Jurkat;

10 на фиг. 5-3 – ингибирующее действие антител к HLA-DQ в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.2/альфа 1а глиадин активации Т-клеток Jurkat;

на фиг. 5-4 – ингибирующее действие антител к HLA-DQ в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.2/альфа 2 глиадин активации Т-клеток Jurkat;

15 Описание вариантов осуществления изобретения

Технологии и процедуры, которые описаны или на которые сделаны ссылки в настоящем описании, в целом хорошо известны специалистам в данной области, и их широко применяют с использованием общепринятых методологий, таких, например, как описанные у Sambrook и др., Molecular Cloning: A

20 Laboratory Manual, 3-е изд., изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001; Current Protocols in Molecular Biology, под ред. F.M. Ausubel и др., 2003; серия Methods in Enzymology, изд-во Academic Press, Inc.: PCR 2: A Practical Approach, под ред. M.J. MacPherson, B.D. Hames и G.R. Taylor, 1995, Antibodies, A Laboratory Manual, под ред. Harlow и Lane, 1988 и Animal

25 Cell Culture, под ред. R.I. Freshney, 1987; Oligonucleotide Synthesis, под ред. M.J. Gait, 1984; Methods in Molecular Biology, изд-во Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook, под ред. J.E. Cellis, 1998, из-во Academic Press; Animal Cell Culture, под ред. R.I. Freshney, 1987; J. P. Mather и P.E. Roberts, Introduction to Cell and Tissue Culture, изд-во Plenum Press, 1998; Cell and Tissue Culture:

30 Laboratory Procedures, под ред. A. Doyle, J.B. Griffiths и D.G. Newell, изд-во J. Wiley and Sons, 1993-1998; Handbook of Experimental Immunology, под ред. D.M. Weir и C.C. Blackwell; Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells, под ред. J.M. Miller и M.P. Calos, 1987; PCR: The Polymerase Chain Reaction, под ред. Mullis и

др., 1994; Current Protocols in Immunology, под ред. J.E. Coligan и др., 1991; Short Protocols in Molecular Biology, изд-во Wiley and Sons, 1999; C.A. Janeway и P. Travers, Immunobiology, 1997; P. Finch, Antibodies, 1997; Antibodies: A Practical Approach, под ред. D. Catty, изд-во IRL Press, 1988-1989; Monoclonal Antibodies: A Practical Approach, под ред. P. Shepherd и C. Dean, изд-во Oxford University Press, 2000; E. Harlow и D. Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999; The Antibodies, под ред. M. Zanetti и J. D. Capra, изд-во Harwood Academic Publishers, 1995; и Cancer: Principles and Practice of Oncology, под ред. V.T. DeVita и др., изд-во J.B. Lippincott Company, 1993.

Для целей настоящего описания «акцепторный человеческий каркасный участок» означает каркасный участок, который содержит аминокислотную последовательность каркасного участка варибельного домена легкой цепи (VL) или каркасный участок варибельного домена тяжелой цепи (VH), имеющий происхождение из каркасного участка человеческого иммуноглобулина или человеческого консенсусного каркасного участка, указанного ниже.

Акцепторный человеческий каркасный участок, «имеющий происхождение из» каркасного участка человеческого иммуноглобулина или человеческого консенсусного каркасного участка, может иметь такую же аминокислотную последовательность или может содержать изменения в аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения количество аминокислотных изменений составляет 10 или менее, 9 или менее, 8 или менее, 7 или менее, 6 или менее, 5 или менее, 4 или менее, 3 или менее или 2 или менее. В некоторых объектах изобретения последовательность человеческого акцепторного каркасного участка VL идентична последовательности каркасного участка VL человеческого иммуноглобулина или последовательности человеческого консенсусного каркасного участка.

Понятие «аффинность» относится к суммарной силе всех нековалентных взаимодействий между одним связывающим сайтом молекулы (например, антитела) и ее партнером по связыванию (например, антигеном). В контексте настоящего описания, если не указано иное, «аффинность связывания» относится к присущей молекуле аффинности связывания, отражающей взаимодействие по типу 1:1 между компонентами связывающейся пары

(например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X к ее партнеру Y, как правило, можно характеризовать с помощью константы диссоциации (K_d). Аффинность можно оценивать с помощью общепринятых методов, известных в данной области, включая те, которые представлены в настоящем описании.

5 Ниже в описании представлены конкретные иллюстративные и приведенные в качестве примера варианты методов измерения аффинности связывания.

Антитело «с созревшей аффинностью» означает антитело с одним или несколькими изменениями в одном или нескольких гипервариабельных участках (HVR) по сравнению с родительским антителом, которое не содержит указанных изменений, указанные изменения приводят к повышению аффинности антитела к антигену.

10 Понятие «антигенсвязывающий фрагмент» или «антигенсвязывающий домен» относится к участку антитела, содержащему область, которая специфически связывается и является комплементарной полному антигену или его части. Антигенсвязывающий фрагмент/домен может быть образован из 15 одного или нескольких вариабельных доменов антитела (которые обозначают также как вариабельные области антитела). Предпочтительно антигенсвязывающие фрагменты/домены содержат как вариабельную область легкой цепи антитела (VL), так и вариабельную область тяжелой цепи антитела 20 (VH).

Понятие «анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающая молекула (антитело)» относится к антигенсвязывающей молекуле (антителу), которая обладает способностью связываться с HLA-DQ2.5 или одним или несколькими комплексами, образованными HLA-DQ2.5 и глютенным пептидом, с 25 аффинностью, достаточной для того, чтобы антитело можно было применять в качестве диагностического и/или терапевтического агента для таргетинга HLA-DQ2.5. В одном из вариантов осуществления изобретения уровень связывания анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающей молекулы (антитела) с неродственным антигеном составляет менее чем примерно 10% от связывания антитела с HLA-DQ2.5 или комплексом HLA-DQ2.5/глютенный пептид по данным измерений, 30 полученным, например, с помощью радиоиммуноанализа (РИА). В конкретных вариантах осуществления изобретения антитело, которое обладает «связывающей активностью» в отношении HLA-DQ2.5 или комплекса HLA-

DQ2.5/глютеиновый пептид, имеет величину константы диссоциации (Kd), составляющую 1 микромоль (мкМ) или менее, 100нМ или менее, 10нМ или менее, 1нМ или менее, 0,1нМ или менее, 0,01нМ или менее или 0,001нМ или менее (например 10^{-8} М или менее, например, от 10^{-8} М до 10^{-13} М, например, от 10^{-9} М до 10^{-13} М).

В контексте настоящего описания понятие «антигенсвязывающая молекула» относится к любой молекуле, которая содержит антигенсвязывающий центр, или любой молекуле, которая обладает связывающей активностью в отношении антигена, и может относиться также к молекулам, таким как пептид или белок, имеющим в длину пять аминокислот или более. Пептид или белок не ограничены теми, которые имеют происхождение из живого организма, и они могут представлять собой, например, полипептид, полученный из искусственно созданной последовательности. Они могут представлять собой также любой встречающийся в естественных условиях полипептид, синтетический полипептид, рекомбинантный полипептид и т.п. Кроме того, одним из вариантов указанной в настоящем описании антигенсвязывающей молекулы являются каркасные молекулы, которые содержат известную стабильную конформационную структуру, такую как альфа/бета-бочка (-баррель), в качестве каркаса, и в которых часть молекулы входит в состав антигенсвязывающего центра. В некоторых вариантах осуществления изобретения «антигенсвязывающая молекула» представляет собой антитело. Понятия «антигенсвязывающая молекула» и «антитело» в контексте настоящего описания используются в их наиболее широком смысле, и они относятся к различным структурам антител, включая (но не ограничиваясь только ими) моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител, при условии, что они обладают требуемой антигенсвязывающей активностью. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело представляет собой мультиспецифическое антитело. В некоторых вариантах осуществления изобретения мультиспецифическое антитело представляет собой биспецифическое антитело.

Понятие «фрагмент антитела» относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела, которая связывается с антигеном, с которым связывается интактное антитело. Примеры

фрагментов антитела включают (но не ограничиваясь только ими) молекулы Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; димерные антитела (диабоды); линейные антитела; одноцепочечные антитела (например, scFv); и мультиспецифические антитела, полученные из фрагментов антител.

5 Понятие «антитело, которое связывается с тем же самым эпитопом», что и референс-антитело, относится к антителу, которое по данным анализа в условиях конкуренции блокирует связывание референс-антитела с его антигеном на 50% или более, и наоборот, референс-антитело по данным анализа в условиях конкуренции блокирует связывание антитела с его антигеном на 50% или более.
10 Пример анализа в условиях конкуренции представлен в настоящем описании.

 Понятие «аутоиммунное заболевание» относится к незлокачественному заболеванию или нарушению, возникающему в собственных тканях индивидуума и направленное против них. В контексте настоящего описания из аутоиммунных заболеваний специально исключены злокачественные или
15 раковые заболевания или состояния, прежде всего исключены В-клеточная лимфома, острый лимфобластный лейкоз (ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), волосатоклеточный лейкоз и хронический миелобластный лейкоз. Примеры аутоиммунных заболеваний или нарушений включают (но не ограничиваясь только ими) глютенную энтеропатию, воспалительные реакции,
20 такие как воспалительные кожные болезни, включая псориаз и дерматит (например, атопический дерматит); системную склеродермию и склероз; реакции, ассоциированные с воспалительным заболеванием кишечника (такие, как болезнь Крона и язвенный колит); респираторный дистресс-синдром (включая респираторный дистресс-синдром взрослых; ARDS); дерматит;
25 менингит; энцефалит; увеит; колит; гломерулонефрит; аллергические состояния, такие как экзема и астма, и другие состояния, включающие инфильтрацию Т-клеток и хронические воспалительные реакции; атеросклероз; дефицит адгезии лейкоцитов; ревматоидный артрит; системную красную волчанку (SLE) (включая, но не ограничиваясь только ими, волчаночный нефрит, кожную
30 волчанку); сахарный диабет (например, сахарный диабет типа I или инсулинозависимый сахарный диабет); рассеянный склероз; синдром Рейно; аутоиммунный тиреоидит; тиреоидит Хашимото; аллергический энцефаломиелит; синдром Шегрена; ювенильный диабет; и иммунные реакции,

связанные с острой и отсроченной гиперчувствительностью, опосредуемой цитокинами и Т-лимфоцитами, обычно обнаруживаемые при туберкулезе, саркоидозе, полимиозите, гранулематозе и васкулите; пернициозную анемию (болезнь Аддисона); заболевания, включающие диapedез лейкоцитов;

5 воспалительное нарушение центральной нервной системы (ЦНС); синдром полиорганного повреждения; гемолитическую анемию (включая, но не ограничиваясь только ими, криоглобулинемию или положительную по Кумбсу анемию); миастению гравис; заболевания, опосредуемые комплексом антиген-антитело; заболевания антигломерулярной базальной мембраны;

10 антифосфолипидный синдром; аллергический неврит; болезнь Грейвса; миастенический синдром Ламберта-Итона; буллезный пемфигоид; пузырчатку; аутоиммунные полиэндокринопатии; болезнь Рейтера; синдром жесткого человека; болезнь Бехчета; гигантоклеточный артериит; иммунокомплексный нефрит; IgA-нефропатию; IgM-полиневропатию; иммунную

15 тромбоцитопеническую пурпуру (ИТР) или аутоиммунную тромбоцитопению.

Понятие «глютеновая энтеропатия (целиакия)» относится к наследственному аутоиммунному заболеванию, вызываемому повреждениями в тонком кишечнике при попадании в организм глютена, содержащегося в пище. Симптомы глютеновой энтеропатии включают (но не ограничиваясь только ими)

20 желудочно-кишечные расстройства, такие как боль в животе, диарея и гастроэзофагеальный рефлюкс, дефицит витаминов, минеральных веществ, симптомы со стороны центральной нервной системы (ЦНС), такие как усталость и тревожная депрессия, симптомы со стороны костной системы, такие как остеомаляция и остеопороз, кожные симптомы, такие как воспаление кожи,

25 симптомы со стороны кровеносной системы, такие как анемия и лимфоцитопения, и другие симптомы, такие как бесплодие, гипогонадизм, нарушение у детей способности к развитию и низкий рост.

Понятие «химерное» антитело относится к антителу, в котором часть тяжелой и/или легкой цепи имеет происхождение из конкретного источника или

30 конкретного вида, а остальная часть тяжелой и/или легкой цепи имеет происхождение из другого источника или другого вида.

Понятие «класс» антитела относится к типу константного домена или константной области, входящего/входящей в его тяжелую цепь. Существует пять

основных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, а некоторые из них можно дополнительно подразделять на подклассы (изотипы), например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. Константные домены тяжелых цепей, соответствующие различным классам иммуноглобулинов, обозначают как альфа, дельта, эpsilon, гамма и мю соответственно.

Понятие «эффективное количество» агента, например, фармацевтической композиции, относится к количеству, эффективному при применении в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения требуемого терапевтического или профилактического результата.

Понятие «Fc-область» в контексте настоящего описания относится к C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит по меньшей мере часть константной области. Понятие включает имеющие нативную последовательность Fc-области и варианты Fc-областей. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-область тяжелой цепи человеческого IgG простирается от Cys226 или от Pro230 до карбоксильного конца тяжелой цепи. Однако C-концевой лизин (Lys447) или глицин-лизин (остатки 446-447) Fc-области могут присутствовать или отсутствовать. Если в настоящем описании не указано иное, то нумерация аминокислотных остатков в Fc-области или в константной области соответствует системе нумерации EU, называемой также EU-индексом, которая описана у Kabat и др., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-е изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Понятие «каркасный участок» или «FR» относится к остаткам переменного домена, отличным от остатков гиперпеременных участков (HVR). FR переменного домена, как правило, состоит из четырех FR-доменов: FR1, FR2, FR3 и FR4. Таким образом, последовательности HVR и FR, как правило, располагаются в VH (или VL) в следующем порядке: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Понятия «полноразмерное антитело», «интактное антитело» и «цельное антитело» в контексте настоящего описания используют взаимозаменяемо для обозначения антитела, имеющего структуру, практически сходную с нативной структурой антитела, или имеющего тяжелые цепи, которые содержат Fc-область, указанную в настоящем описании.

В контексте настоящего описания понятие «глютен» относится в целом к комплексу запасных белков, называемых проламинами, которые содержатся в пшенице и других родственных злаках. В просвете кишечника глютен
5
расщепляется до так называемых глютенных пептидов. Глютенные пептиды включают (но не ограничиваясь только ими) глиадин из пшеницы, гордеин из ячменя, секалин из ржи и авенин из овса.

При глютенной энтеропатии глютенные пептиды представляют собой антигенные пептиды, распознаваемые Т-клетками, что вызывает заболевание. Между тем, иммунное доминирование представляет собой явление, при котором
10
иммунный ответ в основном вызывается относительно небольшим количеством антигенных пептидов. Такие антигенные пептиды можно обозначать как «иммунодоминантные пептиды». При глютенной энтеропатии такие иммунодоминантные пептиды включают, например, альфа 1 глиадин (который можно обозначать также как «альфа 1а глиадин») и альфа 2 глиадин (которые
15
оба включены в последовательность 33-мерного глиадина), и омега 1 глиадин, омега 2 глиадин и ВС-гордеин (в целом пять пептидов) (Science Translational Medicine, т. 2, 21 июля 2010 г., 41, сс. 41-51). Альтернативно этому, иммунодоминантные пептиды включают (но не ограничиваясь только ими) альфа 1 глиадин, альфа 2 глиадин, омега 1 глиадин, омега 2 глиадин, ВС-
20
гордеин, гамма 1 глиадин и гамма 2 глиадин (в целом семь пептидов). В настоящем описании такие иммунодоминантные пептиды можно обозначать также как «иммунодоминантные пептиды, с которыми связана глютенная энтеропатия». Типы и общее количество пептидов не ограничены конкретно, если они доминируют в вызывании глютенной энтеропатии.

25
Фраза не обладает «практически никакой связывающей активностью» в контексте настоящего описания относится к способности антитела связываться с не представляющим интерес антигеном с таким уровнем связывания, который включает неспецифическое или фоновое связывания, но не включает специфическое связывание. Иными словами, указанное антитело не обладает
30
«никакой специфической/значительной связывающей активностью» в отношении не представляющего интерес антигена. Специфичность можно измерять с помощью любых методов, указанных в настоящем описании, или известных в данной области. Вышеуказанный уровень неспецифического или

фонового связывания может быть равен нулю, или может не быть равен нулю, но быть близким к нулю, или может быть столь низким, чтобы специалисты в данной области могли им технически пренебрегать. Например, когда специалисту в данной области не удастся обнаружить или наблюдать какой-либо значительный (или относительно сильный) сигнал связывания между антителом и не представляющим интерес антигеном с использованием пригодного анализа связывания, то можно считать, что антитело не обладает «практически никакой связывающей активностью» или «никакой специфической/значительной связывающей активностью» в отношении не представляющего интерес антигена.

Альтернативно этому, понятие не обладает «практически никакой связывающей активностью» или не обладает «никакой специфической/значительной связывающей активностью» можно перефразировать как «отсутствие специфического/значительного/существенного связывания» (с не представляющим интерес антигеном). Иногда в данной области фраза «отсутствие связывающей активности» имеет практически такое же значение, что и фраза не обладает «практически никакой связывающей активностью» или «никакой специфической/значительной связывающей активностью».

В контексте настоящего описания «HLA-DR/DP» означает «HLA-DR и HLA-DP» или «HLA-DR или HLA-DP». Указанные HLA являются молекулами MHC класса II, кодируемые соответствующими аллелями гаплотипа в локусе MHC класса II у человека. Понятие «HLA-DQ» в целом относится к изоформам HLA-DQ, включая HLA-DQ2.5, HLA-DQ7.5, HLA-DQ5.1, HLA-DQ6.3, HLA-DQ7.3 и HLA-DQ8. В настоящем изобретении помимо HLA-DQ2.5 молекулы HLA-DQ включают (но не ограничиваясь только ими) молекулы HLA-DQ известных подтипов (изоформ), такие как HLA-DQ2.2, HLA-DQ2.3, HLA-DQ4.3, HLA-DQ4.4, HLA-DQ5.1, HLA-DQ5.2, HLA-DQ5.3, HLA-DQ5.4, HLA-DQ6.1, HLA-DQ6.2, HLA-DQ6.3, HLA-DQ6.4, HLA-DQ6.9, HLA-DQ7.2, HLA-DQ7.3, HLA-DQ7.4, HLA-DQ7.5, HLA-DQ7.6, HLA-DQ8, HLA-DQ9.2 и HLA-DQ9.3. Аналогично этому, понятие «HLA-DR (DP)» относится к изоформам HLA-DR (DP).

В контексте настоящего описания понятия «клетка-хозяин», «линия клеток-хозяев» и «культура клеток-хозяев» используются взаимозаменяемо, и они относятся к клеткам, в которые интродуцирована экзогенная нуклеиновая

кислота, включая потомство указанных клеток. К клеткам-хозяевам относятся «трансформанты» и «трансформированные клетки», которые включают первичную трансформированную клетку, а также потомство, выведенное из нее, независимо от количества пересевов. Потомство может не быть строго
5 идентичным родительской клетке по составу нуклеиновых кислот, а может нести мутации. Под данное понятие подпадает мутантное потомство, которое обладает такой же функцией или биологической активностью, что и отобранная путем скрининга или селекции исходная трансформированная клетка.

«Человеческое антитело» представляет собой антитело, которое имеет
10 аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности антитела, продуцируемого человеком или человеческой клеткой, или полученную из источника, отличного от человека, с использованием спектра человеческих антител или других кодирующих человеческое антитело последовательностей. Из указанного определения человеческого антитела
15 специально исключено гуманизированное антитело, содержащее нечеловеческие антигенсвязывающие остатки.

«Человеческий консенсусный каркасный участок» представляет собой каркасный участок, который содержит наиболее часто встречающиеся
аминокислотные остатки в отобранных последовательностях каркасных участков
20 VL или VH человеческого иммуноглобулина. Для обозначения каркасного участка можно применять также понятие «каркасный участок человеческого антитела». Как правило, отобранные последовательности каркасных участков VL или VH человеческого иммуноглобулина выбраны из подгруппы
последовательностей переменных доменов. Как правило, подгруппа
25 последовательностей представляет собой подгруппу, описанную у Kabat и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е изд, изд-во NIH Publication, 91-3242, Bethesda MD, 1991, т.т. 1-3. В одном из вариантов осуществления изобретения касательно VL подгруппа представляет собой подгруппу каппа I, описанную у Kabat и др., выше. В одном из вариантов осуществления
30 изобретения касательно VH подгруппа представляет собой подгруппу III, описанную у Kabat и др., выше.

Понятие «гуманизированное» антитело относится к химерному антителу, которое содержит аминокислотные остатки из нечеловеческих HVR и

аминокислотные остатки из человеческих FR. В некоторых вариантах осуществления изобретения гуманизованное антитело может содержать практически все по меньшей мере из одного и, как правило, двух переменных доменов, в которых все или практически все HVR (например, CDR) соответствуют участкам нечеловеческого антитела, а все или практически все FR соответствуют участкам человеческого антитела. Гуманизованное антитело необязательно может содержать по меньшей мере часть константной области антитела, имеющей происхождение из человеческого антитела. Понятие «гуманизованная форма» антитела, например, нечеловеческого антитела, относится к антителу, которое подвергали гуманизации.

Понятие «гипервариабельный участок» или «HVR» в контексте настоящего описания относится к каждому из участков переменного домена антитела, последовательности которых являются гипервариабельными и которые определяют специфичность связывания антигена, например, «определяющие комплементарность участки» или «CDR») и/или формируют петли определенной структуры («гипервариабельные петли»), и/или содержат контактирующие с антигеном остатки («контакты с антигеном»). Как правило, антитела содержат шесть HVR; три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3). Согласно настоящему описанию примеры HVR включают

(а) гипервариабельные петли, включающие аминокислотные остатки 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) (Chothia и Lesk, J. Mol. Biol. 196, 1987, сс. 901-917);

(б) CDR, включающие аминокислотные остатки 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) (Kabat и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, публикация NIH 91-3242);

(в) области контакта с антигеном, включающие аминокислотные остатки 27с-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) и 93-101 (H3) (MacCallum и др., J. Mol. Biol. 262, 1996, сс. 732-745); и

(г) комбинации остатков, указанных в подпунктах (а), (б) и/или (в), включающие аминокислотные остатки HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) и 94-102 (H3).

В одном из вариантов осуществления изобретения, остатки HVR содержат остатки, указанные в спецификации.

Если специально не указано иное, то остатки в HVR и другие остатки в переменном домене (например, остатки в FR) нумеруют согласно Kabat и др.,
5 выше.

«Иммуноконъюгат» представляет собой антитело, конъюгированное с одной или несколькими гетерологичной(ыми) молекулой (ами).

«Индивидуум» или «субъект» представляет собой млекопитающее. К млекопитающим относятся (но не ограничиваясь только ими) одомашненные
10 животные (например, коровы, овцы, кошки, собаки и лошади), приматы (например, человек и приматы кроме человека, такие как обезьяны), кролики и грызуны (например, мыши и крысы). В некоторых вариантах осуществления изобретения индивидуум или субъект представляет собой человека.

В настоящем изобретении при оценке связывания антител к HLA-DQ2.5 с
15 указанными молекулами HLA-DQ можно применять в сочетании с приемлемой молекулой HLA-DQ, указанной выше, пептид CLIP.

«Выделенное» антитело представляет собой антитело, которое отделено от компонента его естественного окружения. В некоторых вариантах
20 осуществления изобретения антитело очищают до чистоты, превышающей 95% или 99% по данным, например, электрофоретических анализов (таких, например, как ДСН-ПААГ, изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ), капиллярный электрофорез) или хроматографических анализов (таких, например, как ионообменная хроматография или ЖХВР с обращенной фазой). Обзор методов оценки чистоты антител см., например, у Flatman и др., J. Chromatogr. B 848,
25 2007, сс. 79-87.

«Выделенная» нуклеиновая кислота представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая отделена от компонента ее естественного
30 окружения. Выделенная нуклеиновая кислота включает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащуюся в клетках, которые в норме включают молекулу нуклеиновой кислоты, но в которых молекула нуклеиновой кислоты присутствует вне хромосомы или в которых ее локализация на хромосоме отличается от ее встречающейся в естественных условиях локализации на хромосоме.

Понятие «выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающую молекулу (антитело)» (которую обозначают также для простоты «нуклеиновая кислота, кодирующая анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающую молекулу (антитело)» относится к одной или нескольким молекулам нуклеиновых кислот, кодирующих тяжелые и легкие цепи антитела (или их фрагменты), включая указанную(ые) молекулу(ы) нуклеиновой(ых) кислоты(т) в одном векторе или в различных векторах, и указанную(ые) молекулу(ы) нуклеиновой(ых) кислоты(т), присутствующую(ие) в одном или нескольких положениях в клетке-хозяине.

10 Понятие «моноклональное антитело» в контексте настоящего описания относится к антителу, полученному из популяции практически гомогенных антител, т.е. индивидуальные антитела, входящие в популяцию, идентичны и/или связываются с одним и тем же эпитопом, за исключением возможных вариантов антител, например, содержащих мутации, встречающиеся в 15 естественных условиях или возникающие в процессе производства препарата моноклонального антитела, указанные варианты, как правило, присутствуют в минорных количествах. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые, как правило, включают различные антитела к различным детерминантам (эпитопам), каждое моноклональное антитело из препарата 20 моноклонального антитела направлено против одной детерминанты на антигене. Таким образом, прилагательное «моноклональный» определяет особенность антитела, характеризуя его как полученное из практически гомогенной популяции антител, а не сконструированное в соответствии с требованиями к получению антитела с помощью какого-либо конкретного метода. Например, 25 моноклональные антитела, которые можно применять согласно настоящему изобретению, можно создавать с помощью различных технологий, включая (но не ограничиваясь только ими) метод гибридом, методы рекомбинантной ДНК, методы фагового дисплея и методы, основанные на использовании трансгенных животных, которые содержат все или часть локусов человеческого 30 иммуноглобулина, указанные методы и другие, приведенные в качестве примера методы получения моноклональных антител, представлены в настоящем описании.

Понятие «голое антитело» относится к антителу, неконъюгированному с гетерологичным фрагментом или радиоактивной меткой. Голое антитело может присутствовать в фармацевтической композиции.

5 Понятие «нативные антитела» относится к встречающимся в естественных условиях молекулам иммуноглобулинов с различными структурами. Например, нативные антитела в виде IgG представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины с молекулярной массой примерно 150000 Да, состоящие из двух идентичных легких цепей и двух идентичных тяжелых цепей, связанных дисульфидными мостиками. В направлении от N-конца к C-концу, каждая 10 тяжелая цепь имеет переменную область (VH), которую называют также переменным тяжелым доменом или переменным доменом тяжелой цепи, за которой следует три константных домена тяжелой цепи (CH1, CH2 и CH3). Аналогично этому, в направлении от N-конца к C-концу, каждая легкая цепь имеет переменную область (VL), которую называют также переменным 15 легким доменом или переменным доменом легкой цепи, за которой следует константный домен легкой цепи (CL).

Легкая цепь антитела может принадлежать к одному из двух типов, называемых каппа и лямбда, в зависимости от аминокислотной последовательности ее константного домена.

20 Понятие «молекула нуклеиновой кислоты» или «полинуклеотид» включает любое соединение и/или любую субстанцию, которое/которая содержит полимер нуклеотидов. Каждый нуклеотид состоит из основания, в частности пуринового или пиримидинового основания (т.е. цитозина (C), гуанина (G), аденина (A), тимина (T) или урацила (U)), сахара (т.е. дезоксирибозы или рибозы) и 25 фосфатной группы. Часто молекула нуклеиновой кислоты описывается последовательностью оснований, при этом указанные основания образуют первичную структуру (линейную структуру) молекулы нуклеиновой кислоты. Последовательность оснований, как правило, представляют в направлении 5' → 3'. В настоящем описании под понятие молекула нуклеиновой кислоты 30 подпадают дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК), включая, например, комплементарную ДНК (кДНК) и геномную ДНК, рибонуклеиновая кислота (РНК), в частности, матричная РНК (мРНК), синтетические формы ДНК или РНК и смешанные полимеры, содержащие две или большее количество

указанных молекул. Молекула нуклеиновой кислоты может быть линейной или кольцевой. Кроме того, понятие «нуклеиновая кислота» включает как смысловые, так и бессмысловые цепи, а также одноцепочечные и двухцепочечные формы. Кроме того, указанная в настоящем описании молекула нуклеиновой кислоты может содержать встречающиеся в естественных условиях или не встречающиеся в естественных условиях нуклеотиды. Примеры не встречающихся в естественных условиях нуклеотидов включают модифицированные нуклеотидные основания с дериватизированными сахарами или связями фосфатного каркаса, или химически модифицированные остатки.

5 Молекулы нуклеиновых кислот включают также молекулы ДНК и РНК, пригодные в качестве вектора для непосредственной экспрессии антитела, предлагаемого в изобретении, *in vitro* и/или *in vivo*, например, в хозяине или пациенте. Указанные векторы на основе ДНК (например, кДНК) или РНК (например, мРНК) могут представлять собой немодифицированные или

10 модифицированные векторы. Например, мРНК можно химически модифицировать для повышения стабильности РНК-вектора и/или экспрессии кодируемой молекулы таким образом, чтобы мРНК можно было бы

15 инъецировать индивидууму с целью образования антитела *in vivo* (см., например, Stadler и др., Nature Medicine 2017, публикация онлайн 12 июня 2017 г., doi:10.1038/nm.4356 или EP 2101823 B1).

20

«Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности» относительно полипептидной референс-последовательности определяют как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в полипептидной референс-

25 последовательности, после выравнивая последовательностей и при необходимости интродукции брешей для достижения максимального процента идентичности последовательностей, и не рассматривая какие-либо консервативные замены в качестве фактора, влияющего на идентичность последовательностей. Сравнительный анализ для целей определения процента

30 идентичности аминокислотных последовательностей можно осуществлять различными путями, известными в данной области, используя, например, публично доступные компьютерные программы, такие как программы BLAST, BLAST-2, Clustal W, Megalign (DNASTAR) или GENETYX® (фирма Genetyx Co.,

последовательности Б относительно А. Если специально не указано иное, то все величины % идентичности аминокислотных последовательностей, указанные в настоящем описании, получали с использованием описанной в предыдущем параграфе компьютерной программы ALIGN-2.

5 Понятие «фармацевтическая препаративная форма» или «фармацевтическая композиция» относится к препарату, который находится в такой форме, которая обеспечивает биологическую активность входящего в его состав действующего вещества, которое должно обладать эффективностью, и который не содержит дополнительные компоненты, обладающие неприемлемой токсичностью для
10 индивидуума, которому следует вводить препаративную форму/композицию.

 Понятие «фармацевтически приемлемый носитель» относится к ингредиенту в фармацевтической препаративной форме/композиции, отличному от действующего вещества, который является нетоксичным для субъекта. Фармацевтически приемлемый носитель включает (но не ограничиваясь только
15 ими) буфер, эксципиент, стабилизатор или консервант.

 Понятие «HLA-DQ2.5» в контексте настоящего описания относится к любому нативному HLA-DQ2.5 из любого позвоночного животного, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди) и грызуны (например, мыши и крысы), если не указано иное. Под понятие подпадает
20 «полноразмерный» непроцессированный HLA-DQ2.5, а также любая форма HLA-DQ2.5, полученная в результате процессинга в клетке. Под понятие подпадают также встречающиеся в естественных условиях варианты HLA-DQ2.5, например, сплайсинговые варианты или аллельные варианты. Аминокислотная последовательность приведенного в качестве примера HLA-
25 DQ2.5 находится в открытом доступе в банке данных белков Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) (PDB) с кодом доступа 4OZG в базу данных IPD-IMGT/HLA.

 В настоящем описании «TCR» означает «Т-клеточный рецептор», который представляет собой мембранный белок, локализованный на поверхности Т-
30 клеток (таких как CD4⁺ Т-клетки с рестрикцией по HLA-DQ2.5), и он распознает фрагмент антигена (такой как глютенный пептид), презентируемый на молекулах МНС, включая HLA-DQ2.5.

В контексте настоящего описания понятие «лечение» (и его грамматические вариации, такие как «лечить» или «процесс лечения») относится к клиническому вмешательству с целью изменения естественного течения болезни у индивидуума, подлежащего лечению, и его можно осуществлять либо для профилактики, либо в процессе развития клинической патологии.

5 Требуемыми действиями лечения являются (но не ограничиваясь только ими) предупреждение возникновения или рецидива болезни, облегчение симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий болезни, предупреждение метастазов, снижение скорости развития болезни, 10 облегчение или временное ослабление болезненного состояния и ремиссия или улучшение прогноза. В некоторых вариантах изобретения антитела, предлагаемые в изобретении, применяют для задержки развития болезни или замедления прогрессирования болезни.

Понятие «вариабельная область» или «вариабельный домен» относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который участвует в связывании антитела с антигеном. Вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи (VH и VL соответственно) нативного антитела, как правило, имеют сходные структуры, при этом каждый домен содержит четыре консервативных каркасных участка (FR) и три гипервариабельных участка (HVR) (см., например, Kindt и др., *Kuby Immunology*, 6-ое изд., изд-во W.H. Freeman and Co., 2007, с. 91).

20 Одного VH- или VL-домена может быть достаточно для обеспечения специфичности связывания антигена. Кроме того, антитела, которые связываются с конкретным антигеном, можно выделять, используя VH- или VL-домен из антитела, которое связывается с антигеном, для скрининга библиотеки комплементарных VL- или VH-доменов соответственно (см., например, Portolano и др., *J. Immunol.* 150, 1993, сс. 880-887; Clarkson и др., *Nature* 352, 1991, сс. 624-628).

25

Понятие «вектор» в контексте настоящего описания относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая обладает способностью к размножению другой нуклеиновой кислоты, с которой она связана. Понятие включает вектор в виде самореплицирующейся структуры нуклеиновой кислоты, а также вектор, включенный в геном клетки-хозяина, в которую он интродуцирован. Некоторые векторы обладают способностью контролировать экспрессию нуклеиновых

30

кислот, с которыми они функционально связаны. Указанные векторы в контексте настоящего описания обозначают как «экспрессионные векторы».

Аминокислотные модификации

5 Антисвязывающая молекула (или антитело), предлагаемая в изобретении, может содержать одну или несколько модификаций. Указанные модификации включают, например, делеции и/или инсерции, и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антитела. Для получения конечной конструкции можно использовать любую комбинацию делеций, инсерций и замен при условии, что конечная конструкция обладает требуемыми характеристиками, например, способностью связываться с антигеном.

10 Антисвязывающая молекула (или антитело), предлагаемая в изобретении, может содержать аминокислотные замены. Консервативные замены представлены ниже в таблице 1-1 под заголовком «предпочтительные замены». Более важные замены представлены ниже в таблице 1-1 под заголовком «приведенные в качестве примера замены», и они дополнительно описаны ниже со ссылкой на классы боковых цепей аминокислот. Аминокислотные замены можно интродуцировать в представляющее интерес антитело и продукты

15 подвергать скринингу в отношении требуемой активности, например, сохранения/повышения способности связываться с антигеном.

20 Таблица 1-1

Исходный остаток	Приведенные в качестве примера замены	Предпочтительные замены
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; норлейцин	Leu
Leu (L)	норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr

Исходный остаток	Приведенные в качестве примера замены	Предпочтительные замены
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; норлейцин	Leu

В настоящем описании в качестве обозначения, характеризующего изменения аминокислот, можно применять соответственно обозначение, в котором перед номером и после номера конкретного положения указаны 5
однобуквенные или трехбуквенные коды аминокислот до и после изменения соответственно. Например, используют обозначение N100bL или Asn100bLeu для описания замены содержащейся в варибельной области антитела аминокислоты Asn в положении 100b (согласно нумерации Кэбота) на Leu. Для 10
номера аминокислотного положения согласно нумерации Кэбота это означает, что написанный перед номером однобуквенный или трехбуквенный код аминокислоты обозначает аминокислоту до замены, а написанный после номера однобуквенный или трехбуквенный код аминокислоты обозначает аминокислоту 15
после замены. Аналогично этому, изменение P238D или Pro238Asp, которое используют для обозначения замены аминокислоты в Fc-области, содержащейся в константной области антитела, означает замену Pro в положении 238 (согласно EU-нумерации) на Asp. Для номера аминокислотного положения согласно EU-нумерации это означает, что написанный перед номером однобуквенный или 20
трехбуквенный код аминокислоты обозначает аминокислоту до замены, а написанный после номера однобуквенный или трехбуквенный код аминокислоты обозначает аминокислоту после замены.

Мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы /антитела

Понятие «мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула (антитело)» относится к антигенсвязывающей молекуле (антителу), которая специфически связывается с более чем одним антигеном (например, пептидом) или эпитопом. 25
В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающая молекула (антитело) имеет по меньшей мере первый антигенсвязывающий фрагмент/домен, который может связываться с одним или несколькими

антигенами (например, пептидами), и второй антигенсвязывающий фрагмент /домен, который может связываться с одним или несколькими антигенами (например, пептидами). Некоторые или все антигены, с которыми связывается первый антигенсвязывающий фрагмент/домен, могут отличаться от некоторых или всех антигенов, с которыми связывается второй антигенсвязывающий фрагмент/домен. Альтернативно этому, некоторые из антигенов, с которыми связывается первый антигенсвязывающий фрагмент/домен, могут быть идентичны некоторым из антигенов, с которыми связывается второй антигенсвязывающий фрагмент/домен.

10 В контексте настоящего изобретения «мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула (антитело)» может связываться специфически с различными типами антигенов или эпитопов. Более конкретно, мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы (антитела) представляют собой молекулы, которые обладают специфичностью в отношении по меньшей мере двух различных антигенов или эпитопов, и к ним относятся в дополнение к молекулам/антителам, распознающим различные антигены, молекулы/антитела, распознающие различные эпитопы на одном и том же антигене. Например, как правило, такие молекулы связываются с двумя антигенами или эпитопами («биспецифические антигенсвязывающие молекулы (антитела)»; которые в
15 настоящем описании можно обозначать также как «антигенсвязывающие молекулы (антитела) с двойной специфичностью»), но они могут также обладать специфичностью в отношении большего количества антигенов или эпитопов (например, трех или большего количества типов антигенов).

25 В настоящем описании такие понятия, как «мультиспецифические» и «биспецифические», означают, что специфичность антигенсвязывающего домена/участка отличается от специфичности другого антигенсвязывающего домена/участка. То есть понятия означают, что в антигенсвязывающей молекуле присутствуют две или большее количество специфичностей. Например, в «биспецифической» антигенсвязывающей молекуле (антителе) первый
30 антигенсвязывающий фрагмент/домен может связываться с первой группой комплексов, образованных HLA-DQ2.5 и глютеиновым пептидом, а второй антигенсвязывающий фрагмент/домен может связываться со второй группой комплексов, образованных HLA-DQ2.5 и глютеиновым пептидом. Компоненты

(т.е. комплексы) двух групп могут перекрываться, но могут не быть идентичными. Таким образом, некоторые комплексы могут быть включены в обе группы. Такие понятия, как «мультиспецифические» и «биспецифические» могут охватывать эту ситуацию. Это же можно применять к первой и второй группам комплексов, которые не связываются с первым/вторым антигенсвязывающим фрагментом/доменом.

Понятие «биспецифическая» означает, что антигенсвязывающая молекула обладает способностью специфически связываться по меньшей мере в двумя различными антигенными детерминантами. Примеры предпочтительных вариантов «мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы», представленной в настоящем изобретении, включают мультиспецифические антитела. Когда Fc-область с пониженной связывающей активностью в отношении Fc гамма рецептора применяют в качестве Fc-области мультиспецифического антитела, то можно применять соответственно Fc-область, полученную из мультиспецифического антитела. Биспецифические антитела являются особенно предпочтительными в качестве мультиспецифических антител, предлагаемых в настоящем изобретении. В этом случае биспецифическое антитело представляет собой антитело с двумя различными специфичностями. Биспецифические антитела IgG-типа могут секретироваться из гибридной гибридомы (квадромы), полученной путем слияния двух типов гибридом, продуцирующих антитела IgG-типа (Milstein и др., Nature 305, 1983, сс. 537-540).

Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула (антитело) может содержать по меньшей мере два антигенсвязывающих фрагмента/домена. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула (антитело) может содержать первый антигенсвязывающий фрагмент/домен и второй антигенсвязывающий фрагмент/домен.

Биспецифическая антигенсвязывающая молекула (или биспецифическое антитело) может содержать первый антигенсвязывающий фрагмент/домен и второй антигенсвязывающ фрагмент/домен. Первый антигенсвязывающий фрагмент/домен может содержать первую переменную область антитела и вторую переменную область антитела. Первая переменная область антитела находится в ассоциации со второй переменной областью антитела. Ассоциация

между первой переменной областью антитела и второй переменной областью антитела обеспечивает связывание второго антигенсвязывающего фрагмента/домена со вторым антигеном/эпитопом. Аналогично этому, второй антигенсвязывающий фрагмент/домен может содержать третью переменную область антитела и четвертую переменную область антитела. Третья переменная область антитела находится в ассоциации с четвертой переменной областью антитела. Ассоциация между третьей переменной областью антитела и четвертой переменной областью антитела обеспечивает связывание первого антигенсвязывающего фрагмента/домена с первым антигеном/эпитопом. В некоторых вариантах осуществления изобретения первая переменная область антитела представляет собой переменную область (VH) тяжелой цепи (H-цепи) (которую можно обозначать также как «переменная область (VH) первой тяжелой цепи (H-цепи), а вторая переменная область антитела представляет собой переменную область (VL) легкой цепи (L-цепи) (которую можно обозначать также как «переменная область (VL) первой легкой цепи (L-цепи)»). В некоторых вариантах осуществления изобретения третья переменная область антитела представляет собой переменную область (VH) тяжелой цепи (H-цепи) (которую можно обозначать также как «переменная область (VH) второй тяжелой цепи (H-цепи), а четвертая переменная область антитела представляет собой переменную область (VL) легкой цепи (L-цепи) (которую можно обозначать также как «переменная область (VL) второй легкой цепи (L-цепи)»). Переменная область (VH) первой тяжелой цепи (H-цепи) вступает в ассоциацию с переменной областью (VL) первой легкой цепи (L-цепи), что обеспечивает связывание с первым антигеном/эпитопом. Переменная область (VH) второй тяжелой цепи (H-цепи) вступает в ассоциацию с переменной областью (VL) второй легкой цепи (L-цепи), что обеспечивает связывание с вторым антигеном/эпитопом. Ассоциация (которую в альтернативном варианте можно обозначать как «взаимодействие») между переменными областями (т.е. между VH и VL) основывается на структуре (например, аминокислотных остатках) на границе раздела VH/VL, известной в данной области.

В настоящем изобретении предпочтительно биспецифическая антигенсвязывающая молекула (антитело) может связываться с двумя или

большим количеством глютенных пептидов (или комплексов, образованных HLA-DQ2.5 и глютенными пептидами). В некоторых вариантах осуществления изобретения биспецифическая антигенсвязывающая молекула (антитело) содержит первый антигенсвязывающий фрагмент/домен (который содержит первую переменную область антитела и вторую переменную область антитела (см. выше)), который связывается с одним или несколькими комплексами, образованными HLA-DQ2.5 и глютенным пептидом, и второй антигенсвязывающий фрагмент/домен (который содержит третью переменную область антитела и четвертую переменную область антитела (см. выше)), который связывается с одним или несколькими комплексами, образованными HLA-DQ2.5 и глютенным пептидом. В этом контексте предпочтительно по меньшей мере один глютенный пептид в комплексах, с которыми связывается первый антигенсвязывающий фрагмент/домен, отличается от по меньшей мере одного глютенного пептида в комплексах, с которыми связывается второй антигенсвязывающий фрагмент/домен. Иными словами, представители глютенных пептидов в комплексах, с которыми связывается первый антигенсвязывающий фрагмент/домен, и представители глютенных пептидов в комплексах, с которыми связывается второй антигенсвязывающий фрагмент/домен, могут перекрываться, но не быть полностью идентичными. Глютенные пептиды в комплексах, с которыми связывается первый/второй антигенсвязывающий фрагмент/домен, можно выбирать из указанных выше глютенных пептидов. Предпочтительно первый/второй антигенсвязывающий фрагмент/домен обладает способностью связываться с одним типом глютенного пептида или с двумя или большим количеством типов глютенных пептидов.

В контексте настоящего описания для простоты понятие «антитело» можно использовать вместо того, чтобы ссылаться также на «антигенсвязывающую молекулу». Однако специалисту в данной области должно быть очевидно, что при необходимости понятие «антитело» можно заменять на понятие «антигенсвязывающая молекула».

Один из объектов изобретения базируется, в частности, на связывании анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающей молекулы (антитела) с HLA-DQ2.5, который презентует глютенный пептид Т-клеткам. В конкретных вариантах

осуществления изобретения предложены антитела, которые связываются с HLA-DQ2.5.

Одним из объектов изобретения являются антигенсвязывающие молекулы или антитела, который обладают связывающей активностью с HLA-DQ2.5 или с
5 одним или несколькими комплексами, образованными HLA-DQ2.5 и глютенным пептидом. В конкретных вариантах осуществления изобретения анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающая молекула (антитело) обладает функциями/характеристиками, описанными ниже.

Анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающая молекула (антитело) обладает
10 связывающей активностью в отношении HLA-DQ2.5 в форме комплекса с глютенным пептидом (т.е. комплекса HLA-DQ2.5/глютенный пептид). Более предпочтительно анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающая молекула (антитело) обладает специфической связывающей активностью в отношении HLA-DQ2.5 в
15 форме комплекса с глютенным пептидом (т.е. комплекса HLA-DQ2.5/глютенный пептид).

Анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающая молекула (антитело) практически не обладает связывающей активностью в отношении не представляющего
интерес антигена, такого как HLA-DQ5.1/DQ6.3/DQ7.3/DQ7.5/DQ8/DR/DP, т.е. анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающая молекула (антитело) практически не
20 связывается с не представляющим интерес антигеном. Например, анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающая молекула (антитело) не обладает специфической связывающей активностью в отношении HLA-DR/DP или не обладает существенной связывающей активностью в отношении HLA-DR/DP. Это означает, что антитело не связывается специфически с HLA-DR/DP или
25 существенно не связывается с HLA-DR/DP. Аналогично этому, анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающая молекула (антитело) практически не обладает связывающей активностью в отношении молекулы HLA-DQ, такой как HLA-DQ7.5, HLA-DQ8, HLA-DQ5.1, HLA-DQ6.3 и HLA-DQ7.3, т.е. анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающая молекула (антитело) практически не связывается с
30 молекулой HLA-DQ, такой как HLA-DQ7.5, HLA-DQ8, HLA-DQ5.1, HLA-DQ6.3 и HLA-DQ7.3. Иными словами, анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающая молекула (антитело) не обладает специфической/существенной связывающей активностью в отношении молекулы HLA-DQ, такой как HLA-DQ7.5, HLA-DQ8, HLA-DQ5.1,

HLA-DQ6.3 и HLA-DQ7.3. Это означает, что анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающая молекула (антитело) не связывается специфически/существенно с молекулой HLA-DQ, такой как HLA-DQ7.5, HLA-DQ8, HLA-DQ5.1, HLA-DQ6.3 и HLA-DQ7.3.

5 Для предупреждения каких-либо существенных ингибирующих
воздействий на указанные не являющиеся мишенями молекулы МНС класса II и
улучшения фармакокинетики (ФК) антитела в организме пациентов с
10 глютеновой энтеропатией, которые имеют HLA-DQ2.5, указанные
характеристики («практически отсутствие связывающей активности») являются
предпочтительными.

Признак «практического отсутствия связывающей активности» можно
определять, например, используя представленные в настоящем описании
результаты FACS-анализа. Анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающая молекула
15 (антитело), у которой «практически отсутствует связывающая активность» в
отношении специфического антигена, может иметь величину MFI (средняя
интенсивность флуоресценции), составляющую 250% или менее,
предпочтительно 200% или менее, более предпочтительно 150% или менее от
величины MFI отрицательного контроля при осуществлении измерений в
указанных в настоящем описании условиях.

20 В одном из объектов изобретения касательно биспецифической
антигенсвязывающей молекулы (антитела) при осуществлении измерений в
указанных в настоящем описании условиях анти-HLA-DQ2.5
антигенсвязывающая молекула (антитело), у которой «практически отсутствует
связывающая активность» в отношении специфического антигена, имеет
25 величину MFI, которая составляет 2% или менее, более предпочтительно 1% или
менее, если принимать за 0% величину MFI для антитела IC17dK и за 100%
величину MFI для антитела DQN0139bb. Антитело DQN0139bb описано,
например, в WO 2018/155692.

30 Анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающая молекула (антитело) обладает
связывающей активностью в отношении молекулы HLA-DQ2.5, которая
находится в комплексе с глютеновым пептидом, указанным в настоящем
описании. В настоящем описании комплекс, образованный между молекулой
HLA-DQ2.5 и глютеновым пептидом, обозначают как «комплекс, образованный

HLA-DQ2.5 и глютенным пептидом», « комплекс HLA-DQ2.5/глютенный пептид» или «HLA-DQ2.5/глютенный пептид». Иными словами, его можно обозначать также, например, как «HLA-DQ2.5, загруженный глютенным пептидом, «глютенным пептидом загруженный HLA-DQ2.5», «HLA-DQ2.5, связанный с глютенным пептидом», «HLA-DQ2.5 в форме комплекса с глютенным пептидом» и «комплекс HLA-DQ2.5 и глютенного пептида».

Приведенная выше формулировка (например, «комплекс, образованный HLA-DQ2.5 и... [пептидом]») относится также к пептидам, таким как 33-мерный пептид глиаина, пептид альфа 1 глиаина (который можно обозначать также как «пептид альфа 1а глиаина»), пептид альфа 2 глиаина, пептид гамма 1 глиаина, пептид гамма 2 глиаина, пептид омега 1 глиаина, пептид омега 2 глиаина, пептид, ВС-гордеина, пептид альфа 3 глиаина, пептид альфа 1b глиаина, пептид гамма 4а глиаина, пептид гамма 4b глиаина, пептид авенина 1, пептид авенина 2, пептид авенина 3, пептид гордеина 1, пептид гордеина 2, пептид секалина 1, пептид секалина 2 и 26-мерный пептид глиаина, 14-мерный пептид 1, пептид CLIP (hCLIP), пептид вируса 1 гепатита В (HBV1), пептид *Salmonella*, пептид *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), пептид тиропероксидазы (ТРО) и т.д.

При этом, анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающая молекула (антитело) практически не обладает связывающей активностью в отношении «нерелевантного» пептида. В настоящем описании «нерелевантные» пептиды включают пептиды, для которых описано, что они могут презентироваться на HLA-DQ2.5, но не соответствуют глютенной энтеропатии или не соответствуют настоящему изобретению, т.е. которые не относятся к вышеуказанным представляющим интерес глютенным пептидам. Например, нерелевантные пептиды включают (но не ограничиваясь только ими) пептид CLIP (hCLIP), пептид вируса 1 гепатита В (HBV1), пептид *Salmonella*, пептид *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), пептид тиропероксидазы (ТРО) и т.д.

Для предупреждения каких-либо существенных ингибирующих воздействий на указанные не являющиеся мишенями молекулы МНС класса II и HLA-DQ2.5 в форме комплекса с нерелевантным пептидом, и улучшения ФК антитела в организме пациентов с глютенной энтеропатией, указанные

характеристики («практическое отсутствие связывающей активности») являются предпочтительными.

Признак «наличия связывающей активности» можно, определять, например, используя представленные в настоящем описании результаты FACS-анализа. Анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающая молекула (антитело), которая «обладает связывающей активностью» в отношении специфического антигена, может иметь величину MFI (средняя интенсивность флуоресценции), составляющую 300% или более, предпочтительно 500% или более, более предпочтительно 1000% или более от величины MFI отрицательного контроля при осуществлении измерений в указанных в настоящем описании условиях. В одном из объектов изобретения касательно биспецифической антигенсвязывающей молекулы (антитела), анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающая молекула (антитело), которая «обладает связывающей активностью» в отношении специфического антигена, имеет величину MFI, которая составляет 3% или более, более предпочтительно 6% или более, предпочтительно 10% или более, более предпочтительно 20% или более при принятии за 0% величины MFI для антитела IC17dK и за 100% величины MFI для антитела DQN0139bb, при осуществлении измерений в указанных в настоящем описании условиях.

Касательно, в частности, специфичности связывания, «связывающую активность» можно обозначать иными словами, как «специфическая связывающая активность».

Анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающие молекулы (антитела), предлагаемые в изобретении, имеют константу диссоциации (Kd), составляющую 5×10^{-7} М или менее, предпочтительно 4×10^{-7} М или менее, предпочтительно 3×10^{-7} М или менее, предпочтительно 2×10^{-7} М или менее, предпочтительно 1×10^{-7} М или менее, предпочтительно 9×10^{-8} М или менее, предпочтительно 8×10^{-8} М или менее, предпочтительно 7×10^{-8} М или менее, предпочтительно 6×10^{-8} М или менее, предпочтительно 5×10^{-8} М или менее, предпочтительно 4×10^{-8} М или менее, предпочтительно 3×10^{-8} М или менее, предпочтительно 2×10^{-8} М или менее, предпочтительно 1×10^{-8} М или менее, предпочтительно 9×10^{-9} М или менее, предпочтительно 8×10^{-9} М или менее, предпочтительно 7×10^{-9} М или менее, предпочтительно 6×10^{-9} М или менее, предпочтительно 5×10^{-9} М или

менее, предпочтительно 4×10^{-9} М или менее, предпочтительно 3×10^{-9} М или менее, предпочтительно 2×10^{-9} М или менее, характеризующую связывание с одним или несколькими указанными в настоящем описании комплексами, образованными HLA-DQ2.5 и глютеновым пептидом.

5 Соответствующая мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, предлагаемая в настоящем изобретении, содержит

(1) фрагмент/домен, содержащий переменную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении HLA-DQ2.5 в форме комплекса(ов) с глютеновым(и) пептидом(ами);

10 (2) фрагмент/домен, содержащий переменную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении HLA-DQ2.5 в форме комплекса(ов) с глютеновым(и) пептидом(ами); и

(3) фрагмент/домен, содержащий Fc-область с пониженной связывающей активностью в отношении Fc-гамма рецептора, указанного выше, без
15 ограничения их структуры.

Согласно настоящему изобретению каждый из вышеуказанных доменов может быть непосредственно соединен пептидными связями. Например, при применении $F(ab')_2$ в качестве домена, содержащего переменную область антитела, указанного в подпунктах (1) и (2), и этих Fc-областей в качестве
20 домена, содержащего Fc-область с пониженной связывающей активностью в отношении Fc-гамма рецептора, указанного в подпункте (3), полипептиды, образовавшиеся в результате соединения доменов, содержащих переменные области антитела, указанные в подпунктах (1) и (2), домена, содержащего Fc-область, указанного в подпункте (3), с помощью пептидных связей, могут
25 образовывать структуру антитела. Указанные антитела можно получать путем очистки из вышеописанной культуральной среды гибридом, а также путем очистки антител из культуральной среды требуемых клеток-хозяев, которые стабильно содержат полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, образующие антитело.

30 Примеры предпочтительной переменной области N-цепей антител, предлагаемых в настоящем изобретении, содержащихся в переменной области антитела, обладающего связывающей активностью в отношении HLA-DQ2.5 в форме комплекса(ов) с глютеновым(и) пептидом(ами), включают любые

вариабельные области Н-цепей антитела, указанные в настоящем описании, или
вариабельные области Н-цепей антитела, которые имеют последовательности
CDR, в которых аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3
являются такими же, что и аминокислотные последовательности CDR1, CDR2, и
5 CDR3, входящие в вариабельные области Н-цепей, указанных в настоящем
описании, или вариабельные области Н-цепей антитела, функционально
эквивалентные вышеуказанным вариабельным областям.

Примеры предпочтительной вариабельной области Н-цепей антител,
обладающих связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного
10 рецептора, предлагаемых в настоящем изобретении, включают вариабельные
области антитела, обладающие связывающей активностью в отношении HLA-
DQ2.5 в форме комплекса(ов) с глютенным(и) пептидом(ами). Примеры
вариабельной области Н-цепи антитела, содержащейся в указанных
вариабельных областях антитела, включают вариабельные области Н-цепей
15 антитела, указанные в настоящем описании, или вариабельные области Н-цепей
антитела, которые имеют последовательности CDR, в которых аминокислотные
последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 являются такими же, что и
аминокислотные последовательности CDR1, CDR2, и CDR3, входящие в
вариабельные области Н-цепей, указанных в настоящем описании, или
20 вариабельные области Н-цепей антитела, функционально эквивалентные
вышеуказанным вариабельным областям.

В настоящем изобретении фраза «функционально эквивалентные» означает,
что аффинности связывания с антигеном являются эквивалентными или,
альтернативно этому, означает, что нейтрализующие активности в отношении
25 клеток, экспрессирующих HLA-DQ2.5/глютеновый пептид (или тканей,
содержащих такие клетки) являются эквивалентными при их применении для
мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы. Аффинность связывания
и нейтрализующую активность можно оценивать количественно с помощью
методов, представленных в настоящем описании. Желательно, чтобы клетки,
30 применяемые для измерения активности, экспрессировали HLA-
DQ2.5/глютеновый пептид (или желательно, чтобы ткани экспрессировали
указанные клетки), и можно применять любые пригодные линии клеток.
Касательно константных областей антитела это фраза может означать, что

указанные снижения связывающей активности в отношении Fc-гамма рецептора являются эквивалентными.

Например, фраза «вариабельная область Н-цепи антитела эквивалентна вариабельной области Н-цепи антитела, указанной в настоящем описании (т.е. исходной вариабельной области Н-цепи)» означает, что эта область имеет такую же аффинность связывания при ее объединении с вариабельной областью L-цепи антитела, указанной в настоящем описании, которая образует пару с исходной Н-цепью, или, альтернативно этому, означает, что область обладает такой же нейтрализующей активностью в отношении клеток, экспрессирующих HLA-DQ2.5/глутеновый пептид (или ткани, содержащей такие клетки), при применении для мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы. Кроме того, фраза «вариабельная область L-цепи антитела эквивалентна вариабельной области L-цепи антитела, указанной в настоящем описании (т.е. исходной вариабельной области L-цепи)» означает, что эта область имеет такую же аффинность связывания при ее объединении с вариабельной областью Н-цепи антитела, указанной в настоящем описании, которая образует пару с исходной L-цепью, или, альтернативно этому, означает, что область обладает такой же нейтрализующей активностью в отношении клеток, экспрессирующих HLA-DQ2.5/глутеновый пептид (или ткани, содержащей такие клетки), при применении для мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы.

Понятие «эквивалентный» не обязательно подразумевает наличие такого же уровня активности, и активность может быть повышенной. В частности, антигенсвязывающая аффинность, включает, например, случай, в котором коэффициент (величина KD/величина KD родительского антитела), полученный путем сравнения с аффинностью связывания вариабельной области антитела, которая служит в качестве контроля (величина KD родительского антитела) составляет 1,5 или менее. Коэффициент величина KD/величина KD родительского антитела предпочтительно составляет 1,3 или менее, более предпочтительно 1,2 или менее, 1,1 или менее, 1,0 или менее, 0,9 или менее, 0,8 или менее, 0,7 или менее, 0,6 или менее, или 0,5 или менее. При этом не существует нижнего предела, примеры включают коэффициенты, составляющие 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} или 10^{-6} . Более конкретно, согласно настоящему изобретению коэффициент величина KD/величина KD родительского антитела

предпочтительно составляет от 10^{-6} до $1,5 \times 10^{-0}$, более предпочтительно от 10^{-6} до 10^{-1} , еще более предпочтительно от 10^{-6} до 10^{-2} и еще более предпочтительно от 10^{-6} до 10^{-3} .

Касательно фрагмента/домена, который содержит переменную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении комплекса HLA-DQ2.5/глютенный пептид, величина KD, характеризующая связывание с комплексом HLA-DQ2.5/глютенный пептид, может составлять, например, 2×10^{-8} М или менее, 1×10^{-8} М или менее, 9×10^{-9} М или менее, 8×10^{-9} М или менее, 7×10^{-9} М или менее, 6×10^{-9} М или менее, 5×10^{-9} М или менее, 4×10^{-9} М или менее, 3×10^{-9} М или менее, 2×10^{-9} М или менее или 1×10^{-9} М или менее.

В настоящем изобретении переменные области антитела, которые являются «функционально эквивалентными», не ограничены конкретными областями, если они представляют собой переменные области Н-цепи и/или L-цепи антитела, которые удовлетворяют вышеуказанным требованиям. Примеры таких переменных областей антитела включают области, полученные путем интродукции замены, делеции, добавления и/или инсерции одной или нескольких аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 10 аминокислот) в аминокислотные последовательности переменных областей, которые представлены выше в таблицах 1-3. Хорошо известный специалистам в данной области метод интродукции одной или нескольких аминокислотных замен, делеций, добавлений и/или инсерций в аминокислотную последовательность представляет собой метод интродукции мутаций в белки. Например, специалисты в данной области могут получать переменные области, которые являются функциональными эквивалентами переменных областей антитела, обладающих указанными выше функциями, путем интродукции соответствующих мутаций в аминокислотные последовательности с использованием таких методов как сайтнаправленный мутагенез (Hashimoto-Gotoh T., Mizuno T., Ogasahara Y. и Nakagawa M., An oligodeoxyribonucleotide-directed dual amber method for site-directed mutagenesis. Gene 152, 1995, сс. 271-275; Zoller M.J. и Smith M., Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors. Methods Enzymol. 100, 1983, сс. 468-500; Kramer W. Drutsa V., Jansen H.W., Kramer B., Pflugfelder M. и Fritz H.J., The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction.

Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456; Kramer W. и Fritz, H.J., Oligonucleotide-directed construction of mutations *via* gapped duplex DNA Methods. Enzymol. 154, 1987, сс. 350-367; и Kunkel T.A., Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. Proc Natl Acad. Sci. U S A. 82, 1985, сс. 488-492).

5 Когда аминокислотный остаток изменяют, аминокислоту предпочтительно заменяют в результате мутации на другую(ие) аминокислоту(ы), сохраняющую(ие) характеристики боковых цепей аминокислот, указанные выше. Примерами аминокислот с такими характеристиками боковых цепей являются: гидрофобные аминокислоты (A, I, L, M, F, P, W, Y и V), гидрофильные
10 аминокислоты (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S и T), аминокислоты, содержащие алифатические боковые цепи (G, A, V, L, I и P), аминокислоты с содержащими гидроксильную группу боковыми цепями (S, T и Y), аминокислоты с содержащими атом серы боковыми цепями (C и M), аминокислоты с содержащими карбоновую кислоту и амид боковыми цепями (D, N, E и Q),
15 аминокислоты с основными боковыми цепями (R, K и H) и аминокислоты с ароматическими боковыми цепями (H, F, Y и W) (в скобках представлены обозначения аминокислот в соответствии с однобуквенным кодом).
Аминокислотные замены внутри каждой из указанных групп обозначают как консервативные замены. Хорошо известно, что полипептид, содержащий
20 модифицированную аминокислотную последовательность, в которой один или несколько аминокислотных остатков в указанной аминокислотной последовательности подвергнут делеции, добавлен и/или заменен на другие аминокислоты, может сохранять исходную биологическую активность (Mark D. F. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1984, сс. 5662-5666; Zoller M. J. и Smith M., Nucleic Acids Res. 10, 1982, сс. 6487-6500; Wang A. и др., Science 224, 1984, сс. 1431-1433; Dalbadie-McFarland G. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 79, 1982, сс. 6409-6413). Вариабельные области, предлагаемые в настоящем изобретении, содержащие указанные аминокислотные модификации, имеют аминокислотные
25 последовательности, которые идентичны по меньшей мере на 70%, более предпочтительно по меньшей мере на 75%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 85%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 95% аминокислотным
30 последовательностям CDR-последовательностей, FR-последовательностей

вариабельной области или полных вариабельных областей до модификации. В контексте настоящего описания идентичность последовательностей определяют в виде процента остатков, идентичных остаткам в исходной аминокислотной последовательности вариабельной области Н-цепи или вариабельной области L-цепи, определенного после выравнивания последовательностей и интродукции соответствующих брешей для увеличения до максимума при необходимости идентичности последовательностей. Идентичность аминокислотных последовательностей можно определять с помощью описанного ниже метода.

Кроме того, «функционально эквивалентную вариабельную область антитела» можно получать, например, из нуклеиновых кислот, которые гибридизуются в строгих условиях с нуклеиновыми кислотами, которые содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность вариабельной области, указанной выше в таблицах 1-3. Строгие условия гибридизации, применяемые для выделения нуклеиновой кислоты, которая гибридизуется в строгих условиях с нуклеиновой кислотой, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность вариабельной области, включают, например, следующие условия: 6М мочевины, 0,4% ДСН, 0,5× SSC и 37°C или условия гибридизации в значительной степени эквивалентные указанным выше.

Выделение нуклеиновых кислот с намного более высокой гомологией можно ожидать при применении более строгих условий, например, следующих условий: 6М мочевины, 0,4% ДСН, 0,1× SSC и 42°C. Условия промывки после гибридизации представляют собой, например, промывку с использованием 0,5× SSC (1×SSC представляет собой 0,15М NaCl и 0,015М цитрат натрия, pH 7,0) и 0,1% ДСН при 60°C, более предпочтительно промывку с использованием 0,2× SSC и 0,1% ДСН при 60°C, еще более предпочтительно промывку с использованием 0,2× SSC и 0,1% ДСН при 62°C, еще более предпочтительно промывку с использованием 0,2× SSC и 0,1% ДСН при 65°C и еще более предпочтительно промывку с использованием 0,1× SSC и 0,1% ДСН при 65°C, как указано выше. Последовательности выделенных нуклеиновых кислот можно определять известными методами, которые описаны ниже. Общая гомология нуклеотидной последовательности выделенной нуклеиновой кислоты составляет по меньшей мере 50% или выше, предпочтительно 70% или выше и наиболее

предпочтительно 90% или выше (например, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или выше) при оценке степени идентичности последовательностей.

5 Нуклеиновые кислоты, которые гибридизуются в строгих условиях с нуклеиновой кислотой, содержащей нуклеотидную последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность вариабельной области, можно
10 выделять также, применяя вместо описанных выше методов на основе гибридизации, методы амплификации генов, такие как полимеразная цепная реакция (ПЦР), в которой используют праймеры, синтезированные на основе информации о нуклеотидной последовательности, которая кодирует
10 аминокислотную последовательность вариабельной области.

Идентичность одной нуклеотидной последовательности или
аминокислотной последовательности другой последовательности можно
определять с помощью алгоритма BLAST, описанного выше у Karlin и Altschul
(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1993, сс. 5873-5877). На основе этого алгоритма
15 разработаны программы BLASTN и BLASTX (Altschul и др., J. Mol. Biol. 215, 1990, сс. 403-410). Для анализа нуклеотидных последовательностей согласно BLASTN на основе BLAST устанавливают параметры, такие, например, как балл = 100 и длина слова = 12. С другой стороны, параметры, применяемые для
20 анализа аминокислотных последовательностей с помощью BLASTX на основе BLAST, включают, например, балл = 50 и длина слова = 3. Задаваемые по умолчанию параметры применяют для каждой программы, когда используют программы BLAST и Gapped BLAST. В данной области известны конкретные методики указанных анализов (см. веб-сайт National Center for Biotechnology Information (NCBI), Basic Local Alignment Search Tool (BLAST);
25 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Fc-область, содержащаяся в мультиспецифической антигенсвязывающей молекуле, предлагаемой в настоящем изобретении, не ограничена конкретной областью, если она представляет собой Fc-область с пониженной связывающей активностью в отношении Fc-гамма рецептора, примеры предпочтительной Fc-
30 области, предлагаемой в настоящем изобретении, включают комбинации участков Fc-области, представленные в настоящем описании.

Примеры предпочтительной мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в настоящем изобретении, включают биспецифические

антитела, содержащие первую вариабельную область антитела, которая обладает связывающей активностью в отношении HLA-DQ2.5 в форме комплекса(ов) с глютеиновым(и) пептидом(ами), и вторую вариабельную область антитела, которая обладает связывающей активностью в отношении HLA-DQ2.5 в форме комплекса(ов) с глютеиновым(и) пептидом(ами). Примеры указанных биспецифических антител включают биспецифические антитела, содержащие H- и L-цепи, представленные в настоящем описании, и биспецифические антитела, которые связываются с эпитопом, перекрывающимся с эпитопом, с которым связываются указанные выше антитела, и которые содержат Fc-область с пониженной связывающей активностью в отношении Fc-гамма рецептора.

Распознает ли антитело эпитоп, который перекрывается с эпитопом, распознаваемым другим антителом, можно определять на основе конкуренции между двумя антителами за эпитоп. Конкуренцию между антителами можно оценивать с помощью анализов связывания в условиях конкуренции, таких как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), метод на основе флуоресцентного резонансного переноса энергии (FRET) и метод на основе технологии флуорометрического микрообъемного анализа (FMAT®). Количество антитела, связанного с антигеном, косвенно коррелирует со связывающей способностью конкурирующего антитела-кандидата (тестируемое антитело), которое конкурентно связывается с перекрывающимся эпитопом. Другими словами, если количество или аффинность тестируемого антитела к перекрывающемуся эпитопу возрастает, то количество антитела, связанного с антигеном, снижается, а количество антигена, связанного тестируемым антителом, возрастает. В частности, соответствующим образом меченое антитело и антитело, подлежащее изучению, добавляют одновременно к антигену, и антитело, которое в результате связывается, обнаруживают с помощью метки. Количество связанного с антигеном антитела легко можно определять с помощью предварительно меченого антитела. Указанная метка не ограничена конкретной меткой, и метод мечения выбирают в зависимости от применяемой методики анализа. В частности, метод мечения включает введение флуоресцентной метки, радиоактивной метки, ферментной метки и т.п.

Например, флуоресцентно меченое антитело и немеченое антитело или тестируемое антитело одновременно добавляют к гранулам, на которых

иммобилизован комплекс HLA-DQ2.5/глютеновый пептид, и меченое антитело выявляют с помощью технологии флуорометрического микрообъемного анализа.

В контексте настоящего описания «антитело, которое связывается с перекрывающимся эпитопом» означает тестируемое антитело, которое может
5 снижать количество связанного меченого антитела по меньшей мере на 50% в концентрации, которая, как правило, выше в 100 раз, предпочтительно выше в 80 раз, более предпочтительно выше в 50 раз, еще более предпочтительно выше в 30 раз и еще более предпочтительно в 10 раз выше концентрации, в которой немеченое антитело снижает на 50% количество связанного меченого антитела
10 (IC₅₀).

Мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые имеют антигенсвязывающие центры антитела, связывающиеся с эпитопами, которые перекрываются с эпитопами, связываемыми вышеуказанными антителами, могут обладать очень высокой связывающей активностью или нейтрализующей
15 активностью.

Мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, предлагаемые в настоящем изобретении, получают с помощью такой же технологии, которая указана в настоящем описании в качестве метода получения рекомбинантных антител.

В конкретных вариантах осуществления изобретения любую(ые) одну или несколько аминокислот в анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающей молекуле (антителе), представленной выше, заменяют в любых константных и/или
20 переменных областях или доменах тяжелой цепи и/или легкой цепи.

В конкретных вариантах осуществления изобретения замены представляют собой консервативные замены, указанные в настоящем описании.
25

Человеческие антитела

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, указанное в настоящем описании, представляет собой человеческое антитело. Человеческие антитела можно получать, используя различные методики, известные в данной
30 области. Человеческие антитела описаны в целом у van Dijk и van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5, 2001, сс. 368-374 и Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20, 2008, сс. 450-459.

Человеческие антитела можно получать путем введения иммуногена трансгенному животному, модифицированному таким образом, чтобы оно продуцировало интактные человеческие антитела или интактные антитела с человеческими переменными областями в ответ на контрольное заражение антигеном. Указанные животные, как правило, содержат все или часть локусов человеческого иммуноглобулина вместо эндогенных иммуноглобулиновых локусов, которые либо присутствуют вне хромосом, либо интегрированы произвольно в хромосомы животного. У таких трансгенных мышей эндогенные иммуноглобулиновые локусы, как правило, инактивированы. Обзор методов получения человеческих антител в трансгенных животных см. у Lonberg, Nat. Biotech. 23, 2005, сс. 1117-1125 (см., например, также в патентах США №№ 6075181 и п6150584 описание технологии XENOMOUSETM; в патенте США № 5770429 описание технологии HUMAB®; в патенте США № 7041870 описание технологии К-М MOUSE® и в публикации заявки на патент США 2007/0061900 описание технологии VELOCIMOUSE®). Человеческие переменные области из интактных антител, полученных с помощью указанных животных, можно дополнительно модифицировать, например, путем объединения с другой человеческой константной областью.

Человеческие антитела можно создавать также с помощью методов на основе гибридом. Описаны клеточные линии человеческой миеломы и мышинной-человеческой гетеромиеломы, предназначенные для получения человеческих моноклональных антител (см., например, Kozbor, J. Immunol. 133, 1984, сс. 3001-3005; Brodeur и др., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, изд-во Marcel Dekker, Inc., New York, 1987, сс. 51-63 и Boerner и др., J. Immunol. 147, 1991, сс. 86-95). Человеческие антитела, созданные с использованием технологии на основе человеческих В-клеточных гибридом, описаны также у Li и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 2006, сс. 3557-3562. Дополнительные методы включают методы, описанные, например, в патенте США №7189826 (описание получения моноклональных человеческих антител IgM-типа из клеточных линий гибридом), и у Ni, Xiandai Mianyixue 26, 2006, сс. 265-268 (описание человеческих-человеческих гибридом). Технология человеческих гибридом (технология Trioma) описана также у Vollmers и Brandlein, Histology and Histopathology 20, 2005, сс. 927-937 и Vollmers и

Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology 27, 2005, сс. 185-191.

Человеческие антитела можно создавать также путем выделения последовательностей переменных доменов Fv-клонов, отобранных из фаговых дисплейных библиотек, для создания которых использовали человеческие антитела. Указанные последовательности переменных доменов затем можно объединять с требуемым человеческим константным доменом. Методики отбора человеческих антител из библиотек антител описаны ниже.

Химерные и гуманизированные антитела

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, указанное в настоящем описании, представляет собой химерное антитело. Некоторые химерные антитела описаны, например, в патенте США № 4816567; и у Morrison и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1984, сс. 6851-6855. В одном из примеров химерное антитело содержит нечеловеческую переменную область (например, переменную область из антитела мышей, крыс, хомяков, кроликов или приматов кроме человека, таких как обезьяны) и человеческую константную область. В другом примере химерное антитело представляет собой антитело «переключенного класса», класс или подкласс которого был изменен относительно родительского антитела. Химерные антитела включают их антигенсвязывающие фрагменты.

В некоторых вариантах осуществления изобретения химерное антитело представляет собой гуманизированное антитело. Как правило, нечеловеческое антитело гуманизируют для снижения иммуногенности для людей, сохраняя при этом специфичность и аффинность родительского нечеловеческого антитела. Как правило, гуманизированное антитело содержит один или несколько переменных доменов, в которых HVR, например, CDR (или их участки), имеют происхождение из нечеловеческого антитела, а FR (или их участки) имеют происхождение из последовательностей человеческого антитела. Гуманизированное антитело необязательно может содержать также по меньшей мере часть человеческой константной области. В некоторых вариантах осуществления изобретения некоторые остатки FR в гуманизированном антителе заменены на соответствующие остатки из нечеловеческого антитела (например,

антитела, из которого имеют происхождение остатки HVR), например, для сохранения или улучшения специфичности или аффинности антитела.

Сведения о гуманизированных антителах и методах их создания обобщены, например, у Almagro и Fransson, *Front. Biosci.* 13, 2008, сс. 1619-1633, и описаны также у Riechmann и др., *Nature* 332, 1988, сс. 323-329; Queen и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1989, сс. 10029-10033; US №№ 5821337, 7527791, 6982321 и 7087409; Kashmiri и др., *Methods* 36, 2005, сс. 25-34 (описание трансплантации SDR (a-CDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28, 1991, сс. 489-498 (описание «нанесения нового покрытия»); Dall'Acqua и др., *Methods* 36, 2005, сс. 43-60 (описание «перестановки FR»); и Osbourn и др., *Methods* 36, 2005, сс. 61-68 и Klimka и др., *Br. J. Cancer* 83, 2000, сс. 252-260 (описание подхода «направленной селекции» для перестановки FR).

Человеческие каркасные участки, которые можно применять для гуманизации, включают (но не ограничиваясь только ими): каркасные участки, выбранные с использованием методов «наилучшего подбора» (см., например, Sims и др., *J. Immunol.* 151, 1993, сс. 2296-2308; каркасные участки, имеющие происхождение из консенсусной последовательности конкретной подгруппы переменных областей легких и тяжелых цепей человеческих антител (см., например, Carter и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1992, сс. 4285-4289 и Presta и др., *J. Immunol.* 151, 1993, сс. 2623-2632); человеческие зрелые (с соматическими мутациями) каркасные области или каркасные области человеческой зародышевой линии (см., например, Almagro и Fransson, *Front. Biosci.* 13, 2008, с. 1619-1633); и каркасные участки, полученные в результате скрининга FR-библиотек (см., например, Vasa и др., *J. Biol. Chem.* 272, 1997, сс. 10678-10684 и Rosok и др., *J. Biol. Chem.* 271, 1996, сс. 22611-22618).

В любом из указанных выше вариантов осуществления изобретения анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающая молекула (антитело) является гуманизированной. В одном из вариантов осуществления изобретения анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающ молекула (антитело) содержит HVR, указанные в любом из указанных выше вариантов осуществления изобретения, и дополнительно содержит акцепторный человеческий каркасный участок, например, каркасный участок человеческого иммуноглобулина или человеческий консенсусный каркасный участок. В другом варианте

осуществления изобретения анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающая молекула (антитело) содержит HVR, указанные в любом из указанных выше вариантов осуществления изобретения, и дополнительно содержит последовательность FR1, FR2, FR3 или FR4, представленную в настоящем описании. В настоящем описании «человеческий каркасный участок» можно обозначать также как «гуманизированный каркасный участок» с учетом того факта, что антитело является гуманизированным.

В некоторых вариантах осуществления изобретения мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, предлагаемая в изобретении, содержит:

(I) первый антигенсвязывающий фрагмент, который обладает связывающей активностью в отношении HLA-DQ2.5 в форме комплекса с глютенным пептидом; и

(II) а второй антигенсвязывающий фрагмент, который обладает связывающей активностью в отношении HLA-DQ2.5 в форме комплекса с глютенным пептидом;

где антигенсвязывающая молекула связывается с двумя или большим количеством комплексов HLA-DQ2.5 и глютенных пептидов,

где по меньшей мере один из глютенных пептидов в комплексах, с которыми связывается первый антигенсвязывающий фрагмент, отличается по меньшей мере от одного из глютенных пептидов в комплексах, с которыми связывается второй антигенсвязывающий фрагмент; и

где антигенсвязывающая молекула практически не обладает связывающей активностью в отношении любой из HLA-DQ2.5-позитивной В-клетки РВМС и Ва/Ф3-клетки, которая экспрессирует HLA-DQ2.5 или HLA-DQ2.2, или обоих типов клеток, и

где антигенсвязывающая молекула является гуманизированной, и

где одна или несколько аминокислот в константной и/или переменной области тяжелой цепи и/или легкой цепи в первом антигенсвязывающем фрагменте и/или втором антигенсвязывающем фрагменте в мультиспецифической антигенсвязывающей молекуле изменены(ы).

В некоторых вариантах осуществления изобретения в мультиспецифической антигенсвязывающей молекуле одна или несколько аминокислот в константной и/или переменной области тяжелой цепи и/или

легкой цепи в первом антигенсвязывающей фрагменте и/или втором антигенсвязывающем фрагменте в мультиспецифической антигенсвязывающей молекуле заменена(ы).

В некоторых вариантах осуществления изобретения мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену в вариабельной области тяжелой цепи; по меньшей мере одну аминокислотную замену в константной области тяжелой цепи; по меньшей мере одну аминокислотную замену в вариабельной области легкой цепи; и по меньшей мере одну аминокислотную замену в константной области легкой цепи.

В некоторых вариантах осуществления изобретения глютенный пептид представляет собой иммунодоминантный пептид, связанный с глютенной энтеропатией.

В некоторых вариантах осуществления изобретения глютенный пептид выбирают из группы, которая состоит из: 33-мерного пептида глиадина, пептида альфа 1 глиадина, пептида альфа 2 глиадина, пептида гамма 1 глиадина, пептида гамма 2 глиадина, пептида омега 1 глиадина, пептида омега 2 глиадина, пептида ВС-гордеина, пептида альфа 3 глиадина, пептида альфа 1b глиадина, пептида гамма 4a глиадина, пептида гамма 4b глиадина, пептида авенина 1, пептида авенина 2, пептида авенина 3, пептида гордеина 1, пептида гордеина 2, пептида секалина 1, пептида секалина 2 и 26-мерного пептида глиадина.

В некоторых вариантах осуществления изобретения глютенный(ые) пептид(ы) представляет(ют) собой один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или все пептиды из: 33-мерного пептида глиадина, пептида альфа 1 глиадина, пептида альфа 2 глиадина, пептида гамма 1 глиадина, пептида гамма 2 глиадина, пептида омега 1 глиадина, пептида омега 2 глиадина, пептида ВС-гордеина, пептида альфа 3 глиадина, пептида альфа 1b глиадина, пептида гамма 4a глиадина, пептида гамма 4b глиадина, пептида авенина 1, пептида авенина 2, пептида авенина 3, пептида гордеина 1, пептида гордеина 2, пептида секалина 1, пептида секалина 2 и 26-мерного пептида глиадина.

В некоторых вариантах осуществления изобретения глютенный пептид выбирают из группы, которая состоит из: 33-мерного пептида глиадина, пептида

альфа 1 глиаина, пептида альфа 2 глиаина, пептида гамма 1 глиаина, пептида
омега 1 глиаина, пептида омега 2 глиаина, пептида ВС-гордеина, пептида
альфа 3 глиаина, пептида альфа 1b глиаина, пептида гамма 4a глиаина,
пептида гамма 4b глиаина, пептида авенина 1, пептида авенина 2, пептида
5 авенина 3, пептида гордеина 1, пептида гордеина 2, пептида секалина 1, пептида
секалина 2 и 26-мерного пептида глиаина.

В некоторых вариантах осуществления изобретения глютеный(ые)
пептид(ы) представляет(ют) собой один, два, три, четыре, пять, шесть, семь,
восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, 13, 14, 15, 16, 17, 18 или все
10 пептиды из: 33-мерного пептида глиаина, пептида альфа 1 глиаина, пептида
альфа 2 глиаина, пептида гамма 1 глиаина, пептида омега 1 глиаина, пептида
омега 2 глиаина, пептида ВС-гордеина, пептида альфа 3 глиаина, пептида
альфа 1b глиаина, пептида гамма 4a глиаина, пептида гамма 4b глиаина,
пептида авенина 1, пептида авенина 2, пептида авенина 3, пептида гордеина 1,
15 пептида гордеина 2, пептида секалина 1, пептида секалина 2 и 26-мерного
пептида глиаина.

В некоторых вариантах осуществления изобретения мультиспецифическая
антигенсвязывающая молекула практически не обладает связывающей
активностью в отношении самого глютенного пептида или самих глютенных
20 пептидов. В этом контексте понятия «самого» или «самых» относится к
ситуации, в которой глютеный(ые) пептид(ы) не находится(ются) в форме
комплекса с HLA-DQ2.5.

В некоторых вариантах осуществления изобретения мультиспецифическая
антигенсвязывающая молекула практически не обладает связывающей
25 активностью в отношении HLA-DQ2.5 в форме комплекса с нерелевантным
пептидом, где нерелевантный пептид представляет собой по меньшей мере один
пептид, выбранный из группы, которая состоит из: CLIP-пептида, пептида
вируса гепатита В 1, пептида *Salmonella*, пептида *Mycobacterium bovis* и пептида
тиропероксидазы.

30 В некоторых вариантах осуществления изобретения мультиспецифическая
антигенсвязывающая молекула практически не обладает связывающей
активностью в отношении HLA-DQ2.5 в форме комплекса с нерелевантными
пептидами, где нерелевантные пептиды представляют собой все следующие

пептиды: CLIP (hCLIP)-пептид, пептид вируса гепатита В 1, пептид *Salmonella* пептид, пептид *Mycobacterium bovis* и пептид тиропероксидазы.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающая молекула обладает повышенной связывающей активностью в отношении
5 комплекса, образованного HLA-DQ2.5 и глютеиновым пептидом, по сравнению с активностью до указанных гуманизации и изменения. В этом контексте «повышенная связывающая активность» означает, что антигенсвязывающая молекула связывается с комплексом, образованным HLA-DQ2.5 и глютеиновым пептидом, сильнее по сравнению со связыванием антитела до модификаций, т.е.
10 гуманизации и изменения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающая молекула обладает повышенной перекрестной реактивностью в отношении глютеиновых пептидов по сравнению с реактивностью до указанных гуманизации и изменения. В некоторых вариантах осуществления изобретения глютеиновые
15 пептиды представляют собой пептид омега 2 глиаина, пептид ВС-гордеина, пептид гамма 1 глиаина, пептид гамма 2 глиаина, пептид гамма 4а глиаина и пептид гамма 4d глиаина. В этом контексте понятие «повышенная перекрестная реактивность в отношении глютеиновых пептидов» означает, что антигенсвязывающая молекула связывается или обладает нейтрализующей
20 активностью в отношении большего количества глютеиновых пептидов по сравнению с антителом до модификаций, т.е. гуманизации и изменения.

В другом объекте изобретения анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающая молекула (антитело) содержит последовательность вариабельного домена тяжелой цепи (VH), которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%,
25 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности вариабельного домена тяжелой цепи (VH), указанной в настоящем описании. В конкретных вариантах осуществления изобретения VH-последовательность, идентичная по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, содержит замены (например, консервативные замены), инсерции или
30 делеции относительно референс- (т.е. исходной) последовательности, но анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающая молекула (антитело), которая содержит указанную последовательность, сохраняет способность связываться с HLA-DQ2.5. В конкретных вариантах осуществления изобретения в целом от 1 до 10

аминокислот заменено, встроено и/или удалено путем делеции относительно референс (т.е. исходной) последовательности. В конкретных вариантах осуществления изобретения замены, инсерции или делеции осуществляют в областях вне HVR (т.е. в FR). Необязательно анти-HLA-DQ2.5

5 антигенсвязывающая молекула (антитело) содержит VH-последовательность, указанную в настоящем описании, или последовательность, содержащую пост-трансляционную модификацию. В конкретном варианте осуществления изобретения VH содержит один, два или три HVR, выбранных из: (а) HVR-H1, указанного в настоящем описании, (б) HVR-H2 указанного в настоящем
10 описании, и (в) HVR-H3 указанного в настоящем описании. Пост-трансляционные модификации включают (но не ограничиваясь только ими) модификацию, полученную путем пироглутамилирования глутамина или глутамата в N-концевой области тяжелой цепи или легкой цепи в пироглутамовую кислоту.

15 Аминокислоты, содержащиеся в аминокислотных последовательностях, предлагаемых в настоящем изобретении, могут быть подвергнуты пост-трансляционной модификации (например, модификации N-концевого глутамина в пироглутамовую кислоту путем пироглутамилирования, хорошо известного специалистам в данной области). Естественно, указанные подвергнутые пост-
20 трансляционной модификации аминокислоты включены в аминокислотные последовательности, предлагаемые в настоящем изобретении.

В другом объекте изобретения анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающая молекула (антитело) содержит последовательность вариабельного домена легкой цепи (VL), которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%,
25 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности вариабельного домена легкой цепи (VL), указанной в настоящем описании. В конкретных вариантах осуществления изобретения VL-последовательность, идентичная по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, содержит замены (например, консервативные замены), инсерции или
30 делеции относительно референс- (т.е. исходной) последовательности, но анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающая молекула (антитело), которая содержит указанную последовательность, сохраняет способность связываться с HLA-DQ2.5. В конкретных вариантах осуществления изобретения в целом от 1 до 10

аминокислот заменено, встроено и/или удалено путем делеции относительно референс (т.е. исходной) последовательности. В конкретных вариантах осуществления изобретения замены, инсерции или делеции осуществляют в областях вне HVR (т.е. в FR). Необязательно анти-HLA-DQ2.5

5 антигенсвязывающая молекула (антитело) содержит VL-последовательность, указанную в настоящем описании, или последовательность, содержащую пост-трансляционную модификацию. В конкретном варианте осуществления изобретения VL содержит один, два или три HVR, выбранных из: (а) HVR-L1, указанного в настоящем описании, (б) HVR-L2 указанного в настоящем
10 описании, и (в) HVR-L3 указанного в настоящем описании. Пост-трансляционные модификации включают (но не ограничиваясь только ими) модификацию, полученную путем пироглутамилирования глутамина или глутамата в N-концевой области тяжелой цепи или легкой цепи в пироглутамовую кислоту.

15 Другим объектом изобретения является анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающая молекула (антитело), где молекула/антитело содержит VH, указанную в любом из представленных выше вариантов осуществления изобретения, и VL, указанную в любом из представленных выше вариантов осуществления изобретения. В одном из вариантов осуществления изобретения
20 молекула/антитело содержит VH-последовательность, указанную в настоящем описании, или последовательность, содержащую пост-трансляционные модификации, и VL-последовательность, указанную в настоящем описании, или последовательность, содержащую пост-трансляционные модификации. Пост-трансляционные модификации включают (но не ограничиваясь только ими)
25 модификацию, полученную путем пироглутамилирования глутамина или глутамата в N-концевой области тяжелой цепи или легкой цепи в пироглутамовую кислоту.

Следующим объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула (антитело), которая связывается с тем же эпитопом, что и анти-HLA-DQ2.5
30 антигенсвязывающая молекула (антитело), представленная в настоящем описании. Например, конкретными вариантами осуществления изобретения является молекула/антитело, которая/которое связывается с тем же эпитопом, что и любые молекулы/антитела, представленные в настоящем описании.

Конкретными вариантами осуществления изобретения является молекула/антитело, которая/которое связывается с эпитопом внутри фрагмента HLA-DQ2.5, состоящим примерно из 8-17 аминокислот, или внутри комплекса, образованного HLA-DQ2.5 и глютеиновым пептидом. В этом контексте
5 глютеиновый пептид может представлять собой любой из глютеиновых пептидов, представленных в настоящем описании.

Следующим объектом изобретения является антигенсвязывающая молекула (антитело), которая конкурирует с другой антигенсвязывающей молекулой (антителом) за связывание с HLA-DQ2.5 или комплексом, образованным HLA-
10 DQ2.5 и глютеиновым пептидом. Например, конкретными вариантами осуществления изобретения является молекула/антитело, которая/которое конкурирует с любыми молекулами/антителами, представленными в настоящем описании, за связывание с HLA-DQ2.5 или комплексом, образованным HLA-
15 DQ2.5 и глютеиновым пептидом. В этом контексте глютеиновый пептид может представлять собой любой из глютеиновых пептидов, представленных в настоящем описании.

В следующем объекте изобретения анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающая молекула (антитело), указанная в любом из представленных выше вариантов осуществления изобретения, представляет собой моноклональную
20 антигенсвязывающую молекулу (антитело), включая химерную, гуманизированную или человеческую антигенсвязывающую молекулу (антитело). В предпочтительных вариантах осуществления изобретения анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающая молекула (антитело), предлагаемая в изобретении, представляет собой гуманизированную антигенсвязывающую
25 молекулу (антитело). В одном из вариантов осуществления изобретения анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающая молекула (антитело) представляет собой фрагмент антитела, например, Fv-, Fab-, Fab'-, scFv-фрагмент, димерное антитело или F(ab')₂ –фрагмент. В другом варианте осуществления изобретения антитело представляет собой полноразмерное антитело, например, интактное
30 антитело в виде IgG1 или антитело другого класса или изотипа, указанного в настоящем описании.

Согласно следующему объекту изобретения анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающая молекула (антитело), указанная в любом из

представленных выше вариантов осуществления изобретения, может обладать любой из описанных ниже особенностей, в том числе индивидуально или в комбинации:

Аффинность антител

5 В конкретных вариантах осуществления изобретения антитело, указанное в настоящем описании, имеет величину константы диссоциации (K_d), составляющую 1 микромоль (мкМ) или менее, 100нМ или менее, 10нМ или менее, 1нМ или менее, 0,1нМ или менее, 0,01нМ или менее, или 0,001нМ или менее (например 10^{-8} М или менее, например, от 10^{-8} М до 10^{-13} М, например, от 10 10^{-9} М до 10^{-13} М).

В одном из вариантов осуществления изобретения K_d измеряют с помощью анализа связывания несущего радиоактивную метку антигена (РИА). В одном из вариантов осуществления изобретения РИА осуществляют с использованием Fab-версии представляющего интерес антитела и его антигена. Например, 15 измеряют в растворе связывающую активность Fab с антигеном путем уравнивания Fab минимальной концентрацией 125 I-меченного антигена в присутствии полученных титрованием разведений немеченого антигена, осуществляя затем захват связанного антигена на сенсibilизированном антителом к Fab планшете (см., например, Chen и др., J. Mol Biol 293, 1999, сс. 20 865-881). Для обеспечения условий, необходимых для проведения анализа, многолуночные планшеты MICROTITER[®] (фирма Thermo Scientific) сенсibilизируют в течение ночи захватывающим антителом к Fab (фирма Carpel Labs) в концентрации 5 микрограммов (мкг)/мл в 50мМ карбонате натрия (рН 9,6) и затем блокируют с помощью 2% (мас./об.) бычьего сывороточного 25 альбумина в ЗФР в течение 2-5 ч при комнатной температуре (примерно 23°C). В неадсорбирующей планшете (фирма Nunc, № 269620) смешивают взятый в концентрации 100 или 26пМ меченный с помощью 125 I антиген с серийными разведениями представляющего интерес Fab (например, пригодного для оценки антитела к VEGF, Fab-12, см. Presta и др., Cancer Res. 57, 1997, сс. 4593-4599). 30 Затем представляющий интерес Fab инкубируют в течение ночи; однако инкубацию можно осуществлять в течение более продолжительного периода времени (например, в течение 65 ч) для того, чтобы гарантировать достижение

равновесия. После этого смеси переносят в подготовленный для захвата планшет и инкубируют при комнатной температуре (например, в течение 1 ч). Затем раствор удаляют и планшет промывают восемь раз 0,1% полисорбатом 20 (TWEEN-20[®]) в ЗФР. После просушки планшетов в них добавляют по 150

5 мкл/лунку сцинтилляционной жидкости ((MICROSCINT-20TM; фирма Packard) и осуществляют считывание планшетов с помощью гамма-счетчика TOPCOUNTTM (фирма Packard) в течение 10 мин. Для осуществления анализа связывания в условиях конкуренции выбирают концентрации каждого Fab, обеспечивающие уровень связывания, составляющий менее или равный 20% от максимального.

10 Согласно другому варианту осуществления изобретения Kd измеряют методом поверхностного плазмонного резонанса с помощью BIACORE[®]-анализа. Например, анализ осуществляют с помощью устройства BIACORE[®]-2000 или BIACORE[®]-3000 (фирма BIACORE, Inc., Пискатавей, шт. Нью-Джерси) при 25°C с использованием антигена, иммобилизованного на CM5-чипах с

15 уровнем иммобилизации, соответствующим примерно 10 единицам ответа (RU). В одном из вариантов осуществления изобретения биосенсорные чипы из карбоксиметилированного декстрана (CM5, фирма BIACORE Inc.) активируют с помощью гидрохлорида N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) и N-гидроксисукцинимид (NHS) согласно инструкциям поставщика.

20 Антиген разводят 10мМ ацетатом натрия, pH 4,8 до концентрации 5 мкг/мл (примерно 0,2мкМ) перед инъекцией со скоростью потока 5 мкл/мин для достижения уровня иммобилизации, соответствующего примерно 10 единицам ответа (RU) сшитого белка. После инъекции антигена инъецируют 1М этаноламин для блокады непрореагировавших групп. Для кинетических

25 измерений инъецируют двукратные серийные разведения Fab (от 0,78 до 500нМ) в ЗФР, дополненном 0,05% полисорбата 20 (TWEEN-20TM) в качестве поверхностно-активного вещества (ЗФРТ), при 25°C со скоростью потока примерно 25 мкл/мин. Скорость реакции ассоциации (k_{on}) и реакции диссоциации (k_{off}) рассчитывают с использованием простой модели связывания

30 Ленгмюра 1:1 (программное обеспечение Evaluation версия 3.2, BIACORE[®]) путем одновременной аппроксимации сенсограмм ассоциации и диссоциации. Константу равновесия реакции диссоциации (Kd) рассчитывают как отношение

k_{off}/k_{on} (см., например, Chen и др., J Mol Biol 293, 1999, сс. 865-881). Если скорость реакции ассоциации превышает $10^6 M^{-1} s^{-1}$ при оценке с помощью описанного выше метода поверхностного плазмонного резонанса, то скорость реакции ассоциации можно определять с помощью метода гашения

5 флуоресценции, который позволяет измерять повышение или снижение интенсивности излучения флуоресценции (длина волны возбуждения 295 нм; длина волны испускания 340 нм, полоса пропускания 16 нм) при 25°C

10 применяемого в концентрации 20нМ антитела к антигену (Fab-формат) в ЗФР, рН 7,2, в присутствии возрастающих концентраций антигена, осуществляя измерения с помощью спектрометра, такого как спектрофотометр, снабженный блоком для остановки потока (фирма Aviv Instruments), или спектрофотометр SLM-AMINCO™ серии 8000 (фирма ThermoSpectronic), при перемешивании содержимого кюветы.

Фрагменты антитела

15 В конкретных вариантах осуществления изобретения антитело, указанное в настоящем описании, представляет собой фрагмент антитела. Фрагменты антител включают (но не ограничиваясь только ими) фрагменты Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv и scFv, и другие фрагменты, указанные ниже. Обзор некоторых фрагментов антител см. у Hudson и др., Nat Med 9, 2003, сс. 129-134. Обзор scFv-

20 фрагментов см, например, у Pluckthun в: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, т. 113, под ред. Rosenberg и Moore (изд-во Springer-Verlag, New York), 1994, сс. 269-315; см. также WO 93/16185; и патенты США №№ 5571894 и 5587458. Обсуждение, касающееся Fab- и F(ab')₂-фрагментов, которые содержат остатки эпитопа, связывающегося с рецептором спасения, и обладают

25 удлинённым временем полужизни *in vivo*, см. в патенте США № 5869046.

Димерные антитела представляют собой фрагменты антител с двумя антигенсвязывающими центрами, которые могут быть двухвалентными или биспецифическими (см., например, EP 0404097; WO 1993/01161; Hudson и др., Nat. Med. 9, 2003, сс. 129-134; и Holliger и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1993, сс. 6444-6448). Тримерные и тетрамерные антитела описаны также у

30 Hudson и др., Nat. Med. 9, 2003, сс. 129-134.

Однодоменные антитела представляют собой фрагменты антител, содержащие весь переменный домен тяжелой цепи или его часть, или весь

вариабельный домен легкой цепи антитела или его часть. В конкретных вариантах осуществления изобретения однодоменное антитело представляет собой человеческое однодоменное антитело (фирма Domantis, Inc., Уолтхэм, шт. Массачусетс; см., например, патент США № 6248516 В1).

5 Фрагменты антител можно создавать различными методиками, включая (но не ограничиваясь только ими) протеолитическое расщепление интактного антитела, а также получать с помощью рекомбинантных клеток-хозяев (например, *E. coli* или фаг), указанных в настоящем описании.

Варианты Fc-области

10 В конкретных вариантах осуществления изобретения одну или несколько аминокислотных модификаций можно интродуцировать в Fc-область антитела, представленного в настоящем описании, создавая тем самым вариант Fc-области. Вариант Fc-области может содержать последовательность человеческой Fc-области (например, Fc-области человеческого IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4),
15 содержащую аминокислотную модификацию (например, замену) в одном или нескольких аминокислотных положениях.

 Антитела с удлинённым временем полужизни и повышенной способностью к связыванию с неонатальным Fc-рецептором (FcRn), который ответствен за перенос материнских IgG эмбриону (Guyer и др., J. Immunol. 117, 1976, сс. 587-
20 593 и Kim и др., J. Immunol. 24, 1994, сс. 2429-2434), описаны в US 2005/0014934A1 (Hinton и др.). Эти антитела содержат Fc-область с одной или несколькими заменами, которые повышают связывание Fc-области с FcRn. Указанные варианты Fc-области включают варианты с заменами одного или нескольких следующих остатков Fc-области: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305,
25 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 или 434, например, замену остатка 434 в Fc-области (патент США № 7371826).

 Дополнительные примеры, касающиеся других вариантов Fc-области, описаны также у Duncan и Winter, Nature 322, 1988, сс. 738-740; в патенте США № 5648260; патенте США № 5624821 и в WO 1994/29351.

30 Fc-область

 Понятие «Fc-область» или «Fc-домен» в контексте настоящего описания относится к C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит по меньшей мере часть константной области. Понятие включает

нативную последовательность Fc-областей и варианты Fc-областей. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-область тяжелой цепи человеческого IgG простирается от Cys226 или от Pro230 до карбоксильного конца тяжелой цепи. Однако С-концевой лизин (Lys447) или глицин-лизин (остатки 446-447) Fc-области может присутствовать или отсутствовать. Если специально не указано иное, то нумерация аминокислотных остатков в Fc-области или константной области соответствует системе нумерации EU, которую обозначают также как EU-индекс, описанной у Kabat E. A. и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Fc-рецептор

Понятие «Fc-рецептор» или «FcR» относится к рецептору, который связывается с Fc-областью антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения FcR представляет собой нативный человеческий FcR. В некоторых вариантах осуществления изобретения FcR представляет собой рецептор, который связывается с антителом IgG-типа (гамма-рецептор) и включает рецепторы подклассов Fc-гамма RI, Fc-гамма RII и Fc-гамма RIII, включая аллельные варианты и полученные в результате альтернативного сплайсинга формы этих рецепторов. Рецепторы Fc-гамма RII включают Fc-гамма RIIA («активирующий рецептор») и Fc-гамма RIIВ («ингибирующий рецептор»), которые имеют сходные аминокислотные последовательности, отличающиеся прежде всего их цитоплазматическими доменами. Активирующий рецептор Fc-гамма RIIA содержит в своем цитоплазматическом домене активирующие мотивы на основе тирозина иммунорецептора (ITAM). Ингибирующий рецептор Fc-гамма RIIВ содержит в своем цитоплазматическом домене ингибирующий мотив на основе рецептора тирозина иммунорецептора (ITIM) (см., например, Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15, 1997, сс. 203-234). Обзор сведений о FcR представлен, например, у Ravetch и Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9, 1991, сс. 457-492; Capel и др., Immunomethods 4, 1994, сс. 25-34 и de Haas и др., J. Lab. Clin. Med. 126, 1995, сс. 330-341. Под понятие «FcR», указанное в настоящем описании, подпадают и другие FcR, включая те, которые будут идентифицированы в будущем.

Понятие «Fc-рецептор» или «FcR» включает также неонатальный рецептор, FcRn, который ответствен за перенос материнских IgG эмбриону (Guyer и др., J. Immunol. 117, 1976, с. 587 и Kim и др., J. Immunol. 24, 1994, с. 249) и регулирует гомеостаз иммуноглобулинов. Известны методы измерения связывания с FcRn (см., например, Ghetie и Ward., Immunol. Today 18(12), 1997, сс.592-598; Ghetie и др., Nature Biotechnology 15(7), 1997, сс. 637-640; Hinton и др., J. Biol. Chem. 279(8), 2004, сс. 6213-6216; WO 2004/92219 (Hinton и др.).

Связывание с человеческим FcRn *in vivo* и время полужизни в плазме человеческого FcRn, отличающегося высокой аффинностью связывания с полипептидами, можно оценивать, например, в трансгенных мышах или в трансфектированных человеческих клеточных линиях, экспрессирующих человеческий FcRn, или в приматах, которым вводят полипептиды с вариантом Fc-области. В WO 2000/42072 (на имя Presta) описаны варианты антител с повышенной или пониженной способностью связываться с FcR (см., например, также у Shields и др., J. Biol. Chem. 9(2), 2001, сс. 6591-6604).

Fc-гамма рецептор

Fc-гамма рецептор представляет собой рецептор, обладающий способностью связываться с Fc-доменом моноклональных антител изотипа IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, и включают всех членов, принадлежащих к семейству белков, кодируемых в основном генами Fc-гамма рецептора. У человека это семейство включает Fc-гамма RI (CD64), в том числе изоформы Fc-гамма RIa, Fc-гамма RIb и Fc-гамма RIc; Fc-гамма RII (CD32), в том числе изоформы Fc-гамма RIIa (включая аллотипы H131 (тип H) и R131 (тип R)), Fc-гамма IIb (в том числе Fc-гамма RIIb-1 и Fc-гамма RIIb-2), и Fc-гамма RIIc; и Fc-гамма RIII (CD16), в том числе изоформы Fc-гамма RIIIa (включая аллотипы V158 и F158), и Fc-гамма RIIIb (включая аллотипы Fc-гамма RIIIb-NA1 и Fc-гамма RIIIb-NA2), и любые человеческие Fc-гамма R, изоформы Fc-гамма R и их аллотипы, которые пока еще не открыты. Однако Fc-гамма рецептор не ограничен указанными примерами. Fc-гамма рецептор включает (но не ограничиваясь только ими) рецепторы, имеющие происхождение из организма человека, мышей, крыс, кроликов и обезьян. Fc-гамма рецептор может иметь происхождение из любых организмов. Мышиный Fc-гамма рецептор включает (но не ограничиваясь только ими) Fc-гамма RI (CD64), Fc-гамма RII (CD32), Fc-гамма RIII (CD16) и

Fc-гамма RIII-2 (CD16-2), а также все не открытые до настоящего времени мышинные Fc-гамма рецепторы, изоформы Fc-гамма рецептора и их аллотипы. Указанные предпочтительные Fc-гамма рецепторы включают, например, человеческие Fc-гамма RI (CD64), Fc-гамма RIIA (CD32), Fc-гамма RIIIB (CD32), Fc-гамма RIIIA (CD16) и/или Fc-гамма RIIIB (CD16). Обладает ли Fc-гамма рецептор связывающей активностью в отношении Fc-домена моноклонального антитела изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, можно оценивать с помощью ALPHA-скрининга (на основе гомогенного анализа усиленной за счет эффекта близости люминесценции), метода BIACORE на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR) и других методов (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103(11), 2006, сс. 4005-4010), в дополнение к описанным выше форматам FACS и ELISA.

При этом, понятие «лиганд Fc» или «эффекторный лиганд» относится к молекуле и предпочтительно к полипептиду, которая/который связывается с Fc-доменом антитела, формируя комплекс Fc/лиганд Fc. Молекула может иметь происхождение из любых организмов. Связывание лиганда Fc с Fc предпочтительно индуцирует одну или несколько эффекторных функций. Указанные лиганды Fc включают (но не ограничиваясь только ими) Fc-рецепторы, Fc-гамма рецептор, Fc-альфа рецептор, Fc-бета рецептор, FcRn, C1q и C3, маннан-связывающий лектин, рецептор маннозы, белок A *Staphylococcus*, белок G *Staphylococcus* и вирусные Fc-гамма рецепторы. Лиганды Fc включают также гомологи Fc-рецептора (FcRH) (Davis и др., Immunological Reviews 190, 2002, сс. 123-136), которые относятся к семейству Fc-рецепторов, гомологичных Fc-гамма рецептору. Лиганды Fc включают также не идентифицированные до настоящего времени молекулы, которые связываются с Fc.

Связывающая активность в отношении Fc-гамма рецептора

Нарушенную связывающую активность Fc-домена в отношении любого из следующих Fc-гамма рецепторов: Fc-гамма RI, Fc-гамма RIIA, Fc-гамма RIIIB, Fc-гамма RIIIA и/или Fc-гамма RIIIB можно оценивать с помощью описанных выше форматов FACS и ELISA, а также ALPHA-скрининга (на основе гомогенного анализа усиленной за счет эффекта близости люминесценции) и метода BIACORE на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103(11), 2006, сс. 4005-4010).

ALPHA-скрининг осуществляют с применением технологии ALPHA, которая основана на описанном ниже принципе, с использованием двух типов гранул, доноров и акцепторов. Люминесцентный сигнал поддается обнаружению только тогда, когда молекулы, связанные с гранулами-донорами, биологически взаимодействуют с молекулами, связанными с гранулами-акцепторами, и когда обе гранулы находятся в непосредственной близости друг от друга.

5

Возбужденный лазерным пучком фотосенсибилизатор в гранулах-донорах превращает кислород окружающий гранулу в возбужденный синглетный кислород. Когда синглетный кислород диффундирует из гранул-доноров и

10

достигает гранул-акцепторов, локализованных в непосредственной близости, то в гранулах индуцируется хемилюминесцентная реакция. Эта реакция в итоге приводит к испусканию света. Если молекулы, связанные с гранулами-донорами, не взаимодействуют с молекулами, связанными с гранулами-акцепторами, то хемилюминесцентная реакция не происходит, поскольку синглетный кислород,

15

который продуцируется гранулами-донорами, не достигает гранул-акцепторов.

Например, осуществляют иммобилизацию меченой/меченого биотином антигенсвязывающей молекулы или антитела на гранулах-донорах и иммобилизацию Fc-рецептора, меченого глутатион-S-трансферазой (GST), на гранулах-акцепторах. В отсутствии антигенсвязывающей молекулы или

20

антитела, содержащей/содержащего конкурирующий мутантный Fc-домен, Fc-гамма рецептор взаимодействует с антигенсвязывающей молекулой или антителом, содержащей/содержащим Fc-домен дикого типа, индуцируя в результате сигналы с длиной волны 520-620 нм. Антигенсвязывающая молекула или антитело, которая/которое имеет немеченый мутантный Fc-домен,

25

конкурирует с антигенсвязывающей молекулой или антителом, содержащей/содержащим Fc-домен дикого типа, за связывание с Fc-гамма рецептором. Относительную аффинность связывания можно оценивать, определяя количественно снижение флуоресценции в результате конкуренции.

Методы биотинилирования антигенсвязывающих молекул или антител, таких

30

как указанные антитела, с помощью сульфо-NHS-биотина или подобных агентов являются хорошо известными. Пригодные методы добавления GST-метки к Fc-гамма рецептору включают методы, в которых используют слияние полипептидов, кодирующих Fc-гамма рецептор и GST в рамке считывания,

экспрессию слитого гена с использованием клеток, в которые интродуцирован вектор, несущий ген, и последующую очистку с помощью содержащей глутатион колонки. Индуцированный сигнал предпочтительно можно анализировать, например, посредством подгонки к односайтовой модели конкуренции на основе нелинейного регрессионного анализа с использованием такого программного обеспечения, как GRAPHPAD PRISM (фирма GraphPad; Сан-Диего).

Одну из субстанций, предназначенных для исследования взаимодействия, иммобилизуют в качестве лиганда на тонком слое золота на сенсорном чипе. При освещении светом с задней поверхности сенсорного чипа таким образом, чтобы имело место полное отражение на границе раздела между тонким слоем золота и стеклом, интенсивность отраженного света частично снижается в конкретной области (SPR-сигнал). Другую субстанцию, предназначенную для исследования взаимодействия, инъецируют в качестве аналита на поверхность сенсорного чипа. Когда лиганд связывается с аналитом, масса иммобилизованной молекулы-лиганда возрастает. Это приводит к изменению показателя преломления растворителя на поверхности сенсорного чипа. Изменения показателя преломления приводят к сдвигу положения SPR-сигнала (и наоборот, положение сигнала возвращается в исходное, если происходит диссоциация указанного связывания). С помощью BIACORE®-системы уровень описанного выше сдвига (т.е. изменение массы в зависимости на поверхности чипа) откладывают по вертикальной оси, и таким образом получают изменение массы с течением времени в качестве выходных данных (в виде сенсограммы). Кинетические параметры (константа скорости реакции ассоциации (k_a) и константа скорости реакции диссоциации (k_d)), определяют из представленных в виде кривых сенсограмм, и определяют аффинность (KD) как отношение указанных констант. BIACORE®-метод предпочтительно применяют в качестве метода для анализа ингибирования. Примеры такого метода для анализа ингибирования описаны в Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103(11), 2006, сс. 4005-4010.

30 Fc-область с пониженной связывающей активностью в отношении Fc-гамма рецептора

В настоящем описании понятие «пониженная связывающая активность в отношении Fc-гамма рецептора» означает, например, что по данным описанного

выше анализа активности в условиях конкуренции активность тестируемой антигенсвязывающей молекулы составляет 50% или менее, предпочтительно 45% или менее, 40% или менее, 35% или менее, 30% или менее, 20% или менее или 15% или менее и наиболее предпочтительно 10% или менее, 9% или менее, 8% или менее, 7% или менее, 6% или менее, 5% или менее, 4% или менее, 3% или менее, 2% или менее или 1% менее, по сравнению с конкурентной активностью контрольной антигенсвязывающей молекулы или контрольного антитела.

Антигенсвязывающие молекулы антитела или антитела, содержащие Fc-домен моноклонального антитела IgG1-, IgG2-, IgG3- или IgG4-изотипа, можно использовать соответственно в качестве контрольных антигенсвязывающих молекул или антител. Структуры Fc-домена представлены в RefSeq под регистрационным номером AAC82527.1, в RefSeq под регистрационным номером AAB59393.1, в RefSeq под регистрационным номером CAA27268.1 и в RefSeq под регистрационным номером AAB59394.1. Кроме того, когда антигенсвязывающую молекулу или антитело, содержащую/содержащее мутантный Fc-домен антитела конкретного изотипа, используют в качестве тестируемой субстанции, то воздействие мутации мутанта на активность связывания с Fc-гамма рецептором оценивают с использованием в качестве контроля антигенсвязывающей молекулы или антитела, содержащей/содержащего Fc-домен такого же изотипа. С помощью описанных выше методов получают соответственно антигенсвязывающие молекулы или антитела, содержащие мутантный Fc-домен с доказанной пониженной связывающей активностью в отношении Fc-гамма рецептора.

Такие известные мутанты включают, например, мутанты с делецией аминокислот 231A-238S (EU-нумерация) (WO 2009/011941), а также мутанты C226S, C229S, P238S, (C220S) (J. Rheumatol 34, 2007, с. 11); C226S и C229S (Hum. Antibod. Hybridomas 1(1), 1990, сс. 47-54); C226S, C229S, E233P, L234V, и L235A (Blood 109, 2007, сс. 1185-1192).

В частности, предпочтительными антигенсвязывающими молекулами или антителами, являются молекулы, которые содержат Fc-домен с мутацией (такой как замена) по меньшей мере одной аминокислоты, выбранной из аминокислот в следующих положениях: 220, 226, 229, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239,

240, 264, 265, 266, 267, 269, 270, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 325, 327, 328, 329, 330, 331 или 332 (EU-нумерация), в аминокислотах, образующих Fc-домен антитела конкретного изотипа. Изобретение не ограничено изотипом антитела, из которого получают Fc-домен, и можно использовать соответствующий Fc-
5 домен, полученный из моноклонального антитела IgG1-, IgG2-, IgG3- или IgG4-изотипа. Предпочтительно следует применять Fc-домены, полученные из антител IgG1-изотипа.

В настоящем изобретении SG181 можно применять в качестве «молчащего» в отношении Fc-гамма рецептора Fc-домена, который ослабляет связывание Fc с
10 Fc-гамма рецепторами. В некоторых вариантах осуществления изобретения SG181.S3n (SEQ ID NO: 101) и SG181.S3p (SEQ ID NO: 102) можно применять в качестве последовательностей константных областей тяжелых цепей. Указанные последовательности константных областей тяжелых цепей можно включать в антигенсвязывающие молекулы или антитела, предлагаемые в настоящем
15 изобретении, для снижения связывания с Fc-гамма рецептором.

Другими предпочтительными антигенсвязывающими молекулами или антителами, являются, например, молекулы, которые содержат Fc-домен, в котором любая аминокислота в положении 233, 234, 235, 236, 237, 327, 330 или
20 331 (EU-нумерация) в аминокислотах, образующих Fc-домен антитела IgG1-изотипа, заменена на аминокислоту, находящуюся в соответствующем положении согласно EU-нумерации в соответствующих IgG2 или IgG4.

В некоторых вариантах осуществления изобретения мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, предлагаемая в изобретении, дополнительно содержит Fc-домен, обладающий пониженной аффинностью связывания с
25 человеческим Fc-гамма рецептором по сравнению с нативным Fc-доменом человеческого IgG1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения в мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в изобретении, Fc-домен содержит Arg в положении 235 и Arg в положении 236,
30 где нумерация аминокислотных положений соответствует EU-нумерации.

Регуляция ассоциации H-цепи/L-цепи и другие характерные особенности

Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к антигенсвязывающей молекулы, в которой регулируют ассоциацию тяжелой

цепи и легкой цепи, способу получения антигенсвязывающей молекулы, в которой регулируют ассоциацию тяжелой цепи и легкой цепи, и способу регуляции ассоциации тяжелой цепи и легкой цепи в антигенсвязывающей молекуле.

5 Антигенсвязывающая молекула, предлагаемая в настоящем изобретении, относится к антигенсвязывающей молекуле, в которой регулируют ассоциацию тяжелой цепи и легкой цепи, в которой тяжелая цепь и легкая цепь, образующие антигенсвязывающую молекулу, представляют собой комбинацию представляющих интерес тяжелой цепи и легкой цепи и в которой
10 аминокислотные остатки в данных положениях в константной области тяжелой цепи (CH1) и в константной области легкой цепи (CL) представляют собой взаимно электрически отталкивающие аминокислотные остатки (имеющие одинаковый заряд).

В настоящем изобретении путем превращения аминокислотных остатков в заданных положениях в CH1 и CL с нежелательной комбинацией тяжелой цепи и легкой цепи в аминокислотные остатки, которые взаимно электрически отталкиваются (т.е. которые имеют одинаковый заряд), образование нежелательных комбинаций тяжелой цепи и легкой цепи можно предотвращать путем использования указанного отталкивания зарядов, и в результате можно
20 получать требуемую комбинацию тяжелой цепи и легкой цепи.

В настоящем изобретении фразы «для регуляции ассоциации» и «ассоциация регулируется» относятся к достижению требуемого состояния ассоциации, и более конкретно относятся в такой регуляции, при которой нежелательные ассоциации не могут образовываться между тяжелой цепью и легкой цепью.
25

В настоящем изобретении понятие «поверхность раздела», как правило, относится к поверхности ассоциации, которая является результатом ассоциации (взаимодействия), и аминокислотные остатки, образующие поверхность раздела, как правило, представляют собой один или несколько аминокислотных остатков, включенных в полипептидные области, которые участвуют в ассоциации, и более предпочтительно аминокислотные остатки, которые сближаются друг с другом во время ассоциации и участвуют во взаимодействии. Более конкретно, указанное взаимодействие включает, например, ситуации, в которых
30

аминокислотные остатки сближаются во время ассоциации, образуя друг с другом водородные связи, электростатические взаимодействия или солевые мостики.

В настоящем изобретении фраза «аминокислотные остатки, образующие
5 поверхность раздела» более конкретно относится к аминокислотным остаткам, включенным в полипептидную область, которая образует поверхность раздела. Например, полипептидные области, образующие поверхность раздела, представляют собой полипептидные области, ответственные за избирательное связывание между молекулами, такими как антигенсвязывающие молекулы
10 (например, антитела), лиганды, рецепторы или субстраты. Более конкретно, в антигенсвязывающих молекулах такие примеры включают константные области тяжелых цепей, переменные области тяжелых цепей, константные области легких цепей и переменные области легких цепей.

В предпочтительном варианте антигенсвязывающей молекулы,
15 предлагаемой в настоящем изобретении, антигенсвязывающая молекула имеет аминокислотные остатки в заданных положениях в CH1 и CL с нежелательной комбинацией тяжелой цепи и легкой цепи перед регуляцией ассоциации, которые электрически отталкиваются (которые имеют одинаковый заряд).

Предполагается, что путем модификации аминокислотных остатков в
20 вышеуказанной антигенсвязывающей молекуле в аминокислотные остатки, которые взаимно электрически отталкиваются (т.е. которые имеют одинаковый заряд), ассоциация этих аминокислотных остатков должна ингибироваться силой отталкивания электрических зарядов.

Таким образом, в вышеуказанной антигенсвязывающей молекуле
25 модифицированные аминокислотные остатки предпочтительно представляют собой аминокислотные остатки, которые сближаются друг с другом при ассоциации, в полипептидных областях, образующих поверхность раздела.

Аминокислотные остатки, которые сближаются при ассоциации, можно определять, например, путем анализа трехмерной структуры полипептида и
30 исследования аминокислотных последовательностей полипептидных областей, которые образуют поверхность раздела при ассоциации полипептидов. Аминокислотные остатки на поверхности раздела, которые взаимно сближаются

друг с другом, являются предпочтительными мишенями «модификации» в антигенсвязывающей молекуле, предлагаемой в настоящем изобретении.

Известно, что некоторые аминокислоты являются электрически заряженными. В целом, известно, что лизин (K), аргинин (R) и гистидин (H) представляют собой аминокислоты, имеющие положительный заряд (положительно заряженные аминокислоты). Известно, что аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E) и т.п. относятся к аминокислотам, имеющим отрицательный заряд (отрицательно заряженные аминокислоты). Кроме того, аланин (A), аспарагин (N), цистеин (C), глутамин (Q), глицин (G), изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), фенилаланин (F), пролин (P), серин (S), треонин (T), триптофан (W), тирозин (Y), валин (V) и т.п. представляют собой аминокислоты, не имеющие заряда или неполярные аминокислоты.

Таким образом, понятие «аминокислоты, которые взаимно электрически отталкиваются (т.е. которые имеют одинаковый заряд)» в настоящем изобретении относится к:

(1) аминокислотам, среди которых одна из аминокислот представляет собой положительно заряженную аминокислоту, и другая аминокислота также представляет собой положительно заряженную аминокислоту, и

(2) аминокислотам, среди которых одна из аминокислот представляет собой отрицательно заряженную аминокислоту, и другая аминокислота также представляет собой отрицательно заряженную аминокислоту.

Примеры аминокислотных модификаций включают модификацию незаряженной аминокислоты или неполярной аминокислоты в положительно заряженную аминокислоту, модификацию незаряженной аминокислоты или неполярной аминокислоты в отрицательно заряженную аминокислоту, модификацию положительно заряженной аминокислоты в отрицательно заряженную аминокислоту и модификацию отрицательно заряженной аминокислоты в положительно заряженную аминокислоту. Кроме того, модификация незаряженной аминокислоты или неполярной аминокислоты в другую незаряженную или неполярную аминокислоту, модификация положительно заряженной аминокислоты в другую положительно заряженную аминокислоту и модификация отрицательно заряженной аминокислоты на

другую отрицательно заряженную аминокислоту также относятся к аминокислотным модификациям, предлагаемым в настоящем изобретении.

Модификация аминокислот согласно настоящему изобретению включает создание одной модификации в каждой тяжелой и легкой цепях или создание
5 нескольких модификаций в каждой тяжелой и легкой цепях. Кроме того, количество модификаций, интродуцированных в тяжелую цепь и легкую цепь может быть одинаковым или различным.

Модификация аминокислот согласно настоящему изобретению включает создание нескольких модификаций в положительно заряженные аминокислоты
10 либо в тяжелой цепи, либо в легкой цепи и создание несколько модификаций в отрицательно заряженные аминокислоты в другой цепи. Кроме того, можно осуществлять несколько модификаций в положительно заряженные аминокислоты, а также несколько модификаций в отрицательно заряженные аминокислоты в одной и той же тяжелой цепи или легкой цепи. При
15 осуществлении указанных модификаций можно объединять также модификации в незаряженные аминокислоты или неполярные аминокислоты, а также модификации незаряженных аминокислот или неполярных аминокислот.

При осуществлении модификаций, предлагаемых в настоящем изобретении, например, аминокислот, одну из цепей, можно использовать без модификации, и
20 в таких случаях тяжелую цепь и легкую цепь не нужно модифицировать одновременно, и только одна из цепей может быть модифицирована.

Константная область легкой цепи антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в настоящем изобретении, предпочтительно представляет собой константную область человеческой легкой цепи. Примеры константной области
25 легкой цепи антитела включают константные области типа IgK (каппа), IgL1, IgL2, IgL3, IgL6 и IgL7 (лямбда). Константная область легкой цепи антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в настоящем изобретении, не ограничена конкретно; при применении нескольких типов легких цепей легкие цепи могут представлять собой различные типы легких цепей, например, каппа и
30 лямбда. Несколько последовательностей аллотипов, полученных путем генетического полиморфизма, описаны в Sequences of Proteins of Immunological Interest, публикация NIH Publication, № 91-3242, таких как константная область

человеческого IgK (каппа) и константная область человеческого IgL7 (лямбда), и любую из них можно применять в настоящем изобретении.

Константные области антител, в частности константные области тяжелых цепей, можно при необходимости модифицировать для улучшения функции или стабильности антигенсвязывающей молекулы. Примеры модификаций для улучшения функции антигенсвязывающей молекулы включают модификации, которые усиливают или ослабляют связывание между антигенсвязывающей молекулой и Fc-гамма рецептором («Fc-гамма R»), модификации, которые усиливают или ослабляют связывание между антигенсвязывающей молекулой и FcRn, модификации, которые усиливают или ослабляют цитотоксическую активность (такую как ADCC-активность и CDC-активность) антигенсвязывающей молекулы, и т.п. Кроме того, можно включать также модификации, которые улучшают гетерогенность антигенсвязывающей молекулы, и модификации, которые улучшают неиммуногенность и/или фармакокинетику.

Кроме того, при гетерогенности C-концевой последовательности тяжелой цепи антитела IgG-типа описано амидирование C-концевой карбоксильной группы путем делеции C-концевой аминокислоты, т.е. остатка лизина, или путем делеции двух C-концевых аминокислот, глицина и лизина (Anal. Biochem. 360(1), 1 января 2007 г., сс. 75-83).

Таким образом, согласно настоящему изобретению для снижения гетерогенности C-конца тяжелой цепи предпочтительно применять IgG, в котором C-концевой лизин или C-концевой лизин и глицин удалены путем делеции.

Благодаря их ослабленной антигенности в организме человека, предполагается, что химерные и гуманизированные антитела, полученные с использованием имеющих происхождение из последовательностей человеческих антител, могут оказаться ценными при их введении людям для терапевтических и других целей.

Предпочтительным примером антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в настоящем изобретении, является гетеромерный мультимер, имеющий два или большее количество типов CH1 и два или большее количество типов CL. Указанный гетеромерный мультимер предпочтительно связывается с

двумя или большим количеством типов эпитопов и его примером является мультиспецифическое антитело.

Предпочтительным примером мультиспецифического антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, является биспецифическое антитело.

5 Таким образом, примером предпочтительного варианта антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в настоящем изобретении, является биспецифическое антитело, состоящее из двух типов тяжелых цепей (первая тяжелая цепь и вторая тяжелая цепь) и двух типов легких цепей (первая легкая цепь и вторая легкая).

10 При более точном описании «биспецифических антител», которые являются предпочтительными вариантами антигенсвязывающих молекул, предлагаемых в настоящем изобретении, указанное выше понятие «первая тяжелая цепь» относится к одной из двух тяжелых цепей (H-цепей), образующих антитело, и понятие «вторая H-цепь» относится к другой H-цепи, которая отличается от первой H-цепи. Это означает, что из двух H-цепей одну из них можно
15 произвольно обозначать как первая H-цепь, а другую можно обозначать как вторая H-цепь. Аналогично этому, понятие «первая легкая цепь» относится к одной из двух легких цепей (L-цепей), образующих биспецифическое антитело, и понятие «вторая L-цепь» относится к другой L-цепи, которая отличается от первой L-цепи. Из двух L-цепей одну из можно произвольно обозначать как
20 первая L-цепь, а другую можно обозначать как вторая L-цепь. Как правило, первая L-цепь и первая H-цепь имеют происхождение из одного и того же антитела, которое связывается с конкретным антигеном (или эпитопом), и вторая L-цепь и вторая H-цепь также имеют происхождение из одного и того же антитела, которое связывается с конкретным антигеном (или эпитопом). В
25 настоящем описании пару L-цепь-H-цепь, образованную первыми H-цепью и L-цепью, обозначают как первая пара, а пару L-цепь-H-цепь, образованную вторыми H-цепью и L-цепью, обозначают как вторая пара. Антиген (или эпитоп), применяемый для получения антитела, из которого имеет происхождение вторая пара, предпочтительно отличается от антигена,
30 применяемого для получения антитела, из которого имеет происхождение первая пара. Более конкретно, антигены, распознаваемые первой парой и второй парой, могут быть одинаковыми, но предпочтительно пары связываются с различными антигенами (или эпитопами). В этом случае H-цепи и L-цепи первой пары и

второй пары предпочтительно имеют аминокислотные последовательности, отличающиеся друг от друга. Когда первая пара и вторая пара связываются с различными эпитопами, то первая пара и вторая пара могут распознавать совершенно отличные друг от друга антигены, или они могут распознавать различные сайты (различные эпитопы) одного антигена. Кроме того, одна из них может распознавать антиген, такой как белок, пептид, ген или сахар, а другая может распознавать цитотоксические субстанции, такие как радиоактивные субстанции, химиотерапевтические агенты или токсины клеточного происхождения. Однако, когда требуется получать антитело, имеющее пары, образованные конкретными комбинациями H-цепей и L-цепей, то эти конкретные H-цепи и L-цепи можно произвольно обозначать как первая пара и вторая пара.

Более подробное разъяснение представлено ниже на примере биспецифического антитела IgG-типа, имеющего два типа константных областей CH1 тяжелых цепей (CH1-A и CH1-B) и два типа константных областей (CL-A и CL-B) легких цепей; однако настоящее изобретение можно аналогичным образом применять и к другим антителам.

Когда требуется получить биспецифическое антитело, которое должно распознавать один эпитоп с помощью первой CH1-A и первой CL-A, и которое должно связываться с другим эпитопом с помощью второй CH1-B и второй CL-B, то теоретически можно получать 10 типов молекул антител, если экспрессировать каждую из четырех типов цепей для получения указанного антитела.

В этом случае требуемые молекулы антител можно предпочтительно получать, если, например, регулировать ассоциацию таким образом, чтобы ингибировалась ассоциация CH1-A и CL-B и/или между CH1-B и CL-A.

Примером является модификация аминокислотных остатков, образующих поверхность раздела между CH1-A и CL-B, в положительно заряженные аминокислотные остатки и модификация аминокислотных остатков, образующих поверхность раздела между CH1-B и CL-A, в отрицательно заряженные аминокислотные остатки. В результате указанных модификаций ингибируется непреднамеренная ассоциация между CH1-A и CL-B, поскольку аминокислотные остатки, образующие поверхность раздела, оба являются положительно

заряженными, и ассоциация между СН1-Б и СL-A ингибируется также, поскольку аминокислотные остатки, образующие поверхность раздела, оба являются отрицательно заряженными. Таким образом, непреднамеренная ассоциация между СН1-А и СL-Б и ассоциация между СН1-Б и СL-А ингибируется, поскольку аминокислотные остатки, образующие поверхность раздела, все имеют одинаковый заряд. В результате можно эффективно создавать антитела, имеющие требуемую ассоциацию между СН1-А и СL-А, и требуемую ассоциацию между СН1-Б и СL-Б. Кроме того, требуемая ассоциация между СН1-А и СL-А усиливается, поскольку аминокислотные остатки, образующие поверхность раздела, имеют отличающиеся друг от друга типы зарядов; и требуемая ассоциация между СН1-Б и СL-Б также усиливается, поскольку аминокислотные остатки, образующие поверхность раздела, имеют отличающиеся друг от друга типы зарядов. Следовательно, можно эффективно получать антитела с требуемой ассоциацией.

Другим примером является модификация аминокислотных остатков, образующих поверхность раздела между СН1-А и СL-Б в положительно заряженные аминокислотные остатки, когда аминокислотные остатки, образующие поверхность раздела между СL-А и СН1-Б, представляют собой соответственно незаряженные или неполярные аминокислоты. В результате такой модификация, непреднамеренная ассоциация между СН1-А и СL-Б ингибируется, поскольку аминокислотные остатки, образующие поверхность раздела, оба являются положительно заряженными. С другой стороны, поскольку аминокислотные остатки, образующие поверхности раздела, представляют собой аминокислоты, которые взаимно не отталкиваются электрически, то требуемая ассоциация между СН1-А и СL-А и требуемая ассоциация между СН1-Б и СL-Б должна происходить легче, чем в том случае, когда аминокислоты электрически отталкиваются. Таким образом, можно эффективно получать антитела, которые имеют требуемую ассоциацию между СН1-А и СL-А и требуемую ассоциацию между СН1-Б и СL-Б. При этом в данном примере в том случае, когда аминокислотные остатки, образующие поверхность раздела между СL-А и СН1-Б не представляют собой соответственно незаряженные или неполярные аминокислоты, их можно

модифицировать таким образом, чтобы они представляли собой соответственно незаряженные или неполярные аминокислоты.

Кроме того, в другом примере, когда аминокислотные остатки, образующие поверхность раздела между CL-Б и СН1-Б, представляют собой незаряженные или неполярные аминокислоты в СН1-Б, то один из аминокислотных остатков, образующих поверхность раздела между СН1-А и CL-А, модифицируют в положительно заряженный аминокислотный остаток, в то время как другой модифицируют в отрицательно заряженный аминокислотный остаток; и аминокислотные остатки, образующие поверхность раздела между CL-Б и СН1-Б, в CL-Б модифицируют таким образом, чтобы они имели такой же заряд, который в результате модификации приобрела СН1-А. В то время как в результате указанной модификации требуемая ассоциация между СН1-А и CL-А усиливается, поскольку аминокислотные остатки, образующие поверхность раздела, имеют комбинацию положительного заряда и отрицательного заряда, требуемая ассоциация между СН1-Б и CL-Б не ингибируется, поскольку аминокислотные остатки, образующие поверхность раздела, представляют собой аминокислоты, которые взаимно не отталкиваются электрически. В результате можно эффективно получать антитело, имеющее требуемую ассоциацию между СН1-А и CL-А и требуемую ассоциацию между СН1-Б и CL-Б. При этом, в данном примере в случае, когда аминокислотные остатки, образующие поверхность раздела между CL-Б и СН1-Б не представляют собой соответственно незаряженные или неполярные аминокислоты в СН1-Б, то их можно модифицировать таким образом, чтобы они представляли собой соответственно незаряженные или неполярные аминокислоты.

Кроме того, применение регуляции ассоциации, предложенной в настоящем изобретении, делает возможным подавлять ассоциацию между СН1-областями (СН1-А и СН1-Б) или ассоциацию между CL-областями (CL-А и CL-Б).

Специалистам в данной области должно быть очевидно, каким образом можно определять типы аминокислотных остатков, которые приближаются друг к другу в процессе ассоциации на поверхности раздела СН1 и CL в требуемом полипептиде, для которого требуется регуляция ассоциации, предлагаемая в настоящем изобретении.

Кроме того, специалистам в данной области также должно быть очевидно, как соответствующим образом получать последовательности, которые можно использовать в качестве СН1 или СL антитела, из организма, такого как человек, обезьяна, мышь, кролик и т.п., используя общедоступную базу данных и т.п.

5 Более конкретно, информацию об аминокислотных последовательностях СН1 или СL можно получить с помощью путей, описанных ниже в разделе «Примеры».

Например, касательно биспецифических антител, описанных ниже в примерах, конкретные примеры аминокислотных остатков, которые
10 приближаются друг к другу (которые соприкасаются или находятся в контакте) на поверхности раздела СН1 и СL при ассоциации, включают указанные ниже комбинации:

- глутамин (Q) в положении 175 согласно EU-нумерации в СН1 и соприкасающийся (контактирующий) глутамин (Q) или глутаминовая кислота
15 (E) в положении 160 согласно нумерации Кэбота в СL;

- глутамин (Q) в положении 175 согласно EU-нумерации в СН1 и соприкасающийся (контактирующий) треонин (T) или серин (S) в положении 131
согласно нумерации Кэбота в СL;

- глутамин (Q) в положении 175 согласно EU-нумерации в СН1 и
20 соприкасающиеся (контактирующие) серин (S) или треонин (T) в положении 131 и глутамин (Q) или глутаминовая кислота (E) в положении 160 согласно нумерации Кэбота в СL; и

- лизин (K) в положении 147 и глутамин (Q) в положении 175 согласно EU-нумерации СН1 и соприкасающиеся (контактирующие) серин (S) или треонин
25 (T) в положении 131 и глутамин (Q) или глутаминовая кислота (E) в положении 160 согласно нумерации Кэбота в СL.

Номера, указанные согласно EU-нумерации в настоящем изобретении, соответствуют EU-нумерации (Sequences of proteins of immunological interest, публикация NIH №. 91-3242). В настоящем изобретении фразы
30 «аминокислотный остаток в положении X согласно EU-нумерации» и «аминокислота в положении X согласно EU-нумерации» (где X обозначает произвольное число) часто можно обозначать также как «аминокислотный остаток, который соответствует положению X согласно EU-нумерации» и

«аминокислота, которая соответствует положению X согласно EU-нумерации». Как указано ниже в примерах, требуемые антигенсвязывающие молекулы предпочтительно можно получать путем модификации указанных аминокислотных остатков и путем осуществления способов, предлагаемых в настоящем изобретении.

Вариантом осуществления настоящего изобретения является антигенсвязывающая молекула, в которой регулируют ассоциацию тяжелой цепи и легкой цепи, в которой один или два, или большее количество наборов аминокислотных остатков, выбранных из группы, которая состоит из наборов аминокислотных остатков, указанных ниже в подпунктах (а)-(в), в тяжелой цепи и легкой цепи антигенсвязывающей молекулы, представляют собой аминокислотные остатки, которые взаимно электрически отталкиваются:

(а) аминокислотный остаток, находящийся в СН1 в положении 175 согласно EU-нумерации, и аминокислотный остаток, находящийся в СL в положении 160 согласно нумерации Кэбота;

(б) аминокислотный остаток, находящийся в СН1 в положении 175 согласно EU-нумерации, и аминокислотный остаток, находящийся в СL в положении 131 согласно нумерации Кэбота;

(в) аминокислотные остатки, находящиеся в СН1 в положениях 147 и 175 согласно EU-нумерации, и аминокислотные остатки, находящиеся в СL в положениях 131 и 160 согласно нумерации Кэбота; и

(г) аминокислотный остаток, находящийся в СН1 в положении 175 согласно EU-нумерации, и аминокислотные остатки, находящиеся в СL в положениях 131 и 160 согласно нумерации Кэбота.

В указанной выше антигенсвязывающей молекуле «аминокислотные остатки, которые взаимно электрически отталкиваются» или «аминокислотные остатки, имеющие одинаковый заряд», предпочтительно выбирают из аминокислотных остатков, которые входят, например, в указанный ниже либо набор (X), либо набор (Y):

(X) глутаминовая кислота (E) или аспарагиновая кислота (D); или
(Y) лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H).

В указанной выше антигенсвязывающей молекуле конкретные примеры наборов аминокислотных остатков, которые взаимно электрически

отталкиваются, включают наборы представленных ниже аминокислотных остатков:

5 (а) аминокислотный остаток, находящийся в СН1 в положении 175 согласно EU-нумерации, и аминокислотный остаток, находящийся в СL в положении 160 согласно нумерации Кэбота;

(б) аминокислотный остаток, находящийся в СН1 в положении 175 согласно EU-нумерации, и аминокислотный остаток, находящийся в СL в положении 131 согласно нумерации Кэбота;

10 (в) аминокислотные остатки, находящиеся в СН1 в положениях 147 и 175 согласно EU-нумерации, и аминокислотные остатки, находящиеся в СL в положениях 131 и 160 согласно нумерации Кэбота; и

(г) аминокислотный остаток, находящийся в СН1 в положении 175 согласно EU-нумерации, и аминокислотные остатки, находящиеся в СL в положениях 131 и 160 согласно нумерации Кэбота.

15 В некоторых вариантах осуществления изобретения в мультиспецифической антигенсвязывающей молекуле один, два, три или все наборы аминокислотных остатков, выбранных из группы, которая состоит из наборов аминокислотных остатков, представленных ниже в подпунктах (а)-(г), в тяжелой цепи и легкой цепи антигенсвязывающей молекулы представляют собой
20 аминокислотные остатки, которые электростатически отталкиваются друг от друга:

(а) аминокислотный остаток в константной области тяжелой цепи (СН1), который находится в положении 175 согласно EU-нумерации, и аминокислотный остаток в константной области легкой цепи (СL), который находится в
25 положении 131 согласно нумерации Кэбота,

(б) аминокислотный остаток в СН1, который находится в положении 175 согласно EU-нумерации, и аминокислотный остаток в СL, который находится в положении 160 согласно нумерации Кэбота;

30 (с) аминокислотный остаток в СН1, который находится в положении 175 согласно EU-нумерации, и аминокислотные остатки в СL, которые находятся в положениях 131 и 160 согласно нумерации Кэбота;

(г) аминокислотные остатки в СН1, которые находятся в положениях 147 и 175 согласно EU-нумерации, и аминокислотные остатки в СL, которые находятся в положениях 131 и 160 согласно нумерации Кэбота.

5 В настоящем изобретении предложена антигенсвязывающая молекула, в которой один, два, три или большее количество наборов аминокислотных остатков, выбранных из группы, которая состоит из наборов аминокислотных остатков, представленных ниже в подпунктах (а1)-(в2), в тяжелой цепи и легкой цепи антигенсвязывающей молекулы представляют собой аминокислотные остатки, которые электростатически отталкиваются друг от друга:

10 (а1) аминокислотный остаток, находящийся в СН1 в положении 175 согласно EU-нумерации, который представляет собой глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D), и аминокислотный остаток, находящийся в СL в положении 160 согласно EU-нумерации, который представляет собой глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D);

15 (а2) аминокислотный остаток, находящийся в СН1 в положении 175 согласно EU-нумерации, который представляет собой лизин (K), гистидин (H) или аргинин (R), и аминокислотный остаток, находящийся в СL в положении 160 согласно EU-нумерации, который представляет собой лизин (K), гистидин (H) или аргинин (R);

20 (б1) аминокислотный остаток, находящийся в СН1 в положении 175 согласно EU-нумерации, который представляет собой глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D), и аминокислотный остаток, находящийся в СL в положении 131 согласно EU-нумерации, который представляет собой глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D);

25 (б2) аминокислотный остаток, находящийся в СН1 в положении 175 согласно EU-нумерации, который представляет собой лизин (K), гистидин (H) или аргинин (R), и аминокислотный остаток, находящийся в СL в положении 131 согласно EU-нумерации, который представляет собой лизин (K), гистидин (H) или аргинин (R);

30 (в1) аминокислотные остатки, находящиеся в СН1 в положениях 147 и 175 согласно EU-нумерации, каждый из которых представляет собой глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D), и аминокислотные остатки, находящиеся в СL в положениях 131 и 160 согласно EU-нумерации, каждый из

которых представляет собой глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D);

(в2) аминокислотные остатки, находящиеся в СН1 в положениях 147 и 175 согласно EU-нумерации, каждый из которых представляет собой лизин (K), гистидин (H) или аргинин (R), и аминокислотные остатки, находящиеся в СL в положениях 131 и 160 согласно EU-нумерации, каждый из которых представляет собой лизин (K), гистидин (H) или аргинин (R).

В указанной выше антигенсвязывающей молекуле конкретные примеры аминокислотных остатков, которые электростатически отталкиваются друг от друга, включают указанные ниже аминокислотные остатки:

(а1) аминокислотный остаток, находящийся в СН1 в положении 175 согласно EU-нумерации, который представляет собой глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D), и аминокислотный остаток, находящийся в СL в положении 160 согласно EU-нумерации, который представляет собой глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D);

(а2) аминокислотный остаток, находящийся в СН1 в положении 175 согласно EU-нумерации, который представляет собой лизин (K), гистидин (H) или аргинин (R), и аминокислотный остаток, находящийся в СL в положении 160 согласно EU-нумерации, который представляет собой лизин (K), гистидин (H) или аргинин (R);

(б1) аминокислотный остаток, находящийся в СН1 в положении 175 согласно EU-нумерации, который представляет собой глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D), и аминокислотный остаток, находящийся в СL в положении 131 согласно EU-нумерации, который представляет собой глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D);

(б2) аминокислотный остаток, находящийся в СН1 в положении 175 согласно EU-нумерации, который представляет собой лизин (K), гистидин (H) или аргинин (R), и аминокислотный остаток, находящийся в СL в положении 131 согласно EU-нумерации, который представляет собой лизин (K), гистидин (H) или аргинин (R);

(в1) аминокислотные остатки, находящиеся в СН1 в положениях 147 и 175 согласно EU-нумерации, каждый из которых представляет собой глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D), и аминокислотные остатки,

находящиеся в CL в положениях 131 и 160 согласно EU-нумерации, каждый из которых представляет собой глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D);

5 (в2) аминокислотные остатки, находящиеся в СН1 в положениях 147 и 175 согласно EU-нумерации, каждый из которых представляет собой лизин (K), гистидин (H) или аргинин (R), и аминокислотные остатки, находящиеся в CL в положениях 131 и 160 согласно EU-нумерации, каждый из которых представляет собой лизин (K), гистидин (H) или аргинин (R);

10 (г1) аминокислотный остаток, находящийся в СН1 в положении 175 согласно EU-нумерации, который представляет собой глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D), и аминокислотные остатки, находящиеся в CL в положениях 131 и 160 согласно EU-нумерации, каждый из которых представляет собой глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D);

15 (г2) аминокислотный остаток, находящийся в СН1 в положении 175 согласно EU-нумерации, который представляет собой лизин (K), гистидин (H) или аргинин (R), и аминокислотные остатки, находящиеся в CL в положениях 131 и 160 согласно EU-нумерации, каждый из которых представляет собой лизин (K), гистидин (H) или аргинин (R).

20 Помимо вышесказанного, метод ингибирования не представляющей интерес ассоциации СН1/CL путем интродукции отталкивающихся электрических зарядов на поверхность раздела между СН1 и CL (WO 2013/065708) можно применять также для антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в настоящем изобретении. Более конкретно, в настоящем изобретении предложена антигенсвязывающая молекула, имеющая СН1 и CL, в 25 которой один или два, или большее количество наборов аминокислотных остатков, выбранных из группы, которая состоит из наборов аминокислотных остатков, указанных ниже в подпунктах (а)-(г), представляют собой аминокислотные остатки, которые взаимно электрически отталкиваются:

30 (а) аминокислотный остаток, который находится в константной области тяжелой цепи (СН1) в положении 147 согласно EU-нумерации, и аминокислотный остаток, который находится в константной области легкой цепи (CL) в положении 160 согласно EU-нумерации;

(б) аминокислотный остаток, находящийся в СН1 в положении 147 согласно EU-нумерации, и аминокислотный остаток, находящийся в СL в положении 131 согласно EU-нумерации;

5 (в) аминокислотный остаток, находящийся в СН1 в положении 175 согласно EU-нумерации, и аминокислотный остаток, находящийся в СL в положении 160 согласно EU-нумерации;

(г) аминокислотный остаток, находящийся в СН1 в положении 213 согласно EU-нумерации, и аминокислотный остаток, находящийся в СL в положении 123 согласно EU-нумерации.

10 Метод интродукции электрического отталкивания на поверхность раздела второго константного участка тяжелой цепи (СН2) или третьего константного участка тяжелой цепи (СН3) для подавления нежелательной ассоциации между тяжелыми цепями, метод интродукции электрического отталкивания на
поверхность раздела переменной области тяжелой цепи и переменной
15 области легкой цепи для подавления непреднамеренной ассоциации между тяжелой цепью и легкой цепью или метод модификации аминокислотных остатков, образующих гидрофобное ядро, которое присутствует на поверхности раздела переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи, в полярные аминокислоты, имеющие электрический заряд, для подавления
20 непреднамеренной ассоциации между тяжелой цепью и легкой цепью, можно применять дополнительно для антигенсвязывающих молекул, предлагаемых в настоящем изобретении (см. WO 2006/106905).

При осуществлении метода подавления непреднамеренной ассоциации между тяжелыми цепями путем интродукции электрического отталкивания на
25 поверхность раздела СН2 или СН3, примеры аминокислотных остатков, которые контактируют на поверхности раздела из других константных областей тяжелой цепи, включают области, соответствующие положению 356 (EU-нумерация) и положению 439 (EU-нумерация), положению 357 (EU-нумерация) и положению 370 (EU-нумерация), и положению 399 (EU-нумерация) и положению 409 (EU-
30 нумерация) в СН3-участке. Для нумерации константных областей антител можно использовать нумерацию, предложенную в публикации Кэбота с соавторами (Kabat E.A. и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, НИИ); а для нумерации константных областей тяжелых областей предложена EU-нумерация.

Более конкретно, например, в антигенсвязывающей молекуле, которая содержит два типа СНЗ-участков тяжелых цепей, один-три набора аминокислотных остатков в СНЗ-участке первой тяжелой цепи, которые выбирают из наборов аминокислотных остатков, указанных ниже в подпунктах (1)-(3), можно создавать так, чтобы они взаимно электрически отталкивались:

(1) аминокислотные остатки, находящиеся в СНЗ-участке тяжелой цепи в положении 356 и положении 439 согласно EU-нумерации;

(2) аминокислотные остатки, находящиеся в СНЗ-участке тяжелой цепи в положении 357 и положении 370 согласно EU-нумерации; и

(3) аминокислотные остатки, находящиеся в СНЗ-участке тяжелой цепи в положении 399 и положении 409 согласно EU-нумерации.

Кроме того, антитело может представлять собой антитело, которое имеет набор аминокислотных остатков в СНЗ-участке второй тяжелой цепи, отличный от набора в СНЗ-участке вышеуказанной второй тяжелой цепи, где набор аминокислотных остатков выбирают из наборов аминокислотных остатков, указанных выше в подпунктах (1)-(3), и где один-три набора аминокислотных остатков, которые соответствуют наборам аминокислотных остатков, представленных выше в подпунктах (1)-(3), которые взаимно электрически отталкиваются, в СНЗ-участке первой тяжелой цепи, не отталкиваются электрически от соответствующих аминокислотных остатков в СНЗ-участке первой тяжелой цепи.

Аминокислотные остатки, указанные выше в подпунктах (1)-(3), приближаются друг к другу при ассоциации. Специалисты в данной области могут определять сайты, соответствующие аминокислотным остаткам, указанным в упомянутых выше подпунктах (1)-(3), для требуемого СНЗ-участка тяжелой цепи или константной области тяжелой цепи путем гомологичного моделирования и подобных методов с использованием поступающего в продажу программного обеспечения и для соответствующей модификации аминокислотных остатков в этих сайтах.

Касательно вышеуказанной антигенсвязывающей молекулы понятие «электрически отталкиваются», «имеют одинаковый заряд» или «несущие одинаковый заряд» означает, что, например, любые два или большее количество

аминокислотных остатков представляют собой аминокислотные остатки, входящие в любую одну из групп (X) и (Y), указанных в настоящем описании.

В предпочтительном варианте вышеуказанной антигенсвязывающей молекулы СНЗ-участок первой тяжелой цепи и СНЗ-участок второй тяжелой цепи могут перекрестно связываться дисульфидными связями.

В настоящем описании аминокислотный остаток, подвергнутый «модификации», не ограничен аминокислотным остатком вариабельной области антигенсвязывающей молекулы или константной области антитела, которые указаны выше. Специалисты в данной области могут определять аминокислотные остатки, которые образуют поверхность раздела, в варианте полипептида или в гетеромерном мультимере путем гомологичного моделирования и подобных методов с использованием поступающего в продажу программного обеспечения и для модификации аминокислотных остатков в указанных сайтах, с целью регуляции ассоциации. Гомологичное моделирование представляет собой технологию прогнозирования трехмерной структуры белка, с применением поступающего в продажу программного обеспечения. При построении структуры белка с неизвестной трехмерной структурой в первую очередь осуществляют поиск белка, для которого известно, что он обладает высокогомологичной трехмерной структурой с белком. Затем, используя эту трехмерную структуру в качестве матрицы, конструируют структуру белка с неизвестной структурой, и структуру также оптимизируют с применением методов молекулярной динамики и подобных методов для прогнозирования трехмерной структуры неизвестного белка.

При осуществлении метода интродукции электрического отталкивания в поверхность раздела вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи для подавления нежелательной ассоциации тяжелой цепи и легкой цепи, примеры аминокислотных остатков, которые контактируют на поверхности раздела вариабельной области тяжелой цепи (VH) и вариабельной области легкой цепи (VL), включают глутамин (Q) в положении 39 согласно нумерации Кэбота в VH (FR2-участок) и соприкасающийся (контактирующий) глутамин (Q) в положении 38 согласно нумерации Кэбота в VL (FR2-участок). Кроме того, предпочтительным примером является лейцин (L) в положении 45 согласно нумерации Кэбота в VH (FR2) и соприкасающийся пролин (P) в

положении 44 согласно нумерации Кэбота в VL (FR2). Для нумерации указанных областей использовали нумерацию, предложенную в публикации Кэбота с соавторами (Kabat E.A. и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, НИИ, 1991).

5 Поскольку известно, что эти аминокислотные остатки являются высоко консервативными в организмах человека и мыши (J. Mol. Recognit. 16, 2003, сс. 113-120), то ассоциацию переменных областей антигенсвязывающих молекул можно регулировать в случае ассоциации VH-VL антигенсвязывающих молекул, отличных от указанных в примерах, путем модификации аминокислотных
10 остатков, соответствующих вышеупомянутым аминокислотным остаткам.

 Кроме того, в некоторых вариантах осуществления изобретения в мультиспецифической антигенсвязывающей молекуле два или большее количество аминокислотных остатков, которые образуют поверхность раздела между переменной областью тяжелой цепи и переменной областью легкой
15 цепи, представляют собой аминокислотные остатки, которые электростатически отталкиваются друг от друга.

 Конкретным примером является антигенсвязывающая молекула, в которой два или большее количество аминокислотных остатков, образующих поверхность раздела VH и VL, представляют собой аминокислотные остатки, которые взаимно электрически отталкиваются. Более конкретно, примеры
20 включают антигенсвязывающую молекулу с одним набором или двумя наборами аминокислотных остатков, выбранных из группы, которая состоит из наборов аминокислотных остатков, представленных ниже в подпунктах (а) или (б):

 (а) аминокислотный остаток, находящейся в VH в положении 39 согласно нумерации Кэбота, и аминокислотный остаток, находящейся в VL в положении
25 38 согласно нумерации Кэбота; или

 (б) аминокислотный остаток, находящейся в VH в положении 45 согласно нумерации Кэбота, и аминокислотный остаток, находящейся в VL в положении 44 согласно нумерации Кэбота.

30 В некоторых вариантах осуществления изобретения в мультиспецифической антигенсвязывающей молекуле аминокислотные остатки, которые электростатически отталкиваются друг от друга, входят в один или два

набора аминокислотных остатков, выбранных из группы, которая состоит из наборов аминокислотных остатков, представленных ниже в подпунктах (а) и (б):

(а) аминокислотный остаток в вариабельной области тяжелой цепи, который находится в положении 39 согласно нумерации Кэбота, и
5 аминокислотный остаток в вариабельной области тяжелой цепи, который находится в положении 38 согласно нумерации Кэбота,

(б) аминокислотный остаток в вариабельной области тяжелой цепи, который находится в положении 45 согласно нумерации Кэбота, и
10 аминокислотный остаток в вариабельной области тяжелой цепи, который находится в положении 44 согласно нумерации Кэбота.

Каждый из аминокислотных остатков, указанных выше в подпункте (а) или (б), приближается друг к другу при ассоциации. Специалисты в данной области могут определять сайты, соответствующие аминокислотным остаткам, указанным в упомянутом выше подпункте (а) или (б), в требуемой VH или VL
15 СНЗ-участка тяжелой цепи или константной области тяжелой цепи путем гомологичного моделирования и подобных методов с использованием поступающего в продажу программного обеспечения и для соответствующей модификации аминокислотных остатков в этих сайтах.

В некоторых вариантах осуществления изобретения в
20 мультиспецифической антигенсвязывающей молекуле аминокислотные остатки, которые электростатически отталкиваются друг от друга, выбирают из аминокислотных остатков, включенный в любой указанный ниже набор (X) или набор (Y):

(X) глутаминовая кислота (E), аспарагиновая кислота (D),

25 (Y) лизин (K), аргинин (R), гистидин (H).

При осуществлении метода модификации аминокислотных остатков, образующих гидрофобное ядро, присутствующих на поверхности раздела VH и VL, в полярные аминокислоты, имеющие электрический заряд, для подавления
30 непреднамеренной ассоциации тяжелой цепи и легкой цепи, предпочтительные примеры аминокислотных остатков, которые могут образовывать гидрофобное ядро на поверхности раздела VH и VL, включают лейцин (L) в положении 45 согласно нумерации Кэбота в VH (FR2), и соприкасающийся пролин (P) в положении 44 согласно нумерации Кэбота в VL (FR2). Для нумерации указанных

областей использовали нумерацию, предложенную в публикации Кэбота с соавторами (Kabat E.A. и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, НИИ, 1991).

5 Как правило, понятие «гидрофобное ядро» относится к участку, образуемому путем сборки боковых цепей гидрофобной аминокислоты внутри ассоциированных полипептидов. Примеры гидрофобных аминокислот включают аланин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, пролин, триптофан и валин. Кроме того, в образовании гидрофобного ядра могут принимать участие аминокислотные остатки, отличные от гидрофобных аминокислот (например, 10 остатки тирозина). Это гидрофобное ядро вместе с гидрофильной поверхностью, на которой боковые цепи гидрофильной аминокислоты экспонируются наружу, становится движущей силой, содействующей ассоциации водорастворимых полипептидов. Если гидрофобные аминокислоты двух разных доменов присутствуют на поверхности молекулы и открыты для воздействия молекул 15 воды, энтропия должна возрастать и свободная энергия должна возрастать. Соответственно, два домена могут вступать в ассоциацию друг с другом для снижения свободной энергии и приобретения устойчивости, и гидрофобные аминокислоты на поверхности раздела маскируются внутри молекулы с образованием гидрофобного ядра.

20 Считается, что при ассоциации полипептидов образование гидрофобного ядра ингибируется модификацией образующих гидрофобное ядро гидрофобных аминокислот в полярные аминокислоты, имеющие электрический заряд; и в результате, вероятно, ассоциация полипептидов будет подавляться.

25 Специалисты в данной области могут определять присутствие или отсутствие гидрофобного ядра, образование сайта (области) и т.п. путем анализа аминокислотных последовательностей для требуемой антигенсвязывающей молекулы. Так, антигенсвязывающая молекула, предлагаемая в настоящем изобретении, представляет собой антигенсвязывающую молекулу, отличающуюся тем, что аминокислотные остатки, которые могут образовывать 30 гидрофобное ядро на поверхности раздела, представляют собой модифицированные аминокислотные остатки, которые имеют электрический заряд. Более конкретно, примеры включают антигенсвязывающую молекулу, в которой аминокислотные остатки, указанные ниже в подпункте (1) или (2),

представляют собой аминокислотные остатки, имеющие электрический заряд. Боковые цепи аминокислотных остатков, которые представлены ниже в подпунктах (1) и (2), являются смежными друг к другу и могут образовывать гидрофобное ядро:

5 (1) аминокислотный остаток, находящийся в VH в положении 45 согласно нумерации Кэбота; и

(2) аминокислотный остаток, находящийся в VL в положении 44 согласно нумерации Кэбота.

10 Предпочтительные примеры имеющих электрический заряд аминокислотных остатков в вышеуказанной антигенсвязывающей молекуле включают глутаминовую кислоту (E), аспарагиновую кислоту (D), лизин (K), аргинин (R) и гистидин (H). Более предпочтительные примеры включают глутаминовую кислоту (E) и лизин (K).

15 Как правило, аминокислотными остатками, указанными выше в подпунктах (1) и (2), у человека и мышей являются соответственно:

(1) лейцин (L) и

(2) пролин (P).

20 Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанные аминокислотные остатки подвергают модификации (такой как замена на аминокислоты, имеющие электрический заряд). Кроме того, типы вышеуказанных в подпунктах (1) и (2) аминокислотных остатков не обязательно ограничены вышеуказанными аминокислотными остатками, они могут представлять собой также другие аминокислоты, эквивалентные этим аминокислотным остаткам.

25 К антигенсвязывающим молекулам, предлагаемым в настоящем изобретении, можно применять другие известные технологии. Например, для содействия ассоциации первой VH (VH1) и первой VL (VL1) и/или второй VH (VH2) и второй VL (VL2) можно заменять боковую цепь аминокислоты, присутствующую в вариабельной области одной из H-цепей, боковой цепью
30 большего размера (выступ), а боковую цепь аминокислоты, присутствующую в противоположной вариабельной области другой H-цепи, можно заменять на боковую цепь меньшего размера (впадина), таким образом, чтобы выступ мог помещаться во впадину и ассоциация VH1 и VL1 и/или VH2 и VL2 усиливалась;

в результате чего можно дополнительно подавлять ассоциацию VH1 и VL2 и/или VH2 и VL1.

Например, в случае человеческого IgG1 для того, чтобы превратить боковую цепь аминокислоты в СНЗ-участке одной Н-цепи в боковую цепь
5 большего размера (выступ), осуществляют модификации Y349C и T366W, а для того, чтобы превратить боковую цепь аминокислоты в СНЗ-участке другой Н-цепи в боковую цепь меньшего размера, осуществляют модификации D356C, T336S, L368A и Y407V.

В некоторых вариантах осуществления изобретения в
10 мультиспецифической антигенсвязывающей молекуле Fc-домен состоит из первой субъединицы Fc-области и второй субъединицы Fc-области, которые обладают способностью к стабильной ассоциации.

В некоторых вариантах осуществления изобретения в мультиспецифической антигенсвязывающей молекуле Fc-домен содержит
15 варианты, указанные ниже в подпункте (д1) или (д2):

(д1) первая субъединица Fc-области, содержащая Cys в положении 349, Ser в положении 366, Ala в положении 368 и Val в положении 407, и вторая субъединица Fc-области, содержащая Cys в положении 354 и Trp в положении 366;

20 (д2) первая субъединица Fc-области, содержащая Glu в положении 349 и вторая субъединица Fc-области, содержащая Lys в положении 356, где положения аминокислот пронумерованы согласно EU-нумерации.

Например, технология «knob-into-hole» (выступ-во-впадину) описана, например, в US 5731168; US 7695936; у Ridgway и др., Prot Eng 9, 1996, сс. 617-
25 621 и Carter, J Immunol Meth 248, 2001, сс. 7-15). Как правило, метод включает интродукцию выпуклости («выступ») на поверхность раздела первого полипептида и соответствующей полости («впадина») в поверхность раздела второго полипептида, так, что выпуклость могла помещаться во впадину, способствуя образованию гетеродимера и препятствуя образованию гомодимера.
30 Выпуклости создают путем замены небольших боковых цепей аминокислот из поверхности раздела первого полипептида на боковые цепи большего размера (например, тирозин или триптофан). Создают компенсаторные полости идентичного или меньшего размера по сравнению с размером выпуклостей в

поверхности раздела второго полипептида путем замены крупных боковых цепей аминокислот на боковые цепи меньшего размера (например, аланин или треонин).

К антигенсвязывающим молекулам, предлагаемым в настоящем изобретении, можно применять и другие известные технологии. Требуемую антигенсвязывающую молекулу можно эффективно получать путем комплементарной ассоциации СНЗ, используя сконструированный для обмена цепями домен СНЗ, в котором часть СНЗ одной Н-цепи антигенсвязывающей молекулы заменяют на последовательность, полученную из IgA, соответствующую указанному участку, и комплементарный участок СНЗ другой Н-цепи интродуцируют в последовательность, полученную из IgA, которая соответствует этому участку (Protein Engineering Design & Selection, 23, 2010, сс. 195-202).

К антигенсвязывающим молекулам, предлагаемым в настоящем изобретении, можно применять и другие известные технологии. При получении биспецифических антител требуемое биспецифическое антитело можно получать, например, путем обеспечения разницы изоэлектрических точек посредством создания различных аминокислотных модификаций для каждой из переменных областей двух типов Н-цепей и использования указанной разницы изоэлектрических точек для очистки с помощью ионообменной хроматографии (WO 2007/114325).

К антигенсвязывающей молекуле, предлагаемой в настоящем изобретении, можно применять также технологию модификации аминокислотного остатка в положении 435 согласно EU-нумерации, который является сайтом, ответственным за связывание между IgG и белком А, в аминокислоту, обладающую другой силой связывания с белком А, такую как Arg, в комбинации с вышеописанными технологиями. Путем применения указанной технологии можно изменять взаимодействие между Н-цепью и белком А, и с использованием колонки с белком А можно эффективно очищать только гетеродимерные антигенсвязывающие молекулы. Указанную технологию можно применять также независимо без объединения с другими вышеуказанными технологиями.

К антигенсвязывающим молекулам можно применять также модификации, указанные в настоящем изобретении, например, одну из указанных ниже модификаций, например, к антигенсвязывающей молекуле, которая имеет структуру, в которой для усиления ассоциации первой VH (VH1) и первой VL (VL1) и/или второй VH (VH2) и второй VL (VL2) VH1 связывают с Fc-областью через первый CH1, а VL1 связывают с первой CL, и VH2 связывают с другой Fc-областью через вторую CL, а VL2 связывают со вторым CH1 (WO 09/80254).

К антигенсвязывающим молекулам, предлагаемым в настоящем изобретении, можно применять несколько, например, две или большее количество вышеуказанных известных технологий в комбинации друг с другом. Кроме того, антигенсвязывающую молекулу, предлагаемую в настоящем изобретении, можно получать на основе антитела, подвергнутого модификациям с применением вышеуказанных известных технологий.

Кроме того, в настоящем изобретении предложен способ получения антигенсвязывающей молекулы, в которой регулируют ассоциацию между тяжелой цепью и легкой цепью. Предпочтительным вариантом способа получения, предлагаемого в настоящем изобретении, является способ получения антигенсвязывающей молекулы, в которой регулируют ассоциацию между тяжелой цепью и легкой цепью, включающий:

(1) такую модификацию нуклеиновых кислот, кодирующих CH1 и CL, при которой один набор или два, или большее количество наборов аминокислотных остатков, выбранных из группы, которая состоит из наборов аминокислотных остатков, указанных ниже в подпунктах (а)-(в), представляющих собой аминокислотные остатки, которые электростатически отталкиваются друг от друга:

(а) аминокислотный остаток в константной области тяжелой цепи (CH1), который находится в положении 175 согласно EU-нумерации, и аминокислотный остаток в константной области легкой цепи (CL), который находится в положении 131 согласно нумерации Кэбота,

(б) аминокислотный остаток в CH1, который находится в положении 175 согласно EU-нумерации, и аминокислотный остаток в CL, который находится в положении 160 согласно нумерации Кэбота,

(в) аминокислотные остатки в СН1, которые находятся в положениях 175 согласно EU-нумерации, и аминокислотные остатки в СL, которые находятся в положениях 131 и 160 согласно нумерации Кэбота ,

5 (г) аминокислотные остатки в СН1, которые находятся в положениях 147 и 175 согласно EU-нумерации, и аминокислотные остатки в СL, которые находятся в положениях 131 и 160 согласно нумерации Кэбота;

(2) интродукцию модифицированных нуклеиновых кислот в клетку-хозяина и такое культивирование клетки-хозяина, чтобы происходила экспрессия нуклеиновых кислот; и

10 (3) сбор антигенсвязывающей молекулы из клеточной культуры клетки-хозяина.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу получения, включающему на вышеуказанной стадии (1) такую модификацию нуклеиновых кислот, при которой аминокислотные остатки, электрически отталкивающиеся друг от друга, выбирают из аминокислотных остатков, входящих в любую из групп (X) и (Y), указанных выше в настоящем описании.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу получения, включающему на вышеуказанной стадии (1) такую модификацию нуклеиновых кислот, при которой два или большее количество аминокислотных остатков, образующих поверхность раздела VH и VL, представляют собой аминокислотные остатки, которые электрически отталкиваются друг от друга. Предпочтительно аминокислотные остатки, которые электрически отталкиваются друг от друга, представляют собой любой набор аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей, например, из наборов аминокислотных остатков, указанных ниже в подпунктах (а) и (б):

25 (а) аминокислотный остаток, находящийся в VH в положении 39 согласно нумерации Кэбота, и аминокислотный остаток, находящийся в VL в положении 38 согласно нумерации Кэбота; или

30 (б) аминокислотный остаток, находящийся в VH в положении 45 согласно нумерации Кэбота, и аминокислотный остаток, находящийся в VL в положении 44 согласно нумерации Кэбота.

Вышеуказанные аминокислотные остатки, которые электрически отталкиваются друг от друга, предпочтительно выбирают из аминокислотных

остатков, входящих в любой из наборов (X) и (Y), указанных выше в настоящем описании.

Кроме того, в настоящем описании предложен способ регуляции ассоциации тяжелых и легких цепей антигенсвязывающей молекулы.

5 Предпочтительным вариантом способа регуляции ассоциации, предлагаемого в настоящем изобретении, является способ регулирования ассоциации тяжелых и легких цепей антигенсвязывающей молекулы, включающий такую модификацию нуклеиновых кислот, при которой один набор или два, или большее количество наборов аминокислотных остатков, выбранных из группы, которая состоит из
10 наборов аминокислотных остатков, указанных ниже в подпунктах (а)-(в), представляют собой аминокислотные остатки, которые электростатически отталкиваются друг от друга:

(а) аминокислотный остаток в константной области тяжелой цепи (СН1), который находится в положении 175 согласно EU-нумерации, и аминокислотный
15 остаток в константной области легкой цепи (СL), который находится в положении 131 согласно нумерации Кэбота,

(б) аминокислотный остаток в СН1, который находится в положении 175 согласно EU-нумерации, и аминокислотный остаток в СL, который находится в положении 160 согласно нумерации Кэбота,

20 (в) аминокислотные остатки в СН1, которые находятся в положениях 175 согласно EU-нумерации, и аминокислотные остатки в СL, которые находятся в положениях 131 и 160 согласно нумерации Кэбота,

(г) аминокислотные остатки в СН1, которые находятся в положениях 147 и 175 согласно EU-нумерации, и аминокислотные остатки в СL, которые находятся
25 в положениях 131 и 160 согласно нумерации Кэбота.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу регуляции ассоциации, включающему на вышеуказанной стадии (1) такую модификацию нуклеиновых кислот, при которой аминокислотные остатки, электрически отталкивающиеся друг от друга, выбирают из аминокислотных остатков,
30 входящих в любую из групп (X) и (Y), указанных выше в настоящем описании.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу регуляции ассоциации, включающему на вышеуказанной стадии (1) такую модификацию нуклеиновых кислот, при которой два или большее количество аминокислотных

остатков, образующих поверхность раздела VH и VL, представляют собой аминокислотные остатки, которые электрически отталкиваются друг от друга. Согласно настоящему описанию аминокислотные остатки, которые электростатически отталкиваются друг от друга, предпочтительно представляют собой любой набор аминокислотных остатков, выбранных из группы, которая состоит, например, из наборов аминокислотных остатков, представленных ниже в подпунктах (а) и (б):

(а) аминокислотный остаток, находящийся в VH в положении 39 согласно нумерации Кэбота, и аминокислотный остаток, находящийся в VL в положении 38 согласно нумерации Кэбота;

(б) аминокислотный остаток, находящийся в VH в положении 45 согласно нумерации Кэбота, и аминокислотный остаток, находящийся в VL в положении 44 согласно нумерации Кэбота.

Согласно способу регуляции ассоциации, предложенному в настоящем изобретении, требуемое биспецифическое антитело можно получать предпочтительно и эффективно согласно описанному ранее. А именно, требуемый гетеромерный мультимер в форме биспецифического антитела может эффективно образовываться из смеси мономеров.

Фраза «модифицировать нуклеиновые кислоты» в вышеуказанных способах, предлагаемых в настоящем изобретении, относится к такой модификации нуклеиновых кислот, при которой они соответствуют аминокислотным остаткам, интродуцированным путем «модификаций», предложенных в настоящем изобретении. Более конкретно, понятие относится к модификации нуклеиновых кислот, кодирующих исходные (до модификации) аминокислотные остатки, в нуклеиновые кислоты, кодирующие аминокислотные остатки, подлежащие включению путем модификации. Как правило, для этого осуществляют манипуляции с генами или обработку с целью введения мутаций, которые должны приводить по меньшей мере к одной нуклеотидной inserции, делеции или замене в исходной нуклеиновой кислоте, приводящей к образованию кодонов, которые кодируют представляющие интерес аминокислотные остатки. Более конкретно, кодоны, кодирующие исходные аминокислотные остатки, заменяют кодонами, кодирующими аминокислотные остатки, подлежащие включению путем модификации. Указанную модификацию

нуклеиновой кислоты специалисты в данной области могут осуществлять с использованием известных технологий, таких как сайтспецифический мутагенез и ПЦР-мутагенез. Кроме того, в настоящем изобретении предложены нуклеиновые кислоты, которые кодируют антигенсвязывающую молекулу, предлагаемую в настоящем изобретении. Кроме того, в настоящее изобретение включены также векторы, несущие нуклеиновые кислоты.

В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-домен мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы состоит из пары полипептидных цепей, содержащих домены тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина. Например, Fc-домен молекула иммуноглобулина G (IgG) представляет собой димер, каждая субъединица которого содержит константные домены CH2 и CH3 тяжелой цепи IgG. Две субъединицы Fc-домена обладают способностью к стабильной ассоциации друг с другом. В одном из вариантов осуществления изобретения мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, указанная в настоящем описании, содержит не более одного Fc-домена.

В одном из вариантов осуществления изобретения, указанных в настоящем описании, Fc-домен мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы представляет собой Fc-домен IgG. В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG1. В другом варианте осуществления изобретения Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG1. В следующем варианте осуществления изобретения Fc-домен представляет собой Fc-область человеческого IgG1.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая дополнительно содержит Fc-домен, отличающийся пониженной аффинностью связывания с человеческим Fc-гамма рецептором по сравнению с нативным Fc-доменом человеческого IgG1,

при этом Fc-домен отличается также более сильной аффинностью связывания с FcRn, таким как человеческий FcRn, по сравнению с нативным Fc-доменом человеческого IgG1.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая

также Fc-домен, отличающийся пониженной аффинностью связывания с человеческим Fc-гамма рецептором по сравнению с нативным Fc-доменом человеческого IgG1,

5 в которой первая и/или субъединица Fc-области, входящая в Fc-домен, содержит Leu в положении 428, Ala в положении 434, Arg в положении 438 и Glu в положении 440,

где нумерацию аминокислотных положений осуществляют согласно EU-нумерации.

10 В некоторых вариантах осуществления изобретения в мультиспецифической антигенсвязывающей молекуле Fc-домен дополнительно отличается более высокой аффинностью связывания с FcRn, таким как человеческий FcRn, по сравнению с нативным Fc-доменом человеческого IgG1.

15 В некоторых вариантах осуществления изобретения в мультиспецифической антигенсвязывающей молекуле первая и/или субъединица Fc-области содержит Leu в положении 428, Ala в положении 434, Arg в положении 438 и Glu в положении 440,

где нумерацию аминокислотных положений осуществляют согласно EU-нумерации.

20 Биспецифические антитела IgG-типа секретируют путем интродукции генов L-цепей и H-цепей, которые образуют два типа представляющих интерес IgG, т.е. в целом четырех генов, в клетки, и их совместной экспрессии. Однако количество комбинаций H- и L-цепей IgG, которые можно получать с помощью таких методов, теоретически составляет десять комбинаций. В результате трудно очищать содержащий требуемую комбинацию H- и L-цепей IgG из десяти 25 типов IgG. Кроме того, теоретически уровень секреции IgG, имеющего требуемую комбинацию, может значительно снижаться, и поэтому потребуется крупномасштабное культивирование, а затраты на производство еще больше возрастут.

30 Таким образом, технологии, способствующие ассоциации между H-цепями и между L- и H-цепями, имеющими требуемые комбинации, можно применять к мультиспецифическим антигенсвязывающим молекулам, предлагаемым в настоящем изобретении.

Например, технологии подавления нежелательной ассоциации Н-цепей путем электростатического отталкивания на поверхности раздела второй константной области или третьей константной области Н-цепи антитела (СН2 или СН3) можно применять для ассоциации в мультиспецифическом антителе (WO 2006/106905).

В настоящем изобретении аминокислотные остатки, подвергнутые модификации, не ограничены вышеуказанными аминокислотными остатками переменных областей антитела или константных областей антитела.

Специалисты в данной области могут идентифицировать аминокислотные остатки, которые образуют поверхность раздела, в мутантных полипептидах или гетеромультимерах путем гомологичного моделирования и подобных методов с использованием поступающего в продажу программного обеспечения; аминокислотные остатки в этих положениях затем можно подвергать такой модификации, чтобы регулировать ассоциацию.

Для ассоциации в мультиспецифических антителах, предлагаемых в настоящем изобретении, можно применять другие известные технологии. Содержащие Fc-область полипептиды, которые содержат различные аминокислоты, можно эффективно связывать друг с другом путем замены боковой цепи аминокислоты, присутствующей в Fc-областях одной из цепей антитела на боковую цепь большего размера (выступ), и замены боковой цепи аминокислоты, присутствующей в соответствующей Fc-области другой Н-цепи, на боковую цепь меньшего размера (впадина), обеспечивая размещение выступа во впадине. Метод «knob(s)-into-hole(s)» дополнительно будет обсужден в настоящем описании.

Кроме того, для создания мультиспецифических антител, предлагаемых в настоящем изобретении, можно применять другие известные технологии. Ассоциацию полипептидов, содержащих различные последовательности, можно эффективно индуцировать путем комплементарной ассоциации СН3, используя сконструированный для обмена цепями домен СН3, полученный путем замены части СН3 одной Н-цепи антитела на последовательность, полученную из IgA, соответствующую указанному участку, и интродукции соответствующей полученной из IgA последовательности в комплементарный участок СН3 другой Н-цепи (Protein Engineering Design & Selection, 23, 2010, сс. 195-202). Указанную

известную технологию можно применять также для эффективного создания представляющих интерес мультиспецифических антител.

Кроме того, для создания мультиспецифических антител можно применять технологии получения антител, основанные на использовании ассоциации СН1 и
5 СL антитела и ассоциация VH и VL антитела, описанные в WO 2011/028952, WO2014/018572 и в Nat Biotechnol. 32(2), февраль 2014 г., сс. 191-198; технологии получения биспецифических антител с использованием в комбинации отдельно полученных моноклональных антител (обмен Fab-плеча), описанные в WO 2008/119353 и WO 2011/131746; технологии регулирования
10 ассоциации между СН3-участками тяжелых цепей антитела, описанные в WO 2012/058768 и WO 2013/063702; технологии получения биспецифических антител, состоящих из двух типов легких цепей и одного типа тяжелой цепи, описанные в WO 2012/023053; технологии получения биспецифических антител с использованием двух штаммов бактериальных клеток, которые индивидуально
15 экспрессируют одну из цепей антитела, которое содержит одну H-цепь и одну L-цепь, описанные у Christoph и др., Nature Biotechnology т. 31, 2013, сс. 753-758); и т.п.

Альтернативно этому, даже, если представляющее интерес мультиспецифическое антитело не удастся эффективно создавать,
20 мультиспецифическое антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, можно получать путем отделения и очистки представляющего интерес мультиспецифического антитела из полученных антител. Например, описан метод, позволяющий осуществлять очистку двух типов гомомерных форм и представляющего интерес гетеромерного антитела методом ионообменной
25 хроматографии путем придания разницы в изоэлектрических точках посредством интродукции аминокислотных замен в переменные области двух типов H-цепей (WO 2007114325). На сегодняшний день в качестве метода очистки гетеромерных антител описаны методы, в которых используют белок А для очистки гетеродимерного антитела, содержащего H-цепь мышинового IgG2a,
30 которая связывается с белком А, и H-цепь крысиного IgG2b, которая не связывается с белком А (WO 98/050431 и WO 95/033844). Кроме того, гетеродимерное антитело можно эффективно очищать само по себе с использованием H-цепей, содержащих замену аминокислотных остатков в

положениях 435 и 436 согласно EU-нумерации, которые представляют собой сайт связывания IgG-белок А, на Туг, His или подобный остаток, которые представляют собой аминокислоты, которые обладают другим средством к белку А, или с использованием Н-цепей с другим средством к белку А, полученных в соответствии с методом, описанным в референс-примере 5, для изменения взаимодействия каждой из Н-цепей с белком А, а затем с использованием колонки с белком А.

Кроме того, в качестве Fc-области, предлагаемой в настоящем изобретении, можно соответствующим образом использовать Fc-область с повышенной гетерогенностью С-конца Fc-области. Более конкретно в настоящем изобретении предложены Fc-области, полученные путем делеции глицина в положении 446 и лизина в положении 447 согласно EU-нумерации из аминокислотных последовательностей двух полипептидов, образующих Fc-область, полученную из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

Несколько, например, две или большее количество указанных технологий можно применять в комбинации. Кроме того, эти технологии можно надлежащим образом и по отдельности применять к двум Н-цепям, подлежащим ассоциации. Кроме того, эти технологии можно применять в комбинации с указанной выше Fc-областью, которая обладает пониженной активностью связывания с Fc-гамма рецептором. Кроме того, антигенсвязывающая молекула, предлагаемая в настоящем изобретении, может представлять собой молекулу, полученную отдельно таким образом, чтобы она имела такую же аминокислотную последовательность, основываясь на антигенсвязывающей молекуле, подвергнутой вышеописанным модификациям.

В некоторых вариантах осуществления изобретения мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит один или несколько аминокислотных остатков, указанных ниже в подпунктах (I)-(XII):

(I) глутаминовая кислота или лизин в положении 175 (EU-нумерация) в константной области тяжелой цепи;

(II) глутаминовая кислота в положении 147 (EU-нумерация) в константной области тяжелой цепи;

(III) глутаминовая кислота или лизин в положении 131 (нумерация по Кэботу) в константной области легкой цепи;

(IV) глутаминовая кислота или лизин в положении 160 (нумерация по Кэботу) в константной области легкой цепи;

(V) аргинин в положении 235 (EU-нумерация) в константной области тяжелой цепи;

5 (VI) аргинин в положении 236 (EU-нумерация) в константной области тяжелой цепи;

(VII) лизин в положении 356 (EU-нумерация) в константной области тяжелой цепи;

10 (VIII) лейцин в положении 428 (EU-нумерация) в константной области тяжелой цепи;

(IX) аланин в положении 434 (EU-нумерация) в константной области тяжелой цепи;

(X) аргинин в положении 438 (EU-нумерация) в константной области тяжелой цепи;

15 (XI) глутаминовая кислота в положении 439 (EU-нумерация) в константной области тяжелой цепи;

(XII) глутаминовая кислота в положении 440 (EU-нумерация) в константной области тяжелой цепи.

20 В некоторых вариантах осуществления изобретения мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула представляет собой биспецифическое антитело, содержащее:

25 первую тяжелую цепь, которая содержит лизин в положении 175 (EU-нумерация), аргинин в положении 235 (EU-нумерация), аргинин в положении 236 (EU-нумерация), лейцин в положении 428 (EU-нумерация), аланин в положении 434 (EU-нумерация), аргинин в положении 438 (EU-нумерация), глутаминовую кислоту в положении 439 (EU-нумерация) и глутаминовую кислоту в положении 440 (EU нумерация);

30 первую легкую цепь, которая содержит глутаминовую кислоту в положении 131 (нумерация по Кэботу) и глутаминовую кислоту в положении 160 (нумерация по Кэботу);

вторую тяжелую цепь, которая содержит глутаминовую кислоту в положении 147 (EU-нумерация), глутаминовую кислоту в положении 175 (EU-нумерация), аргинин в положении 235 (EU-нумерация), аргинин в положении

236 (EU-нумерация), лизин в положении 356 (EU-нумерация), лейцин в положении 428 (EU-нумерация), аланин в положении 434 (EU-нумерация), аргинин в положении 438 (EU-нумерация) и глутаминовую кислоту в положении 440 (EU-нумерация); и

5 вторую легкую цепь, которая содержит лизин а в положении 131 (нумерация по Кэботу) и лизин в положении 160 (нумерация по Кэботу).

В некоторых вариантах осуществления изобретения в мультиспецифической антигенсвязывающей молекуле:

10 первая тяжелая цепь дополнительно содержит глутаминовую кислоту в положении 419 (EU-нумерация) и пролин в положении 445 (EU-нумерация) и аминокислотную делецию в положениях 446 и 447 (EU-нумерация); и

 вторая тяжелая цепь дополнительно содержит лизин в положении 196 (EU-нумерация), пролин в положении 445 (EU-нумерация) и аминокислотную делецию в положениях 446 и 447 (EU-нумерация).

15 В некоторых вариантах осуществления изобретения в мультиспецифической антигенсвязывающей молекуле:

20 первая тяжелая цепь дополнительно содержит глицин в положении 16 (нумерация по Кэботу), аланин в положении 32 (нумерация по Кэботу), валин в положении 35а (нумерация по Кэботу), аланин в положении 50 (нумерация по Кэботу), лизин в положении 61 (нумерация по Кэботу), глутаминовую кислоту в положении 64 (нумерация по Кэботу), треонин в положении 73 (нумерация по Кэботу), глутаминовую кислоту в положении 95 (нумерация по Кэботу) и валин в положении 102 (нумерация по Кэботу);

25 первая легкая цепь дополнительно содержит глутаминовую кислоту в положении 28 (нумерация по Кэботу), тирозин в положении 55 (нумерация по Кэботу), глутаминовую кислоту или тирозин в положении 56 (нумерация по Кэботу), глутаминовую кислоту в положении 92 (нумерация по Кэботу), валин в положении 94 (нумерация по Кэботу) и аланин в положении 95а (нумерация по Кэботу);

30 вторая тяжелая цепь дополнительно содержит глутаминовую кислоту в положении 28 (нумерация по Кэботу), аланин или глутаминовую кислоту в положении 30 (нумерация по Кэботу), глутаминовую кислоту в положении 31 (нумерация по Кэботу), триптофан в положении 32 (нумерация по Кэботу),

фенилаланин в положении 34 (нумерация по Кэботу) и метионин в положении 35 (нумерация по Кэботу), серин в положении 35а (нумерация по Кэботу), серин в положении 50 (нумерация по Кэботу), глутаминовую кислоту или глицин в положении 61 (нумерация по Кэботу), глутаминовую кислоту в положении 64 (нумерация по Кэботу) и глутаминовую кислоту в положении 65 (нумерация по Кэботу); и

вторая легкая цепь дополнительно содержит треонин в положении 25 (нумерация по Кэботу), лизин в положении 54 (нумерация по Кэботу), глутаминовую кислоту в положении 56 (нумерация по Кэботу), лейцин в положении 67 (нумерация по Кэботу), глутамин в положении 79 (нумерация по Кэботу) и лизин в положении 94 (нумерация по Кэботу).

Антитела, получаемые из библиотек

Антитела, предлагаемые в изобретении, можно выделять путем скрининга комбинаторных библиотек антител с требуемой активностью или видами активности. Например, в данной области известны разнообразные методы для создания фаговых дисплейных библиотек и скрининга указанных библиотек в отношении антител, обладающих требуемыми характеристиками связывания. Указанные методы обобщены, например, у Hoogenboom и др. в: *Methods in Molecular Biology* 178, 2001, сс. 1-37 (под ред. O'Brien и др., изд-во Human Press, Totowa, NJ, 2001), и описаны также, например, у McCafferty и др., *Nature* 348, 1990, сс. 552-554; Clackson и др., *Nature* 352, 1991, сс. 624-628; Marks и др., *J. Mol. Biol.* 222, 1992, сс. 581-597; Marks и Bradbury в: *Methods in Molecular Biology* 248, 2003, сс. 161-175 (под ред. Lo, изд-во Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu и др., *J. Mol. Biol.* 338, 2004, сс. 299-310; Lee и др., *J. Mol. Biol.* 340, 2004, сс. 1073-1093; Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 2004, сс. 12467-12472 и Lee и др., *J. Immunol. Methods* 284, 2004, сс. 119-132.

При осуществлении некоторых методов фагового дисплея популяции VH- и VL-генов клонируют по отдельности с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и рекомбинируют произвольно в фаговых библиотеках, которые затем подвергают скринингу в отношении антигенсвязывающего фага согласно методу, описанному у Winter и др., *Ann. Rev. Immunol.* 12, 1994, сс. 433-455. Фаг, как правило, экспонирует фрагменты антител либо в виде одноцепочечных Fv-фрагментов (scFv), либо в виде Fab-фрагментов. Библиотеки, полученные из

иммунизированных источников, включают антитела, обладающие высокой активностью в отношении иммуногена, при этом отсутствует необходимость в создании гибридом. Альтернативно этому, можно клонировать необработанную («наивную») популяцию (например, из организма человека), получая один источник антител к широкому спектру чужих, а также своих антигенов без какой-либо иммунизации, что описано у Griffiths и др., EMBO J, 12, 1993, сс. 725-734. И, наконец, «наивные» библиотеки можно получать также методами синтеза путем клонирования неперегруппированных сегментов V-гена из стволовых клеток и с помощью ПЦР-праймеров, содержащих случайную последовательность, для кодирования гипервариабельных CDR3-участков и для осуществления перегруппировки *in vitro* согласно методу, описанному у Hoogenboom и Winter, J. Mol. Biol. 227, 1992, сс. 381-388. Фаговые библиотеки человеческих антител описаны, например, в следующих патентных публикациях: патент США № 5750373 и публикациях заявок на патент США 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 и 2009/0002360.

Антитела или фрагменты антител, выделенные из библиотек человеческих антител, в контексте настоящего описания рассматриваются как человеческие антитела или фрагменты человеческих антител.

Варианты гликозилирования

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, представленное в настоящем описании, изменяют с целью повышения или понижения степени гликозилирования антитела. Добавление или делецию сайтов гликозилирования антитела можно легко осуществлять путем такого изменения аминокислотной последовательности, которое позволяет создавать или удалять один или несколько сайтов гликозилирования.

Если антитело содержит Fc-область, то можно изменять присоединенный к ней углевод. Нативные антитела, которые продуцируются клетками млекопитающих, как правило, содержат разветвленный биантенный олигосахарид, который, как правило, присоединен с помощью N-связи к Asn297 CH2-домена Fc-области (см., например, Wright и др., TIBTECH 15, 1997, сс. 26-32). Олигосахарид может включать различные углеводы, например, маннозу, N-ацетилглюкозамин (GlcNAc), галактозу и сиаловую кислоту, а также фукозу,

присоединенную к GlcNAc в «стебле» биантенной олигосахаридной структуры. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификации олигосахарида в антителе, предлагаемом в изобретении, можно осуществлять для создания вариантов антитела с определенными улучшенными свойствами.

5 Одним из вариантов осуществления изобретения являются варианты антитела, имеющие углеводную структуру, в которой снижено содержание фукозы, присоединенной (прямо или косвенно) к Fc-области. Например, содержание фукозы в указанном антителе может составлять от 1% до 80%, от 1% до 65%, от 5% до 65% или от 20% до 40%. Содержание фукозы определяют
10 путем расчета среднего содержания фукозы в сахарной цепи на Asn²⁹⁷ относительно суммы всех гликоструктур, присоединенных к Asn²⁹⁷ (например, комплексных, гибридных структур и структур с высоким содержанием маннозы), которое измеряют с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрии согласно методу, описанному, например, в WO 2008/077546. Asn²⁹⁷ обозначает
15 остаток аспарагина, присутствующий примерно в положении 297 в Fc-области (EU-нумерация остатков Fc-области); однако вследствие минорных вариаций последовательности антитела Asn²⁹⁷ может располагаться также в положении, находящемся на расстоянии примерно ± 3 аминокислоты в прямом или обратном направлении от положения 297, т.е. между положениями 294 и 300. Указанные
20 фукозилированные варианты могут обладать улучшенной ADCC-функцией (см., например, публикации патентов США 2003/0157108 (Presta L.); 2004/0093621 (фирма Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Примерами публикаций, касающихся «дефукозилированных» вариантов антител или вариантов антител «с дефицитом фукозы» являются: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US
25 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; WO 2002/031140; Okazaki и др., J. Mol. Biol. 336, 2004, сс. 1239-1249; Yamane-Ohnuki и др., Biotech. Bioeng. 87, 2004, с. 614). Примерами клеточных линий, которые
30 обладают способностью продуцировать дефукозилированные антитела, являются Lec13 CHO-клетки с дефицитом белкового фукозилирования (Ripka и др., Arch. Biochem. Biophys. 249, 1986, сс. 533-545; US 2003/0157108 (на имя Presta L.) и WO 2004/056312 (на имя Adams и др., см., прежде всего, пример 11), и

клеточные линии с «выключенным» геном, например, СНО–клетки с «выключенным» геном альфа-1,6-фукозилтрансферазы, FUT8 (см., например, Yamane-Ohnuki и др., *Biotech. Bioeng.* 87, 2004, с. 614); Kanda и др., *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4), 2006, сс. 680-688; и WO 2003/085107).

5 Кроме того, описаны варианты антител с бисекционными олигосахаридами, например, в которых биантенный олигосахарид, присоединенный к Fc-области антитела, бисекционируется с помощью GlcNAc. Указанные варианты антител могут отличаться пониженным уровнем фукозилирования и/или повышенной ADCC-функцией. Примеры указанных вариантов антител описаны, например, в
10 WO 2003/011878 (на имя Jean-Mairet и др.); патенте США № 6602684 (на имя Umana и др.) и US 2005/0123546 (на имя Umana и др.). Предложены также варианты антител по меньшей мере с одним остатком галактозы в олигосахариде, присоединенном к Fc-области. Указанные варианты антител могут обладать повышенной CDC-функцией. Указанные варианты антител
15 описаны, например, в WO 1997/30087 (на имя Patel и др.); WO 1998/58964 (на имя Raju S.); и WO 1999/22764 (на имя Raju S.).

В предпочтительных вариантах осуществления изобретения в упомянутых выше антителах СН3-участок первой Н-цепи и СН3-участок второй Н-цепи могут быть перекрестно сшиты дисульфидными связями.

20 Мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, полученные согласно методам, указанным в настоящем описании, можно очищать с помощью технологий, хорошо известных в данной области, таких как жидкостная хроматография высокого разрешения, ионообменная хроматография, гель-электрофорез, аффинная хроматография, гель-фильтрация и т.п.
25 Фактические условия очистки конкретного белка могут зависеть, в частности, от таких факторов как чистый заряд, гидрофобность, гидрофильность и т.д., и должны быть очевидны специалистам в данной области. Для очистки с помощью аффинной хроматографии можно применять антитело, лиганд, рецептор или антиген, с которым связывается мультиспецифическая антигенсвязывающая
30 молекула. Например, для очистки с помощью аффинной хроматографии мультиспецифических антигенсвязывающих молекул, предлагаемых в изобретении, можно применять матрицу с белком А или белком G. Для выделения мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы можно

последовательно применять аффинную хроматографию с белком А или белком G и гель-фильтрацию. Чистоту мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы молекула можно определять любым из множества хорошо известных аналитических методов, включая гель-электрофорез, жидкостную

5 хроматографию высокого давления и т.п.

Варианты антител, сконструированные с использованием цистеина

В некоторых вариантах осуществления изобретения может оказаться желательным создавать антитела, сконструированные с использованием цистеина, например, «тиоМАт», в которых один или несколько остатков в
10 антителе заменены на остатки цистеина. В конкретных вариантах осуществления изобретения замененные остатки находятся в доступных сайтах антитела. Путем замены этих остатков на цистеин реакционноспособные тиольные группы помещаются в доступные сайты антитела и могут использоваться для конъюгации антитела с другими фрагментами, такими как фрагменты,
15 представляющие собой лекарственное средство, или фрагменты, представляющие собой линкер, связанный с лекарственным средством, с созданием иммуноконъюгата, указанного ниже в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления изобретения любой(ые) один или несколько следующих остатков может(гут) быть заменен(ы) на цистеин: V205
20 (нумерация по Кэботу) в легкой цепи; A118 (EU-нумерация) в тяжелой цепи и S400 (EU-нумерация) в Fc-области тяжелой цепи. Антитела, сконструированные с использованием цистеина, можно создавать согласно методу, например, описанному в патенте США № 7521541.

Производные антител

25 В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, представленное в настоящем описании, можно дополнительно модифицировать таким образом, чтобы оно содержало известные в данной области и легко доступные дополнительные небелковые фрагменты. Фрагменты, пригодные для дериватизации антитела, включают (но не ограничиваясь только ими)
30 водорастворимые полимеры. Примерами водорастворимых полимеров являются (но не ограничиваясь только ими) полиэтиленгликоль (ПЭГ), сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлоза, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-

триоксан, сополимер этилена/малеинового ангидрида, полиаминокислоты (либо гомополимеры, либо статистические сополимеры) и декстран- или поли(*n*-винилпиролидон)полиэтиленгликоль, гомополимеры пропиленгликоля, сополимеры пропиленоксида/этиленоксида, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин), поливиниловый спирт и их смеси.

Полиэтиленгликольпропиональдегид может иметь преимущество при производстве благодаря его стабильности в воде. Полимер может иметь любую молекулярную массу и может быть разветвленным или неразветвленным.

Количество полимеров, присоединенных к антителу, может варьироваться и, если присоединено более одного полимера, то они могут представлять собой одинаковые или различные молекулы. В целом, количество и/или тип полимеров, применяемых для дериватизации, можно определять с учетом таких особенностей (но не ограничиваясь только ими), как конкретные свойства или функции антитела, подлежащие усовершенствованию, предполагается ли применение производного антитела в терапии в определенных условиях, и т.д.

Другим вариантом осуществления изобретения являются конъюгаты антитела и небелкового фрагмента, которые можно избирательно нагревать, воздействуя на него излучением. В одном из вариантов осуществления изобретения небелковый фрагмент представляет собой углеродную нанотрубку (Kam и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 2005, сс. 11600-11605). Излучение может иметь любую длину волны и включает (но не ограничиваясь только ими) длины волн, которые не повреждают обычные клетки, но которые нагревают небелковый фрагмент до температуры, при которой уничтожаются клетки, ближайшие к конъюгату: антитело-небелковый фрагмент.

25 Методы рекомбинации и композиции

Антитела можно получать, используя методы рекомбинации и композиции, например, описанные в патенте США № 4816567. Одним из вариантов осуществления изобретения является выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающую молекулу (антитело), 30 указанную в настоящем описании. Указанная нуклеиновая кислота может кодировать аминокислотную последовательность, содержащую VL, и/или аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела (например, легкие и/или тяжелые цепи антитела). Следующим вариантом осуществления

изобретения является(ются) один или несколько векторов (например, экспрессионных векторов), который(е) содержит(ат) указанную нуклеиновую кислоту. Еще одним вариантом осуществления изобретения является клетка-хозяин, которая содержит указанную нуклеиновую кислоту. В одном из 5 указанных вариантов осуществления изобретения клетка-хозяин содержит (например, в результате трансформации указанными векторами): (1) вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела, или (2) первый вектор, 10 содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и второй вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела. В одном из вариантов осуществления изобретения клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку, например, клетку 15 яичника китайского хомячка (CHO) или лимфоидную клетку (например, Y0-, NS0-, Sp2/0-клетку). Одним из вариантов осуществления изобретения является способ получения анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающей молекулы (антитела), где способ включает культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, которая кодирует антитело, описанное выше, в условиях, 20 пригодных для экспрессии антитела, и необязательно выделение антитела из клетки-хозяина (или среды для культивирования клетки-хозяина).

Для рекомбинантного получения анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающей молекулы (антитела) нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, например, описанную выше, выделяют и встраивают в один или несколько векторов для 25 дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Указанную нуклеиновую кислоту легко можно выделять и секвенировать с помощью общепринятых процедур (например, путем использования олигонуклеотидных зондов, которые обладают способностью специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антитела).

30 Приемлемые клетки-хозяева для клонирования или экспрессии кодирующих антитело векторов включают прокариотические или эукариотические клетки, представленные в настоящем описании. Например, антитела можно получать в бактериях, в частности, когда не требуется

гликозилирование и связанная с Fc эффекторная функция. Сведения об экспрессии фрагментов антитела и полипептидов в бактериях см. например, в патенты США №№ 5648237, 5789199 и 5840523 (см. также у Charlton в: *Methods in Molecular Biology*, под ред. Lo В.К.С., изд-во Humana Press, Totowa, NJ, т. 248, 5 2003, сс. 245-254 описание экспрессии фрагментов антител в *E. coli*.) После экспрессии антитело можно выделять из пасты бактериальных клеток в виде растворимой фракции и можно дополнительно очищать.

Помимо прокариотических организмов в качестве хозяев, пригодных для клонирования или экспрессии векторов, которые кодируют антитела, можно 10 использовать эукариотические микроорганизмы, такие как нитчатые грибы или дрожжи, включая штаммы грибов и дрожжей, пути гликозилирования которых были «гуманизированы», что позволяет получать антитело с частично или полностью человеческой схемой гликозилирования (см. Gerngross, *Nat. Biotech.* 22, 2004, сс. 1409-1414 и Li и др., *Nat. Biotech.* 24, 2006, сс. 210-215).

Клетки-хозяева, которые можно использовать для экспрессии гликозилированного антитела, получают также из многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных животных). Примерами клеток беспозвоночных являются клетки насекомых, а также можно применять клетки растений. Были выявлены многочисленные штаммы бакуловирусов и соответствующие 15 пригодные для них в качестве хозяев клетки насекомых, прежде всего для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

В качестве хозяев можно применять также культуры растительных клеток (см., например, патентах США №№ 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 и 6417429 (описание технологии PLANTIBODIESTM для получения антител в 25 трансгенных растениях).

В качестве хозяев можно применять также клетки позвоночных. Например, можно использовать клеточные линии млекопитающих, которые адаптированы к росту в суспензии. Другими примерами приемлемых линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия клеток почки обезьяны CV1, 30 трансформированная с помощью SV40 (OB40) (COS-7); линия клеток почки эмбриона человека (НЕК 293-клетки или клетки линии 293, описанные, например, у Graham и др., *J. Gen. Virol.*, 36, 1977, с. 59); клетки почки детеныша хомяка (ВНК); клетки Сертоли мыши (ТМ4-клетки, описанные, например, у

Mather, Biol. Reprod., 23, 1980, сс. 243-251); клетки почки обезьяны (CV1); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76,); клетки карциномы шейки матки человека (HELA); клетки почки собаки (MDCK); клетки печени бычьей крысы (BRL 3A); клетки легкого человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562); клетки TRI, описанные, например, у Mather и др., Annals N.Y. Acad. Sci., 383, 1982, сс. 44-68; клетки MRC 5 и клетки FS4. Другими ценными линиями клеток-хозяев млекопитающих являются клетки яичника китайского хомячка (CHO), включая DHFR⁻-CHO-клетки (Urlaub и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 1980, с. 4216); и клеточные линии миеломы, такие как Y0, NS0 и Sp2/0. Обзор конкретных линий клеток-хозяев млекопитающих, которые можно применять для производства антител, см., например, у Yazaki и Wu в: Methods in Molecular Biology под ред. В.К.С. Lo, изд-во Humana Press, Totowa, NJ, т. 248, 2003, сс. 255-268.

15 Анализы

Анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающие молекулы (антитела), представленные в настоящем описании, можно идентифицировать, осуществлять их скрининг или характеризовать их физические/химические свойства и/или виды биологической активности с помощью различных анализов, известных в данной области.

20 Анализы связывания и другие анализы

В одном из объектов изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, тестируют в отношении антигенсвязывающей активности, например, с помощью известных методов, таких как ELISA, Вестерн-блоттинг и т.д.

25 Согласно другому объекту изобретения можно использовать анализы в условиях конкуренции для идентификации антитела, которое конкурирует, например, с любым из вышеуказанных антител за связывание с HLA-DQ2.5 (или комплексом HLA-DQ2.5/глутеновый пептид). В некоторых вариантах осуществления изобретения указанное конкурирующее антитело связывается с
30 тем же самым эпитопом (например, линейным или конформационным эпитопом), с которым связываются описанные выше антитела. Подробное описание приведенных в качестве примера методов картирования эпитопа, с которым связывается антитело, представлено у Morris, Epitope Mapping

Protocols, в: Methods in Molecular Biology, т. 66, изд-во Humana Press, Totowa, NJ, 1996.

В качестве примера анализа в условиях конкуренции иммобилизованный HLA-DQ2.5 (или комплекс HLA-DQ2.5/глютенный пептид) инкубируют в
5 растворе, содержащем первое меченое антитело, которое связывается с HLA-DQ2.5 (или комплексом HLA-DQ2.5/глютенный пептид), и второе немеченое антитело, подлежащее тестированию с отношении способности конкурировать с первым антителом за связывание с HLA-DQ2.5 (или комплексом HLA-DQ2.5/глютенный пептид). Второе антитело может присутствовать в
10 супернатанте гибридомы. В качестве контроля иммобилизованный HLA-DQ2.5 (или комплекс HLA-DQ2.5/глютенный пептид) инкубируют в растворе, содержащем первое меченое антитело, но не содержащем второе немеченое антитело. После инкубации в условиях, приемлемых для связывания первого антитела с HLA-DQ2.5 (или комплексом HLA-DQ2.5/глютенный пептид),
15 удаляют избыток несвязанного антитела и подсчитывают количество метки, ассоциированной с иммобилизованным HLA-DQ2.5 (или комплексом HLA-DQ2.5/глютенный пептид). Если количество метки, ассоциированной с иммобилизованным HLA-DQ2.5 (или комплексом HLA-DQ2.5/глютенный пептид), существенно снижается в тестируемом образце по сравнению с
20 контрольным образцом, то это свидетельствует о том, что второе антитело конкурирует с первым антителом за связывание с HLA-DQ2.5 (или комплексом HLA-DQ2.5/глютенный пептид) (см., например, Harlow и Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, глава 14, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1988).

25 Животных, таких как кролики, мыши, крысы и другие животные, которых можно иммунизировать, иммунизируют антигеном (например, HLA-DQ2.5 или комплексом HLA-DQ2.5/глютенный пептид). Антиген можно получать в виде рекомбинантного белка с использованием любых методов, упомянутых в настоящем описании. Из организма иммунизированных животных получают
30 содержащие антитело образцы, такие как кровь и селезенка. Для отбора В-клеток, например, получают биотинилированный антиген, и связывающиеся с антигеном В-клетки связывают с помощью биотинилированного антигена, и клетки подвергают клеточному сортированию и культивируют для селекции.

Специфическое связывание клеток с антигеном можно оценивать любым пригодным методом, таким как метод ELISA. Указанный метод можно применять также для оценки отсутствия перекрестной реактивности в отношении не представляющих интерес антигенов. Для выделения или

5 определения последовательности отобранного антитела, например, из клеток выделяют РНК и получают кодирующие антитело области ДНК путем обратной транскрипции РНК и ПЦР-амплификации. Кроме того, клонированные гены антитела можно экспрессировать в пригодных клетках, и антитело можно очищать из супернатантов культур для дополнительного анализа.

10 Для оценки того, связывается ли анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающая молекула (антитело) с представляющим интерес антигеном (например, комплексом, образованным HLA-DQ2.5 и глютенным пептидом, таким, который указан в настоящем описании), можно применять любые методы, предназначенные для оценки связывания. Например, когда применяют

15 основанный на FACS метод сортировки клеток, то клетки, экспрессирующие антиген, инкубируют с тестируемым антителом, а затем добавляют пригодное вторичное антитело против тестируемого (т.е. первичного) антитела и инкубируют. Связывание между антигеном и тестируемым антителом определяют с помощью FACS-анализа, используя, например,

20 хромогенную/флуоресцентную метку (например, упомянутую выше), присоединенную к вторичному антителу. Альтернативно этому, можно использовать любой из методов количественной оценки, упомянутых в разделе «Аффинность антител», в данном описании. Например, измерение K_d с помощью поверхностного плазмонного резонанса методом BIACORE можно

25 применять для оценки связывания между тестируемым антителом и указанным в настоящем описании представляющим интерес антигеном.

В некоторых вариантах осуществления изобретения способ, предлагаемый в настоящем изобретении, дополнительно включает: оценку того, обладает ли антитело нейтрализующей активностью в отношении связывания между HLA-DQ2.5 (или комплексом HLA-DQ2.5/глютенный пептид) и TCR (или

30 взаимодействия между HLA-DQ2.5 (или комплексом HLA-DQ2.5/глютенный пептид) и CD4⁺ Т-клетками с рестрикцией по HLA-DQ2.5); и отбор антитела, которое обладает нейтрализующей активностью. В некоторых вариантах

осуществления изобретения способ, предлагаемый в настоящем изобретении, дополнительно включает: оценку того, обладает ли антитело нейтрализующей активностью в отношении связывания между HLA-DQ2.2 (или комплексом HLA-DQ2.2/глютенный пептид) и TCR (или взаимодействия между HLA-DQ2.2 (или комплексом HLA-DQ2.2/глютенный пептид) и CD4⁺ Т-клетками с рестрикцией по HLA-DQ2.2); и отбор антитела, которое обладает нейтрализующей активностью. Указанные стадии можно осуществлять в присутствии глютенного пептида, указанного в настоящем описании, т.е. используя HLA-DQ2.5 или HLA-DQ2.2, связанные с пептидом. Нейтрализующую активность можно оценивать, например, согласно указанному в настоящем описании методу. В целом, метод состоит в следующем: гранулы, такие как покрытые стрептавидином желтые частицы, подготавливают соответствующим образом и к гранулам добавляют растворимый HLA-DQ, связанный с пептидом, для иммобилизации на планшете. Планшет промывают и блокируют и в него добавляют антитело и инкубируют. Когда оценивают связывание между HLA-DQ2.5 (или комплексом HLA-DQ2.5/глютенный пептид) и TCR, то, например, можно добавлять, D2 TCR тетрамер-PE и инкубировать. Связывание между двумя компонентами можно оценивать с использованием хромогенной/флуоресцентной метки на TCR, связанном с HLA-DQ2.5 (или с комплексом HLA-DQ2.5/глютенный пептид).

В некоторых вариантах осуществления изобретения мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула блокирует взаимодействие между комплексом HLA-DQ2.5/глютенный пептид и CD4⁺ Т-клеткой с рестрикцией по HLA-DQ2.5/глютенный пептид. В некоторых вариантах осуществления изобретения мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула блокирует взаимодействие между комплексом HLA-DQ2.2/глютенный пептид и CD4⁺ Т-клеткой с рестрикцией по HLA-DQ2.2/глютенный пептид. В этом контексте глютенный пептид представляет собой пептид в комплексе, связанном с помощью любой/любых из антигенсвязывающих молекул/доменов, описанных выше.

В некоторых вариантах осуществления изобретения глютенный пептид выбирают из группы, которая состоит из: пептида альфа 1 глиаина, пептида альфа 1b глиаина, пептида альфа 2 глиаина, пептида омега 1 глиаина, пептида омега 2 глиаина, пептида гамма 1 глиаина, пептида гамма 2 глиаина,

пептида гамма 3 глиаина, пептида гамма 4а глиаина, пептида гамма 4d глиаина и пептида ВС-гордеина.

В некоторых вариантах осуществления изобретения мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула практически не обладает связывающей активностью в отношении HLA-DP, HLA-DR, HLA-DQ5.1, HLA-DQ6.3, HLA-DQ7.3, HLA-DQ7.5 и HLA-DQ8.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающая молекула, предлагаемая в изобретении, обладает повышенной способностью связываться с комплексом, образованным HLA-DQ2.5 и глютенным пептидом. В этом контексте глютенный пептид может представлять собой любой из указанных выше глютенных пептидов. Степень повышения можно определять, сравнивая связывающую активность в отношении комплекса, образованного HLA-DQ2.5 и нерелевантным пептидом, или в отношении клетки без представляющего интерес комплекса, например, HLA-DQ2.5-позитивной PBMC В-клетки и/или Ва/F3-клетки, которая экспрессирует HLA-DQ2.5 или HLA-DQ2.2.

Биспецифическое антитело, предлагаемое в изобретении, содержит тяжелую цепь и легкую цепь первого плеча/полуантитела и тяжелую цепь, и легкую цепь второго плеча/полуантитела. Понятие «плечо» или «полуантитело» относится к участку антитела, содержащему одну тяжелую цепь и одну легкую цепь. В некоторых вариантах осуществления изобретения биспецифическое антитело содержит VH (вариабельная область тяжелой цепи) и VL (вариабельная область легкой цепи) первого плеча/полуантитела и VH и VL второго плеча/полуантитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения биспецифическое антитело содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 первого плеча/полуантитела и HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 второго плеча/полуантитела.

В некоторых вариантах биспецифических антител, предлагаемых в изобретении, первое плечо/полуантитело получают из DQN0344xx (DQN0344Hx/DQN0344Lx), указанного в настоящем описании, а второе плечо/полуантитело получают из DQN0385ee (DQN0385He/DQN0385Le), указанного в настоящем описании. Идентификационные номера (ID) последовательностей (SEQ ID NO:) VH, VL, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1,

LCDR2, LCDR3 и полноразмерных тяжелых (H) и легких (L) цепей биспецифических антител, предлагаемых в изобретении, представлены в таблицах 2-3 - 2-6 (ниже).

5 В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, содержит: HCDR1, содержащий последовательность SEQ ID NO: 129 или 164; HCDR2, содержащий последовательность SEQ ID NO: 130 или 165; и HCDR3, содержащий последовательность SEQ ID NO: 131 или 166.

10 В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, содержит: LCDR1, содержащий последовательность SEQ ID NO: 132 или 167; LCDR2, содержащий последовательность SEQ ID NO: 133 или 168; и LCDR3, содержащий последовательность SEQ ID NO: 134 или 169.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит последовательность SEQ ID NO: 88 или 89.

15 В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, содержит константную область тяжелой цепи, которая содержит последовательность SEQ ID NO: 105 или 162.

20 В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, содержит переменную область легкой цепи, которая содержит последовательность SEQ ID NO: 90 или 91.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, содержит константную область легкой цепи, которая содержит последовательность SEQ ID NO: 106.

25 В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, содержит: (полноразмерную) тяжелую цепь, которая содержит последовательность SEQ ID NO: 41, 42, 44 или 45.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, содержит: (полноразмерную) легкую цепь, которая содержит последовательность SEQ ID NO: 43 или 46.

30 В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, содержит: HCDR1, содержащий последовательность SEQ ID NO: 135, 144, 147, 153, 156 или 159; HCDR2, содержащий последовательность SEQ

ID NO: 136, 145, 148, 154, 157 или 160; и HCDR3, содержащий последовательность SEQ ID NO: 137, 146, 149, 155, 158 или 161.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, содержит: LCDR1, содержащий последовательность SEQ ID NO: 138, 141 или 150; LCDR2, содержащий последовательность SEQ ID NO: 139, 142 или 151; и LCDR3, содержащий последовательность SEQ ID NO: 140, 143 или 152.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, содержит переменную область тяжелой цепи, которая содержит последовательность SEQ ID NO: 92, 93, 94, 95, 96 или 97.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, содержит константную область тяжелой цепи, которая содержит последовательность SEQ ID NO: 104 или 163.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, содержит переменную область легкой цепи, которая содержит последовательность SEQ ID NO: 98, 99 или 100.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, содержит константную область легкой цепи, которая содержит последовательность SEQ ID NO: 107.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, содержит: (полноразмерную) тяжелую цепь, которая содержит последовательность SEQ ID NO: 53, 54, 57, 58, 59, 60, 62, 63, 64, 65, 66 или 67.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, содержит: (полноразмерную) легкую цепь, которая содержит последовательность SEQ ID NO: 55, 56 или 61.

Конкретные последовательности полноразмерных H- и L-цепей плечей/полуантител (содержащихся в биспецифических антителах, предлагаемых в изобретении) представлены в таблице 1-2.

Таблица 1-2

Таблица 1-2

Полноразмерные Н- и L-цепи биспецифических антител.

Н- (или L-) цепи содержат в направлении от N-конца к C-концу HCDR1, HCDR2

и HCDR3 (или LCDR1, LCDR2 и LCDR3), которые подчеркнуты в таблице.

SEQ ID NO:	Н/Л-цепь; плечо	Последовательность
41	Н-цепь для DQN0344H0976 /L0591	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSAYWMVW VRQAPGQGLEWMGAVYGGSDTTYAKWTEGRFTISR TSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREPLNYYYYGELNL WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLKSSGLYSLS SVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDK THTCPPCPAPELRRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVSFLTVLHQQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPYLDSDGSFFLYSKLTVDK RWQEGNVFSCSVLHEALHAHYTREELSLSP
42	Н-цепь для DQN0344H0976 /L0591	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSAYWMVW VRQAPGQGLEWMGAVYGGSDTTYAKWTEGRFTISR TSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREPLNYYYYGELNL WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLKSSGLYSLS SVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDK THTCPPCPAPELRRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVSFLTVLHQQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK RWQEGNVFSCSVLHEALHAHYTREELSLSP
43	Л-цепь для DQN0344H0976 /L0591	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCQATEEIIYSGLAWYQQK PGKAPKLLIYYVSTLYEGIPARFSGSGSDFTLTISLEP EDFAVYYCQTYEDVSAVTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTAEVCLLNFPYFVPEAKVQWVKVDNALQSG NSEESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
44	Н-цепь для DQN0344H1013 /L0620	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSAYWMVW VRQAPGQGLEWMGAVYGGSDTTYAKWTEGRFTISR TSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREPLNYYYYGELNV WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLKSSGLYSLS SVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDK THTCPPCPAPELRRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVSFLTVLHQQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPYLDSDGSFFLYSKLTVDK RWQEGNVFSCSVLHEALHAHYTREELSLSP

45	Н-цепь для DQN0344H1013 /L0620	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSAYWMVW VRQAPGQGLEWMGAVYGGSDTTYAKWTEGRFTISR TSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREPLNYYYYGELN WGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLKSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDK THTCPPCPAPELLRRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQEGNVFSCSVLHEALHAHYTREELSLSLSP
46	L-цепь для DQN0344H1013 /L0620	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQATENIYSGLAWYQQK PGKAPKLLIYYVSTLAYGIPARFSGSGSDFTLTISSLEP EDFAVYYCQTYEDVSAVTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTAEVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSG NSEESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
53	Н-цепь для DQN0385H1270 /L0722 и DQN0385H1270 /L0681	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSEWYFMSW VRQAPGKGLEWVASIDTGSGLSIDYAEWVEGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIGIDYNFWGPGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPE PVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLESSGLYSLSVTVPS SLGKTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPCP APELRRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVLHEALHAHYTRKELSLSLSP
54	Н-цепь для DQN0385H1270 /L0722 и DQN0385H1270 /L0681	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSEWYFMSW VRQAPGKGLEWVASIDTGSGLSIDYAEWVEGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIGIDYNFWGPGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPE PVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLESSGLYSLSVTVPS SLGKTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPCP APELRRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVLHEALHAHYTRKELSLSLSP
55	L-цепь для DQN0385H1270 /L0722	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQTTQSISSYLNWYQQK PGQPPKLLIYYASTKAEGIPARFSGSGLGTDFTLTISSLQ PEDFAVYYCHYGISKVSFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTAKVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGN SKESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC
56	L-цепь для DQN0385H1270 /L0681 и	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQTTQSISSYLNWYQQK PGQPPKLLIYYASTKAEGIPARFSGSGLGTDFTLTISSLEP EDFAVYYCHYGISKVSFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS

	DQN0385H1352 /L0681	DEQLKSGTAKVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNS KESVTEQDSKDYSLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFRGEC
57	Н-цепь для DQN0385H1352 /L0681	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFEFSEWYFMSW VRQAPGKGLEWVASIDTGS ^S GSIDYAEWVEGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIGIDYNFWGPGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPE PVTVSWNSGALTS ^G VHTFPAVLESSGLYSLSSVTVPS SLGKTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPCP APELRRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPYLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVLHEALHAHYTRKELSLSP
58	Н-цепь для DQN0385H1352 /L0681	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFEFSEWYFMSW VRQAPGKGLEWVASIDTGS ^S GSIDYAEWVEGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIGIDYNFWGPGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPE PVTVSWNSGALTS ^G VHTFPAVLESSGLYSLSSVTVPS SLGKTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPCP APELRRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPYLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVLHEALHAHYTRKELSLSP
59	Н-цепь для DQN0385H1527 /L0605	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFASWYFMSW VRQAPGKGLEWVASIDTGS ^S GSIDYAEWVEGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIGIDYNFWGPGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPE PVTVSWNSGALTS ^G VHTFPAVLESSGLYSLSSVTVPS SLGKTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPCP APELRRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPYLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVLHEALHAHYTRKELSLSP
60	Н-цепь для DQN0385H1527 /L0605	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFASWYFMSW VRQAPGKGLEWVASIDTGS ^S GSIDYAEWVEGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIGIDYNFWGPGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPE PVTVSWNSGALTS ^G VHTFPAVLESSGLYSLSSVTVPS SLGKTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPCP APELRRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPYLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVLHEALHAHYTRKELSLSP

61	L-цепь для DQN0385H1527 /L0605 и DQN0385H1255 /L0605	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQTTQSISSYLNWYQQK PGQPPKLLIYYASTKAEGIPARFSGSGSGTDFLTISSE PEDFAVYYCHYGISKVSFSGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTAKVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGN SKESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC
62	H-цепь для DQN0385H1255 /L0605	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSEWYFMSW VRQAPGKGLEWVASIDTGS SG SIDYAGWVEERFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIGIDYNFWGPGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPE PVTVSWNSGALTS GV HFFPAVLESSGLYSLSSVTVPPSS SLGTKTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKHTCPCPCP APELRRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPYLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVLHEALHAHYTRKELSLSP
63	H-цепь для DQN0385H1255 /L0605	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSEWYFMSW VRQAPGKGLEWVASIDTGS SG SIDYAGWVEERFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIGIDYNFWGPGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPE PVTVSWNSGALTS GV HFFPAVLESSGLYSLSSVTVPPSS SLGTKTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKHTCPCPCP APELRRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVLHEALHAHYTRKELSLSP
64	H-цепь для DQN0385H1521 /L0605	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFESWYFMSW VRQAPGKGLEWVASIDTGS SG SIDYAEWVEGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIGIDYNFWGPGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPE PVTVSWNSGALTS GV HFFPAVLESSGLYSLSSVTVPPSS SLGTKTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKHTCPCPCP APELRRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPYLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVLHEALHAHYTRKELSLSP
65	H-цепь для DQN0385H1521 /L0605	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFESWYFMSW VRQAPGKGLEWVASIDTGS SG SIDYAEWVEGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIGIDYNFWGPGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPE PVTVSWNSGALTS GV HFFPAVLESSGLYSLSSVTVPPSS SLGTKTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKHTCPCPCP APELRRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP

		QVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVLHEALHAHYTRKELSLSP
66	Н-цепь для DQN0385H1353 /L0681	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFAEWYFMSW VRQAPGKGLEWVASIDTGS GS IDYAEWVEGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIGIDYNFWGPGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLESSGLYSLSSVWTPSS SLGTKTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCP APELRRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVLHEALHAHYTRKELSLSP
67	Н-цепь для DQN0385H1353 /L0681	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFAEWYFMSW VRQAPGKGLEWVASIDTGS GS IDYAEWVEGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIGIDYNFWGPGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLESSGLYSLSSVWTPSS SLGTKTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCP APELRRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVLHEALHAHYTRKELSLSP

В некоторых вариантах осуществления изобретения, представленных в настоящем описании, предложена мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент;

в которой первый антигенсвязывающий фрагмент содержит один из вариантов, представленных ниже в подпунктах (a1)-(a3):

(a1) первую переменную область антитела, которая содержит определяющую комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 129, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 130, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 131, и вторую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 132, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 133, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 134;

(a2) первую переменную область антитела, которая содержит определяющие комплементарность участки (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 164, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 165, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 166, и вторую

вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 167, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 168, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 169; и

(а3) первую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична последовательности первой вариабельной области антитела, представленной в подпункте (а1) или (а2), и вторую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична последовательности второй вариабельной области антитела, представленной в подпункте (а1) или (а2).

В некоторых вариантах осуществления изобретения мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит второй антигенсвязывающий фрагмент, который содержит один из вариантов, представленных ниже в подпунктах (б1)-(б8):

(б1) третью вариабельную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 135, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 136, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 137, и четвертую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 138, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 139, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 140;

(б2) третью вариабельную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 135, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 136, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 137, и четвертую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 141, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 142, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 143;

(б3) третью вариабельную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 144, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 145, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 146, и четвертую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 141, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 142, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 143;

(б4) третью вариабельную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 147, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 148, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 149, и

четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 150, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 151, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 152;

5 (65) третью переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарный участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 153, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 154, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 155, и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 150, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 151, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 152;

10 (66) третью переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарный участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 156, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 157, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 158, и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 150, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 151, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 152;

15 (67) третью переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарный участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 159, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 160, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 161, и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 141, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 142, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 143; и

20 (68) третью аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична последовательности третьей переменной области антитела, представленной в одном из подпунктов (61)-(67), и четвертую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична последовательности четвертой переменной области антитела, представленной в одном из подпунктов (61)-(67).

30 В некоторых вариантах осуществления изобретения, представленных в настоящем описании, предложена мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая содержит первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент;

в которой первый антигенсвязывающий фрагмент содержит один из вариантов, представленных ниже в подпунктах (в1)-(в3):

5 (в1) первую переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 129, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 130, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 131, и вторую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 132, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 133, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 134;

10 (в2) первую переменную область антитела, которая содержит определяющие комплементарность участки (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 164, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 165, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 166, и вторую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 167, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 168, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 169; и

15 (в3) первую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична последовательности первой переменной области антитела, представленной в подпункте (в1) или (в2), и вторую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична последовательности второй переменной области антитела, представленной в подпункте (в1) или (в2),

20 в которой второй антигенсвязывающий фрагмент содержит один из вариантов, представленных ниже в подпунктах (г1)-(г8):

(г1) третью переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 135, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 136, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 137, и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 138, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 139, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 140;

30 (г2) третью переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 135, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 136, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 137, и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 141, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 142, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 143;

(г3) третью переменную область антитела, которая содержит определяющую комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 144, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 145, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 146, и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 141, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 142, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 143;

(г4) третью переменную область антитела, которая содержит определяющую комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 147, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 148, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 149, и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 150, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 151, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 152;

(г5) третью переменную область антитела, которая содержит определяющую комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 153, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 154, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 155, и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 150, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 151, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 152;

(г6) третью переменную область антитела, которая содержит определяющую комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 156, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 157, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 158, и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 150, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 151, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 152;

(г7) третью переменную область антитела, которая содержит определяющую комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 159, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 160, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 161, и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 141, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 142, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 143; и

(г8) третью аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична последовательности третьей переменной области антитела, представленной в одном из подпунктов (г1)-

(г7), и четвертую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична последовательности четвертой вариабельной области антитела, представленной в одном из подпунктов (г1)-(г7).

5 В некоторых вариантах осуществления изобретения, представленных в настоящем описании, предложена мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая содержит первый антигенсвязывающий фрагмент, содержащий первую и вторую вариабельные области антитела, и второй антигенсвязывающий фрагмент, содержащий третью и четвертую вариабельные области антитела, где мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула
10 содержит один из вариантов, представленных ниже в подпунктах (1)-(15):

(1) первую вариабельную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 129, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 130, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 131, и вторую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 132, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 133, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 134; третью вариабельную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, SEQ ID NO: 135, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 136, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 137, и четвертую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 138, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 139, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 140;

(2) первую вариабельную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 129, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 130, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 131, и вторую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 132, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 133, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 134; третью вариабельную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, SEQ ID NO: 135, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 136, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 137, и четвертую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 141, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 142, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 143;

(3) первую вариабельную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 129,

CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 130, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 131, и вторую
вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO:
132, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 133, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 134;
5 третью вариабельную область антитела, которая содержит определяющий
комплементарность участок (CDR) 1, SEQ ID NO: 144, CDR 2, имеющий SEQ ID
NO: 145, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 146, и четвертую вариабельную область
антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 141, CDR 2, имеющий
SEQ ID NO: 142, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 143;

(4) первую вариабельную область антитела, которая содержит
10 определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 129,
CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 130, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 131, и вторую
вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO:
132, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 133, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 134;
15 третью вариабельную область антитела, которая содержит определяющий
комплементарность участок (CDR) 1, SEQ ID NO: 147, CDR 2, имеющий SEQ ID
NO: 148, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 149, и четвертую вариабельную область
антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 150, CDR 2, имеющий
SEQ ID NO: 151, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 152;

(5) первую вариабельную область антитела, которая содержит
20 определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 129,
CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 130, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 131, и вторую
вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO:
132, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 133, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 134;
25 третью вариабельную область антитела, которая содержит определяющий
комплементарность участок (CDR) 1, SEQ ID NO: 153, CDR 2, имеющий SEQ ID
NO: 154, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 155, и четвертую вариабельную область
антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 150, CDR 2, имеющий
SEQ ID NO: 151, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 152;

(6) первую вариабельную область антитела, которая содержит
30 определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 129,
CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 130, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 131, и вторую
вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO:
132, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 133, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 134;

5 третью переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, SEQ ID NO: 156, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 157, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 158, и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 150, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 151, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 152;

10 (7) первую переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 129, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 130, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 131, и вторую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 132, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 133, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 134; третью переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, SEQ ID NO: 159, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 160, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 161, и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 141, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 142, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 143; и

15 (8) первую переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 164, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 165, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 166, и вторую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 20 167, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 168, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 169; третью переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, SEQ ID NO: 135, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 136, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 137, и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 138, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 139, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 140;

25 (9) первую переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 164, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 165, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 166, и вторую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 30 167, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 168, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 169; третью переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, SEQ ID NO: 135, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 136, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 137, и четвертую переменную область

антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 141, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 142, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 143;

(10) первую переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарный участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 164, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 165, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 166, и вторую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 167, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 168, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 169; третью переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарный участок (CDR) 1, SEQ ID NO: 144, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 145, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 146, и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 141, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 142, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 143;

(11) первую переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарный участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 164, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 165, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 166, и вторую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 167, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 168, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 169; третью переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарный участок (CDR) 1, SEQ ID NO: 147, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 148, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 149, и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 150, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 151, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 152;

(12) первую переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарный участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 164, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 165, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 166, и вторую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 167, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 168, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 169; третью переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарный участок (CDR) 1, SEQ ID NO: 153, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 154, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 155, и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 150, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 151, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 152;

(13) первую переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарный участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 164, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 165, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 166, и вторую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 167, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 168, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 169; третью переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарный участок (CDR) 1, SEQ ID NO: 156, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 157, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 158, и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 150, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 151, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 152;

(14) первую переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарный участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 164, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 165, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 166, и вторую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 167, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 168, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 169; третью переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарный участок (CDR) 1, SEQ ID NO: 159, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 160, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 161, и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 141, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 142, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 143; и

(15) первую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична последовательности первой переменной области антитела, представленной в одном из подпунктов (1)-(14), вторую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична последовательности второй переменной области антитела, представленной в одном из подпунктов (1)-(14), третью аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична последовательности третьей переменной области антитела, представленной в одном из подпунктов (1)-(14), и четвертую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична последовательности четвертой переменной области антитела, представленной в одном из подпунктов (1)-(14).

В некоторых вариантах осуществления изобретения в мультиспецифической антигенсвязывающей молекуле вариабельная область антитела, содержащаяся в первом и/или втором антигенсвязывающем фрагменте, содержит каркасные участки человеческого антитела или каркасные участки гуманизированного антитела.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, представленных в настоящем описании, предложена мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент;

в которой первый антигенсвязывающий фрагмент содержит любой из вариантов, указанных ниже в подпунктах (д1)-(д3):

(д1) первую вариабельную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88, и вторую вариабельную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90;

(д2) первую вариабельную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89, и вторую вариабельную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91; и

(д3) первую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична последовательности первой вариабельной области антитела, представленной в подпункте (д1) или (д2), и вторую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична последовательности второй вариабельной области антитела, представленной в подпункте (д1) или (д2).

В некоторых вариантах осуществления изобретения в мультиспецифической антигенсвязывающей молекуле второй антигенсвязывающий фрагмент содержит любой из вариантов, указанных ниже в подпунктах (е1)-(е8):

(е1) третью вариабельную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92, и четвертую вариабельную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98;

(e2) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99;

5 (e3) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99;

10 (e4) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100;

15 (e5) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100;

20 (e6) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100;

(e7) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99; и

25 (e8) третью аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична последовательности третьей переменной области антитела, представленной в одном из подпунктов (e1)-(e7), и четвертую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична последовательности
30 четвертой переменной области антитела, представленной в одном из подпунктов (e1)-(e7).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, представленных в настоящем описании, предложена мультиспецифическая антигенсвязывающая

молекула, содержащая первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент;

в которой первый антигенсвязывающий фрагмент содержит любой из вариантов, указанных ниже в подпунктах (д1)-(д3):

5 (д1) первую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88, и вторую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90;

10 (д2) первую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89, и вторую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91; и

15 (д3) первую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична последовательности первой переменной области антитела, представленной в подпункте (д1) или (д2), и вторую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична последовательности второй переменной области антитела, представленной в подпункте (д1) или (д2) и

20 в которой второй антигенсвязывающий фрагмент содержит любой из вариантов, указанных ниже в подпунктах (е1)-(е8):

(е1) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98;

25 (е2) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99;

30 (е3) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99;

(e4) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100;

5 (e5) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100;

10 (e6) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100;

15 (e7) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99; и

20 (e8) третью аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична последовательности третьей переменной области антитела, представленной в одном из подпунктов (e1)-(e7), и четвертую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична последовательности четвертой переменной области антитела, представленной в одном из подпунктов (e1)-(e7).

25 В некоторых вариантах осуществления изобретения, представленных в настоящем описании, предложена мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая содержит первый антигенсвязывающий фрагмент, содержащий первую и вторую переменные области антитела, и второй антигенсвязывающий фрагмент, содержащий третью и четвертую переменные области антитела, где мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула
30 содержит один из вариантов, представленных ниже в подпунктах (1)-(15):

(1) первую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88; вторую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ

ID NO: 90; третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98;

5 (2) первую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88; вторую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90; третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99;

10 (3) первую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88; вторую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90; третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99;

15 (4) первую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88; вторую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90; третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100;

20 (5) первую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88; вторую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90; третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100;

область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99;

(11) первую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89; вторую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91; третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100;

(12) первую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89; вторую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91; третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100;

(13) первую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89; вторую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91; третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100;

(14) первую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89; вторую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91; третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99;

(15) первую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична последовательности первой переменной области антитела, представленной в одном из подпунктов

(1)- (14), вторую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична последовательности второй вариабельной области антитела, представленной в одном из подпунктов (1) - (14), третью аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 5 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична последовательности третьей вариабельной области антитела, представленной в одном из подпунктов (1)-(14), и четвертую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична последовательности четвертой вариабельной области антитела, представленной в одном из подпунктов (1)-(14).

10 В некоторых вариантах осуществления изобретения, представленных в настоящем описании, предложена мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая содержит комбинацию двух полипептидных цепей, выбранных из группы, которая состоит из вариантов, указанных ниже в подпунктах (A1)-(A3):

15 (A1) первую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, и первую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43;

(A2) первую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и первую легкую цепь, которая содержит 20 аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46; и

(A3) первую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична последовательности первой тяжелой цепи, представленной в подпункте (A1) или (A2), и вторую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 25 80%, 85%, 90% или 95% идентична последовательности первой легкой цепи, представленной в подпункте (A1) или (A2).

В некоторых вариантах осуществления изобретения мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула дополнительно содержит комбинацию двух полипептидных цепей, выбранных из группы, которая состоит из вариантов, 30 указанных ниже в подпунктах (B1)-(B8):

(B1) вторую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55;

(Б2) вторую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56;

5 (Б3) вторую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58, и вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56;

(Б4) вторую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61;

10 (Б5) вторую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63, и вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61;

(Б6) вторую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, и вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61;

(Б7) вторую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, и вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56; и

20 (Б8) третью аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична последовательности второй тяжелой цепи, представленной в одном из подпунктов (Б1)-(Б7), и четвертую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична последовательности второй легкой цепи, представленной в одном из подпунктов (Б1)-(Б7).

25 В некоторых вариантах осуществления изобретения мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула дополнительно содержит комбинацию двух полипептидных цепей, выбранных из группы, которая состоит из вариантов, указанных ниже в подпунктах (Б1)-(Б8):

30 (Б1) вторую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55;

(Б2) вторую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56;

5 (Б3) вторую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57, и вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56;

(Б4) вторую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, и вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61;

10 (Б5) вторую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62, и вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61;

(Б6) вторую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, и вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61;

(Б7) вторую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, и вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56; и

20 (Б8) третью аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична последовательности второй тяжелой цепи, представленной в одном из подпунктов (Б1)-(Б7), и четвертую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична последовательности второй легкой цепи, представленной в одном из подпунктов (Б1)-(Б7).

25 В некоторых вариантах осуществления изобретения, представленных в настоящем описании, предложена мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая содержит комбинацию четырех полипептидных цепей, выбранных из группы, которая состоит из вариантов, представленных ниже в подпунктах (1)-(15):

30 (1) первую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, и первую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, и вторую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и

(7) первую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и первую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и вторую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, и
5 вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61;

(8) первую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и первую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и вторую тяжелую цепь,
10 которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56;

(9) первую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и первую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и вторую тяжелую цепь,
15 которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58, и вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56;

(10) первую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и первую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и вторую тяжелую цепь,
20 которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, и вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56;

(11) первую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, и первую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, и вторую тяжелую цепь,
25 которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, и вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61;
30

(12) первую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, и первую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, и вторую тяжелую цепь,

которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, и вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56;

5 (13) первую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и первую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и вторую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63, и вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61;

10 (14) первую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и первую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и вторую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61; и

15 (15) первую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична последовательности первой тяжелой цепи, представленной в одном из подпунктов (1)-(14), и вторую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична последовательности первой легкой цепи, представленной в одном из подпунктов (1)-(14); третью аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична последовательности второй тяжелой цепи, представленной в одном из подпунктов (1)-(14), и четвертую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична последовательности второй легкой цепи, представленной в одном из подпунктов (1)-(14).

25 В некоторых вариантах осуществления изобретения, указанных в настоящем описании, предложена мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая содержит комбинацию четырех полипептидных цепей 30 выбранных из группы, которая состоит из вариантов, представленных ниже в подпунктах (1)-(15):

которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55;

5 (7) первую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, и первую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и вторую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, и вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61;

10 (8) первую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, и первую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и вторую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность
15 SEQ ID NO: 56;

(9) первую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, и первую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и вторую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57, и
20 вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56;

(10) первую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, и первую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и вторую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, и
25 вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56;

(11) первую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, и первую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, и вторую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, и
30 вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61;

(12) первую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, и первую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, и вторую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, и
5 вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56;

(13) первую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, и первую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и вторую тяжелую цепь,
10 которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62, и вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61;

(14) первую тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, и первую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и вторую тяжелую цепь,
15 которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, и вторую легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61; и

(15) первую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична последовательности первой тяжелой цепи, представленной в одном из подпунктов (1)-(14), и вторую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична последовательности первой легкой цепи, представленной в одном из подпунктов (1)-(14); третью аминокислотную
20 последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична последовательности второй тяжелой цепи, представленной в одном из подпунктов (1)-(14), и четвертую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентична последовательности второй легкой цепи, представленной в
25 одном из подпунктов (1)-(14).
30

В некоторых вариантах осуществления изобретения, указанных в настоящем описании, предложена комбинация, содержащая любой из вариантов, представленных ниже в подпунктах (I)-(III):

(I) мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которая содержит последовательности, указанные выше в любом из подпунктов (a1)-(a3), и мультиспецифическую антигенсвязывающую молекула молекулу, которая содержит последовательности, указанные выше в любом из подпунктов (b1)-
5 (b8);

(II) мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которая содержит последовательности, указанные выше в любом из подпунктов (d1)-(d3), и мультиспецифическую антигенсвязывающую молекула молекулу, которая содержит последовательности, указанные выше в любом из подпунктов (e1)-(e8);
10 и

(III) мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которая содержит последовательности, указанные выше в любом из подпунктов (A1)-(A3), и мультиспецифическую антигенсвязывающую молекула молекулу, которая содержит последовательности, указанные выше в любом из подпунктов
15 (B1)-(B8).

В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающая молекула, предлагаемая в изобретении, представляет собой биспецифическую антигенсвязывающую молекулу.

В некоторых вариантах осуществления изобретения биспецифическая
20 антигенсвязывающая молекула представляет собой биспецифическое антитело.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, указанных в настоящем описании, предложена нуклеиновая кислота, которая кодирует антигенсвязывающую молекулу, предлагаемую в изобретении. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой
25 выделенную нуклеиновую кислоту.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, указанных в настоящем описании, предложен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления изобретения, указанных в настоящем описании, предложен вектор, в который интродуцирована нуклеиновая кислота.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, указанных в настоящем описании, предложена клетка, содержащая нуклеиновую кислоту или вектор. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой клетку-хозяина.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, указанных в настоящем описании, предложен способ получения мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в изобретении, включающий культивирование клетки таким образом, чтобы получать мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ дополнительно включает выделение мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы из культуры клетки.

Нуклеиновую кислота, вектор, клетку и способ можно соответствующим образом создавать/осуществлять с учетом настоящего описания и технических знаний в данной области.

Иммуноконъюгаты

В изобретении предложены также иммуноконъюгаты, содержащие анти-НLA-DQ2.5 антигенсвязывающую молекулу (антитело), представленную в настоящем описании, которая конъюгирована с одним или несколькими цитотоксическим агентами, такими как химиотерапевтические агенты или лекарственные средства, ингибирующие рост агенты, токсины (например, белковые токсины, обладающие ферментативной активностью токсины бактериального, грибного, растительного или животного происхождения или их фрагменты) или радиоактивные изотопы.

В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), в котором антитело конъюгировано с одним или несколькими лекарственными средствами, включая (но не ограничиваясь только ими) майтансиноид (см. патенты США №№ 5208020, 5416064 и Европейский патент 0425235 B1); ауристин, например, фрагменты DE и DF монометилауристината (ММАЕ и ММАF) (см. патенты США №№ 5635483, 5780588 и 7498298); доластин; калихеамицин или его производные (см. патенты США №№ 5712374, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 5773001 и 5877296; Hinman и др., Cancer Res. 53, 1993, сс. 3336-3342; и Lode и др., Cancer Res. 58, 1998, сс. 2925-2928); антрациклин, такой как дауномицин или доксорубицин (см. Kratz и др., Curr. Med. Chem. 13, 2006, сс. 477-523; Jeffrey и др., Bioorg. Med. Chem. Lett. 16, 2006, сс. 358-362; Torgov и др., Bioconjug. Chem. 16, 2005, сс. 717-721; Nagy и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 2000, сс. 829-834; Dubowchik и др., Bioorg. & Med.

Chem. Letters 12, 2002, сс. 1529-1532; King и др., J. Med. Chem. 45, 2002, сс. 4336-4343; и патент США № 6630579); метотрексат; виндесин; таксан, такой как доцетаксел, паклитаксел, ларотаксел, тесетаксел и ортатаксел; трихотецен и CC1065.

5 В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит антитело, представленное в настоящем описании, конъюгированное с обладающим ферментативной активностью токсином или его фрагментом, включая (но не ограничиваясь только ими) А-цепь дифтерийного токсина, несвязывающиеся активные фрагменты дифтерийного токсина, А-цепь
10 экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), А-цепь рицина, А-цепь абрина, А-цепь модецина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, диантиновые белки, белки *Phytolaca americana* (РАPI, РАPII и РАР -5), ингибитор из *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор из *Saponaria officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трихотецены.

15 В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит антитело, представленное в настоящем описании, конъюгированное с радиоактивным атомом с образованием радиоконъюгата. Для получения радиоконъюгатов можно применять широкое разнообразие радиоактивных изотопов. Примеры включают ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P ,
20 ^{212}Pb и радиоактивные изотопы Lu. Когда радиоконъюгат применяют для детекции, то он может содержать радиоактивный атом для сцинтиграфических исследований, например, $\text{Tc}^{99\text{m}}$ или I^{123} , или спиновую метку для визуализации методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР) (известный также как магнитно-резонансная визуализация, МРВ), такую как йод-123, йод-131, индий-111, фтор-
25 19, углерод-13, азот-15, кислород-17, гадолиний, марганец или железо.

Конъюгаты антитела и цитотоксического агента можно получать с использованием разнообразных бифункциональных связывающих белки агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP),
сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC),
30 иминотиолан (IT), бифункциональные производные сложных имидоэфиров (такие как диметиладипимидат×HCL), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаровый альдегид), бисазидопроизводные (такие как бис(*пара*-азидобензоил)гександиамин),

производные бисдиазония (такие как бис(*пара*-
диазониумбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-
диизоцианат), и обладающие двойной активностью фторсодержащие соединения
(такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, иммунотоксин рицин
5 можно получать согласно методу, описанному у Vitetta и др., Science 238, 1987,
сс. 1098-1104. Меченная с помощью C^{14} 1-изотиоцианатбензил-3-
метилдиэтилентриаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) является примером
хелатирующего агента, применяемого для конъюгации радионуклеотида с
антителом (см. WO 94/11026). Линкер может представлять собой
10 «расщепляемый линкер», облегчающий высвобождение цитотоксического
лекарственного средства в клетке. Например, можно использовать неустойчивый
в кислой среде линкер, чувствительный к действию пептидаз линкер,
фотолабильный линкер, диметильный линкер или содержащий дисульфид
линкер (Chari и др., Cancer Res. 52, 1992, сс. 127-131; патент США № 5208020).

15 В контексте настоящего описания под иммуноконъюгатами или ADC
подразумеваются (но не ограничиваясь только ими) указанные конъюгаты,
полученные с использованием перекрестносшивающих реагентов, которые
включают (но не ограничиваясь только ими) BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-
SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфид-EMCS,
20 сульфид-GMBS, сульфид-KMUS, сульфид-MBS, сульфид-SIAB, сульфид-SMCC и
сульфид-SMPB, а также SVSB (сукцинимидил(4-винилсульфон)бензоат), которые
поступают в продажу (например, от фирмы Pierce Biotechnology, Inc., Рокфорд,
шт. Иллинойс, США).

Фармацевтические композиции/препаративные формы

25 Фармацевтические композиции/препаративные формы анти-HLA-DQ2.5
антигенсвязывающей молекулы (антитела), представленной в настоящем
описании, получают путем смешения указанного антитела, имеющего
необходимую степень чистоты, с одним или несколькими необязательными
фармацевтически приемлемыми носителями (Remington's Pharmaceutical
30 Sciences, 16-е изд. под ред. Osol A., 1980) в форме лиофилизированных
композиций или водных растворов. Фармацевтически приемлемые носители, как
правило, являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозах и
концентрациях, они включают (но не ограничиваясь только ими): буферы, такие

как фосфатный, цитратный буферы, а также буферы на основе других органических кислот; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония; хлорид бензетония; фенол; 5 бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол и *мета*-крезол); полипептиды с низкой молекулярной массой (содержащие менее приблизительно 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как 10 поли(винилпирролидон); аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; 15 солеобразующие противоионы, такие как натрий; содержащие металл комплексы (например, комплексы Zn-белок); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ). В контексте настоящего описания примеры фармацевтически приемлемых носителей включают также диспергирующие агенты интерстициальных лекарственных средств, такие как растворимые активные в нейтральной среде гликопротеины гиалуронидаз 20 (sHASEGP), например, человеческие растворимые гликопротеины гиалуронидазы PH-20, такие как гHuPH20 (HYLENEX[®], фирма Baxter International, Inc.). Некоторые примеры sHASEGP и методы их применения, в том числе гHuPH20, описаны в публикациях патентов США №№ 2005/0260186 и 2006/0104968. Согласно одному из объектов изобретения sHASEGP объединяют с одним или несколькими дополнительными гликозаминогликаназами, такими 25 как хондроитиназы.

Примеры лиофилизированных препаративных форм антител описаны в патенте США № 6267958. Водные композиции антител включают композиции, описанные в патенте США № 6171586 и WO 2006/044908, последние 30 композиции включают гистидин-ацетатный буфер.

Указанная в настоящем описании композиция/препаративная форма может содержать также более одного действующего вещества, если это необходимо для конкретного подлежащего лечению показания, предпочтительно вещества с

дополнительными видами активности, которые не оказывают отрицательного воздействия друг на друга. Например, может оказаться желательным дополнительное создание лекарственного средства, которое можно объединять с анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающей молекулой (антителом). Указанные действующие вещества предпочтительно присутствуют в комбинации в количествах, эффективных для поставленной цели.

Действующие вещества можно включать также в микрокапсулы, например, полученные с помощью методов коацервации или межфазной полимеризации, например в гидроксиметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и поли(метилметакрилатные) микрокапсулы соответственно, в коллоидные системы введения лекарственного средства (например в липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) или в макроэмульсии. Такие методы описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16-е изд., под ред. Osol A., 1980.

Можно готовить препараты с замедленным высвобождением. Приемлемыми примерами препаратов с замедленным высвобождением являются полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, включающие антитело, такие матрицы представляют собой изделия определенной формы, например, пленки или микрокапсулы.

Композиции/препаративные формы, предназначенные для применения *in vivo*, как правило, должны быть стерильными. Стерильность можно легко обеспечивать, например, путем фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны.

Терапевтические способы и композиции

Любые из анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающих молекул (антител), представленных в настоящем описании, можно применять в терапевтических способах. Одним из объектов изобретения является анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающая молекула (антитело), предназначенная для применения в качестве лекарственного средства. Другими объектами изобретения является анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающая молекула (антитело), предназначенная для лечения глютеновой энтеропатии. В конкретных вариантах осуществления изобретения предложена анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающая молекула (антитело) для применения в способе лечения. В конкретных вариантах

осуществления изобретения предложена анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающая молекула (антитело) для применения в способе лечения индивидуума, имеющего глютеную энтеропатию, который включает введение индивидууму в эффективном количестве анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающей молекулы (антитела). В одном из указанных вариантов осуществления изобретения способ включает также введение индивидууму в эффективном количестве по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента, например, описанного ниже.

Следующим объектом изобретения является применение анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающей молекулы (антитела) для производства или приготовления лекарственного средства. В одном из вариантов осуществления изобретения лекарственное средство предназначено для лечения глютенной энтеропатии. В следующем варианте осуществления изобретения лекарственное средство предназначено для применения в способе лечения глютенной энтеропатии, включающем введение индивидууму, имеющему глютенную энтеропатию, в эффективном количестве лекарственного средства. В одном из указанных вариантов осуществления изобретения способ включает также введение индивидууму в эффективном количестве по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента, например, описанного ниже.

В некоторых вариантах осуществления изобретения в настоящем описании предложено применение мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в изобретении, для приготовления лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления изобретения лекарственное средство представляет собой лекарственное средство, предназначенное для лечения и/или предупреждения глютенной энтеропатии.

В следующем объекте изобретения предложен способ лечения глютенной энтеропатии. В одном из вариантов осуществления изобретения способ включает введение индивидууму, имеющему глютенную энтеропатию, в эффективном количестве анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающей молекулы (антитела). В одном из указанных вариантов осуществления изобретения способ включает также введение индивидууму в эффективном количестве по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента, например, описанного ниже.

«Индивидуум» в контексте любого из указанных выше вариантов осуществления изобретения может представлять собой человека.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, представленных в настоящем описании, предложен способ лечения индивидуума, имеющего
5 глютеновую энтеропатию, включающий введение индивидууму в эффективном количестве мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в изобретении. В некоторых вариантах осуществления изобретения, представленных в настоящем описании, предложено применение
10 мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в изобретении, для лечения индивидуума, который имеет глютеновую энтеропатию.

В следующем объекте изобретения предложена фармацевтическая композиция/препаративная форма, содержащая любую из анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающих молекул (антител), представленных в настоящем описании,
15 например, для применения в любом из вышеуказанных терапевтических способов при глютеновой энтеропатии. В одном из вариантов осуществления изобретения фармацевтическая композиция/препаративная форма содержит любую из анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающих молекул, представленных в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый носитель. В другом
20 варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция/препаративная форма содержит любую из анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающих молекул, представленных в настоящем описании, и по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент, например, описанный ниже.

В некоторых вариантах осуществления изобретения в настоящем описании предложена фармацевтическая композиция/препаративная форма, которая
25 содержит мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу, предлагаемую в изобретении, и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция/препаративная форма представляет собой фармацевтическую
30 композицию/препаративную форму, предназначенную для применения для лечения и/или предупреждения глютеновой энтеропатии.

Антитела, предлагаемые в изобретении, можно применять в терапии либо индивидуально, либо в комбинации с другими агентами. Например, антитело, предлагаемое в изобретении, можно вводить совместно по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим агентом. В конкретных вариантах осуществления изобретения дополнительный терапевтический агент может представлять собой любой агент, пригодный для совместного введения и доступный специалистам в данной области.

Антитело, предлагаемое в изобретении, можно применять в терапии либо индивидуально, либо в комбинации с другим антителом. Например, антитело, предлагаемое в изобретении, можно вводить совместно по меньшей мере с одним дополнительным антителом, предлагаемым в изобретении. В конкретных вариантах осуществления изобретения указанные антитела вводят вместе или одновременно или последовательно. В конкретных вариантах осуществления изобретения вводят смесь, коктейль или комбинацию указанных антител, которые пригодны для совместного введения. Указанные антитела могут представлять собой любые антитела, указанные в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления изобретения указанные антитела представляют собой два или большее количество гомодимерных антител, представленных в настоящем описании, таких как DQN0344xx и DQN0385ee, или любые оптимизированные и/или гуманизированные варианты DQN0344xx и DQN0385ee.

Указанные комбинированные терапии, упомянутые выше, включают совместное введение (при котором два или большее количество терапевтических агентов включают в одни и те же или в различные препаративные формы), и раздельное введение, при котором введение антитела, предлагаемого в изобретении, можно осуществлять до, одновременно и/или после введения дополнительного терапевтического агента или терапевтических агентов. В одном из вариантов осуществления изобретения введение анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающей молекулы (антитела) и введение дополнительного терапевтического агента осуществляют примерно в течение одного месяца, или в течение примерно одной, двух или трех недель, или в течение примерно одного, двух, трех, четырех, пяти или шести дней относительно друг от друга.

Антитело, предлагаемое в изобретении (и любой дополнительный терапевтический агент), можно вводить любыми приемлемыми путями, включая парентеральный, внутривенный и интраназальный пути, и при необходимости применять для местной обработки, введения в повреждение. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, 5 внутривентриальное или подкожное введение. Дозирование можно осуществлять любым приемлемым путем, например, путем инъекций, таких как внутривенные или подкожные инъекции, в зависимости, в том числе, от того, является ли лечение кратковременным или хроническим. Можно применять различные 10 схемы дозирования, включая (но не ограничиваясь только ими) однократное введение или несколько введений в различные моменты времени, болюсное введение и пульсирующую инфузию.

В процессе лечения можно вводить два или большее количество антител, предлагаемых в изобретении (т.е. два или большее количество терапевтических 15 агентов, предлагаемых в изобретении). Их можно вводить отдельно или одновременно. Их можно вводить совместно. При совместном введении два или большее количество антител можно вводить одновременно или отдельно. В некоторых случаях определенное антитело/определенный агент вводят первым; и можно осуществлять мониторинг симптома; и в зависимости от симптома при 20 необходимости можно дополнительно вводить другое антитело/другой агент. Альтернативно этому, два или большее количество антител, предлагаемых в изобретении, могут входить в комбинированное лекарственное средство /комбинированный агент. Указанное/указанный комбинированное лекарственное средство /комбинированный агент можно вводить методом, указанным в 25 настоящем описании. Дозу/схему дозирования каждого антитела, входящего в комбинацию, можно определять как указано в настоящем описании.

Антитела, предлагаемые в изобретении, можно включать в состав композиций, дозировать и вводить в соответствии с надлежащей клинической практикой. Рассматриваемые в этом контексте факторы включают конкретное 30 нарушение, подлежащее лечению, конкретное заболевание, подлежащее лечению, клиническое состояние индивидуального пациента, причину нарушения, область введения агента, метод введения, схему введения и другие факторы, известные практикующим медикам. Антитело можно, но это не

является обязательным, включать в композицию в сочетании с одним или несколькими агентами, которые в настоящее время применяют для профилактики или лечения рассматриваемого нарушения. Эффективное количество указанных других агентов зависит от количества антитела, присутствующего в композиции, типа нарушения или лечения и других указанных выше факторов. Их, как правило, применяют в таких же дозах и с использованием таких же путей введения, которые указаны в настоящем описании, или в дозах, составляющих примерно от 1 до 99% от доз, указанных в настоящем описании, или в любой дозе и с использованием любого пути введения, которые эмпирическим/клиническим путем оценивают в качестве пригодных.

Для предупреждения или лечения заболевания приемлемая доза антитела, предлагаемого в изобретении (при его применении индивидуально или в комбинации с одним или несколькими другими дополнительными терапевтическими агентами), должна зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, типа антитела, серьезности и течения болезни, применяют ли антитело для превентивных или терапевтических целей, предшествующей терапии, истории болезни пациента и ответа на антитело, а также предписания лечащего врача. Антитело можно вводить пациенту однократно или в виде серии обработок.

В зависимости от типа и серьезности заболевания дозу антитела, составляющую примерно от 1 мкг/кг до 15 мг/кг (например, 0,1-10 мг/кг) можно рассматривать в качестве начальной дозы-кандидата для введения пациенту, например, путем либо одного или нескольких отдельных введений, либо путем непрерывной инфузии. Одна из типичных суточных доз может составлять от примерно 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более в зависимости от упомянутых выше факторов. Для повторных введений в течение нескольких дней или более длительного периода, в зависимости от состояния, лечение, как правило, следует продолжать до тех пор, пока не произойдет желаемое подавление симптомов заболевания. Одна из приведенных в качестве примера доз антитела может составлять от примерно 0,05 мг/кг до примерно 10 мг/кг. Таким образом, пациентам можно вводить одну или несколько доз, составляющих примерно 0,5 мг/кг, 2,0 мг/кг, 4,0 мг/кг или 10 мг/кг (или любую их комбинацию). Такие дозы

можно вводить с перерывами, например, каждую неделю или каждые три недели (например, таким образом, чтобы пациент получал примерно от двух до примерно двадцати или, например, около шести доз антитела). Можно вводить начальную более высокую ударную дозу, за которой следует одна или несколько более низких доз. Прогресс такой терапии легко контролировать с помощью обычных методов и анализов.

Должно быть очевидно, что в любых из вышеуказанных препаративных форм и при осуществлении любых из вышеуказанных терапевтических способов можно применять иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, вместо или в дополнение к анти-HLA-DQ2.5 антигенсвязывающей молекуле (антителу).

Наборы/изделия

Другим объектом изобретения является набор или изделие, содержащий/содержащее продукты, которые можно применять для лечения, предупреждения и/или диагностирования описанных выше нарушений. Набор или изделие включает контейнер и этикетку или вкладыш в упаковку, прилагаемую/прилагаемый к контейнеру. Приемлемыми контейнерами являются, например банки, пузырьки, шприцы, пакеты для внутривенного (IV) раствора и т.д. Контейнеры можно изготавливать из различных материалов, таких как стекло или пластмасса. Контейнер содержит композицию, которая сама по себе или в сочетании с другой композицией является эффективной для лечения, предупреждения и/или диагностирования состояния, и может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может представлять собой пакет для внутривенного раствора или пузырек, снабженный пробкой, которую можно прокалывать с помощью иглы для подкожных инъекций). По меньшей мере одно действующее вещество в композиции представляет собой антитело, предлагаемое в изобретении. На этикетке или листовке-вкладыше в упаковку указано, что композицию применяют для лечения выбранного состояния. Кроме того, набор или изделие может включать (а) первый контейнер с находящейся в нем композицией, которая содержит антитело, предлагаемое в изобретении; и (б) второй контейнер с находящейся в нем композицией, где композиция содержит дополнительный цитотоксический или другой терапевтический агент. Согласно этому варианту осуществления изобретения набор или изделие может содержать также листовку-вкладыш в упаковку, которая содержит информацию о том, что

композиции можно использовать для лечения конкретного состояния. В альтернативном или дополнительном варианте набор или изделие может дополнительно включать второй (или третий) контейнер с фармацевтически приемлемым буфером, таким как бактериостатическая вода для инъекций (БСВИ), забуференный фосфатом физиологический раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Кроме того, оно может включать другие продукты, необходимые с коммерческой точки зрения и с точки зрения потребителя, в частности, другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

10 Должно быть очевидно, что любые наборы или изделия могут включать иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, вместо или в дополнение к анти- HLA-DQ2.5 антигенсвязывающей молекуле (антителу).

В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен набор, предназначенный для применения для лечения и/или предупреждения глютеновой энтеропатии, который содержит по меньшей мере мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу, предлагаемую в изобретении, и инструкцию по применению.

Способы применения антигенсвязывающих молекул

Антигенсвязывающие молекулы, представленные в настоящем описании, можно объединять с различными технологиями, применяемыми ранее в 20 медицине. Примерами технологий, которые можно объединять с антигенсвязывающими молекулами, представленными в настоящем описании, являются (но не ограничиваясь только ими) методы включения нуклеиновой кислоты, кодирующей антигенсвязывающую молекулу, в живой организм с использованием вирусного вектора или т.п. и непосредственную экспрессию 25 антигенсвязывающей молекулы. Примерами указанных вирусных векторов являются (но не ограничиваясь только ими) аденовирусы. Альтернативно этому, можно непосредственно включать нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенсвязывающую молекулу, в живой организм, с использованием, например, метода электропорации или метода непосредственного введения нуклеиновой 30 кислоты без вирусного вектора. Альтернативно этому, можно вводить в живой организм клетку, генетически модифицированную так, что она секретирует/экспрессирует антигенсвязывающую молекулу, и давать антигенсвязывающей молекуле постоянно секретироваться в живом организме.

Хотя изобретение будет описано в некоторых деталях с целью иллюстрации и примера для ясности понимания, описание и примеры не следует истолковывать как ограничивающие объем изобретения. Описание всей патентной и научной литературы, процитированной в настоящем описании, включено в него во всей их полноте в качестве ссылки.

Примеры

Ниже представлены примеры композиций, предлагаемых в изобретении. Должно быть очевидно, что при воплощении на практике можно использовать другие варианты осуществления изобретения с учетом представленного выше общего описания.

Пример 1

Экспрессия и очистка рекомбинантных белков

1.1. Экспрессия и очистка рекомбинантного комплекса HLA-DQ2.5/33-мерный пептид глиаина, комплекса HLA-DQ2.5/пептид гамма 2 глиаина и комплекса HLA-DQ2.5/пептид ВС-гордеина

Экспрессия и очистка рекомбинантного комплекса HLA-DQ2.5/33-мерный пептид глиаина

Применяемые для экспрессии и очистки последовательности представляли собой: HLA-DQA1*0501 (Банк данных трехмерных структур белков и нуклеиновых кислот (Protein Data Bank), код доступа 4OZG) и HLA-DQB1*0201 (Protein Data Bank, код доступа 4OZG), которые обе имели сигнальную последовательность CAMPATH-1H: MGWSCILFLVATATGVHS (SEQ ID NO: 170). Последовательность HLA-DQA1*0501 содержала мутацию С47S, GGGG-линкер (SEQ ID NO: 171) и последовательность лейциновой молнии c-fos (PNAS, 95(20), 29 сентября 1998 г., сс. 11828-11833) и Flag-метку на С-конце HLA-DQA1*0501. Последовательность HLA-DQB1* 0201 содержала последовательность 33-мерного пептида глиаина:

LQLQPFQPELPYPQPELPYPQPELPYPQPQPF (SEQ ID NO: 172) и линкер, расщепляемый фактором X (Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.

63(Pt 12), 1 декабря 2007 г., сс 1021-1025.), на N-конце HLA-DQB1*0201, GGGGG-линкер (SEQ ID NO: 173) и последовательность лейциновой молнии c-jun (PNAS, 95(20), 29 сентября 1998 г., сс. 11828-11833), GGGGG-линкер (SEQ ID NO: 173) и VAP-последовательность (BMC Biotechnol. 8, 2008, с. 41), 8 × His-

метку на С-конце HLA-DQB1*0201. Рекомбинантный комплекс HLA-DQ2.5/33-
мерный пептид глиаина кратковременно экспрессировали с использованием
клеточной линии FreeStyle293-F (фирма Thermo Fisher). Кондиционированную
5 пептид глиаина, инкубировали со смолой для иммобилизованной
металлоаффинной хроматографии (IMAC), после чего осуществляли элюцию
имидазолом. Фракции, содержащие комплекс HLA-DQ2.5/33-мерный пептид
глиаина, собирали и затем переносили на колонку для гель-фильтрации
Супердекс 200 (фирма GE healthcare), уравновешенную 1×3ФР. Затем фракции,
10 содержащие комплекс HLA-DQ2.5/33-мерный пептид глиаина, объединяли и
хранили при -80° Цельсия (С).

Экспрессия и очистка рекомбинантного комплекса HLA-DQ2.5/пептид
гамма 2 глиаина

Применяемые для экспрессии и очистки последовательности представляли
15 собой: HLA-DQA1*0501 (Protein Data Bank, код доступа 4OZG) и HLA-
DQB1*0201 (Protein Data Bank, код доступа 4OZG), которые обе имели
сигнальную последовательность CAMPATH-1H: MGWSCIILFLVATATGVHS
(SEQ ID NO: 170). Последовательность HLA-DQA1*0501 содержала мутацию
С47S, линкер, расщепляемый протеазой 3С: LEVLFQGP (SEQ ID NO: 174),
20 GGGG-линкер (SEQ ID NO: 171) и последовательность лейциновой молнии с-fos
(PNAS, 95(20), 29 сентября 1998 г., сс. 11828-11833) и Flag-метку на С-конце
HLA-DQA1*0501. Последовательность HLA-DQB1* 0201 содержала
последовательность пептида гамма 2 глиаина: IIQPEQPAQLP (SEQ ID NO: 175)
и линкер для фактора расщепления X (Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst
25 Commun. 63(Pt 12), 1 декабря 2007 г., сс 1021-1025) на N-конце HLA-
DQB1*0201, линкер, расщепляемый протеазой 3С: LEVLFQGP (SEQ ID NO:
174), и последовательность лейциновой молнии с-jun (PNAS, 95(20), 29 сентября
1998 г., сс. 11828-11833), GGGGG-линкер (SEQ ID NO: 173) и VAP-
последовательность (BMC Biotechnol. 8, 2008, с. 41), 8 × His-метку на С-конце
30 HLA-DQB1*0201. Рекомбинантный комплекс HLA-DQ2.5/пептид гамма 2
глиаина кратковременно экспрессировали с использованием клеточной линии
FreeStyle293-F. Кондиционированную среду, в которой происходила экспрессия
комплекса HLA-DQ2.5/пептид гамма 2 глиаина, инкубировали с IMAC-смолой,

после чего осуществляли элюцию имидазолом. Фракции, содержащие комплекс HLA-DQ2.5/пептид гамма 2 глиаина, собирали и затем переносили на колонку для гель-фильтрации Супердекс 200, уравновешенную 1×3ФР. Затем фракции, содержащие комплекс HLA-DQ2.5/пептид гамма 2 глиаина, объединяли и хранили при -80°C.

Экспрессия и очистка рекомбинантного комплекса HLA-DQ2.5/пептид ВС-гордеина

Применяемые для экспрессии и очистки последовательности представляли собой: HLA-DQA1*0501 (Protein Data Bank, код доступа 4OZG) и HLA-DQB1*0201 (Protein Data Bank, код доступа 4OZG), которые обе имели сигнальную последовательность CAMPATH-1H: MGWSCIILFLVATATGVHS (SEQ ID NO: 170). Последовательность HLA-DQA1*0501 содержала мутацию C47S, линкер, расщепляемый протеазой 3C: LEVLFQGP (SEQ ID NO: 174), GGGG-линкер (SEQ ID NO: 171) и последовательность лейциновой молнии c-fos (PNAS, 95(20), 29 сентября 1998 г., сс. 11828-11833) и Flag-метку на С-конце HLA-DQA1*0501. Последовательность HLA-DQB1* 0201 HLA-DQB1* 0201 содержала последовательность пептида ВС-гордеин: EPEQPIPEQPQPYPQQP (SEQ ID NO: 176), и линкер для фактора расщепления X (Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 63(Pt 12), 1 декабря 2007 г., сс 1021-1025) на N-конце HLA-DQB1*0201, линкер, расщепляемый протеазой 3C: LEVLFQGP (SEQ ID NO: 174), и последовательность лейциновой молнии c-jun (PNAS, 95(20), 29 сентября 1998 г., сс. 11828-11833), GGGGG-линкер (SEQ ID NO: 173) и ВАР-последовательность (BMC Biotechnol. 8, 2008, с. 41), 8 × His-метку на С-конце HLA-DQB1*0201. Рекомбинантный комплекс HLA-DQ2.5/пептид ВС-гордеина кратковременно экспрессировали с использованием клеточной линии FreeStyle293-F. Кондиционированную среду, в которой происходила экспрессия комплекса HLA-DQ2.5/пептид ВС-гордеина, инкубировали с ИМАС-смолой, после чего осуществляли элюцию имидазолом. Фракции, содержащие комплекс HLA-DQ2.5/пептид ВС-гордеина, собирали и затем переносили на колонку для гель-фильтрации Супердекс 200, уравновешенную 1×3ФР. Затем фракции, содержащие комплекс HLA-DQ2.5/пептид ВС-гордеина, объединяли и хранили при -80°C.

Пример 2

2.1 Создание клеточных линий Ва/F3, экспрессирующих HLA-DQ2.5, HLA-DQ2.2, HLA-DQ7.5, HLA-DQ8, HLA-DQ5.1, HLA-DQ6.3, HLA-DQ7.3, HLA-DR и HLA-DP

- 5 кДНК HLA-DQA1*0501 (IMGT/HLA, регистрационный № HLA00613), кДНК HLA-DQA1*0201 (IMGT/HLA, регистрационный № HLA00607), кДНК HLA-DQA1*0505 (IMGT/HLA регистрационный № HLA00619), кДНК HLA-DQA1*0301 (IMGT/HLA, регистрационный № HLA00608), кДНК HLA-DQA1*0101 (IMGT/HLA, регистрационный №. HLA00601), кДНК HLA-DQA1*0103 (IMGT/HLA, регистрационный № HLA00604), кДНК HLA-DQA1*0303 (IMGT/HLA, регистрационный № HLA00611), кДНК HLA-DRA1*0101 (GenBank, регистрационный № NM_019111.4) или кДНК HLADPA1*0103 (IMGT/HLA, регистрационный № HLA00499), встраивали в экспрессионный вектор pCXND3 (WO 2008/156083)
- 15 кДНК HLA-DQB1*0201 (IMGT/HLA, регистрационный № HLA00622), кДНК HLA-DQB1*0202 (IMGT/HLA, регистрационный № HLA00623), кДНК HLA-DQB1*0301 (IMGT/HLA, регистрационный №. HLA00625), кДНК HLA-DQB1*0302 (IMGT/HLA, регистрационный № HLA00627), кДНК HLA-DQB1*0501 (IMGT/HLA, регистрационный № HLA00638), кДНК HLA-DQB1*0603 (IMGT/HLA, регистрационный №. HLA00647), кДНК HLA-DRB1*0301 (IMGT/HLA, регистрационный №. HLA00671) или кДНК HLA-DPB1*0401 (IMGT/HLA, регистрационный № HLA00521) встраивали в экспрессионный вектор pCXZD1 (US/20090324589).

25 Каждый из линейризованных HLA-DQA1*0501-pCXND3 и HLA-DQB1*0201-pCXZD1 и каждый из линейризованных HLA-DQA1*0201-pCXND3 и HLA-DQB1*0202-pCXZD1, HLA-DQA1*0505-pCXND3 и HLA-DQB1*0301-pCXZD1, HLA-DQA1*0301-pCXND3 и HLA-DQB1*0302-pCXZD1, HLA-DQA1*0101-pCXND3 и HLA-DQB1*0501-pCXZD1, HLA-DQA1*0103-pCXND3 и HLA-DQB1*0603-pCXZD1, 30 HLA-DQA1*0303-pCXND3 и HLA-DQB1*0301-pCXZD1, HLA-DRA1*0101-pCXND3 и HLA-DRB1*0301-pCXZD1, HLA-DPA1*0103-pCXND3 и HLA-DPB1*0401-pCXZD1

одновременно интродуцировали в мышиную IL-3-зависимую полученную из про-В-клеток клеточную линию Ba/F3 путем электропорации (фирма LONZA, устройство 4D-Nucleofector X). Затем трансфектированные клетки культивировали в средах, содержащих генетицин и зеоцин. Затем культивированные и размноженные клетки оценивали в отношении экспрессии молекулы HLA и подтверждали высокую экспрессию HLA.

Созданные клеточные линии обозначали как Ba/F3-HLA-DQ2.5 (HLA-DQA1*0501, HLA-DQB1*0201), Ba/F3-HLA-DQ2.2 (HLA-DQA1*0201, HLA-DQB1*0202), Ba/F3-HLA-DQ7.5 (HLA-DQA1*0505, HLA-DQB1*0301), Ba/F3-HLA-DQ8 (HLA-DQA1*0301, HLA-DQB1*0302), Ba/F3-HLA-DQ5.1 (HLA-DQA1*0101, HLA-DQB1*0501), Ba/F3-HLA-DQ6.3 (HLA-DQA1*0103, HLA-DQB1*0603), Ba/F3-HLA-DQ7.3 (HLA-DQA1*0303, HLA-DQB1*0301), Ba/F3-HLA-DR (HLA-DRA1*0101, HLA-DRB1*0301), Ba/F3-HLA-DP (HLA-DPA1*0103, HLA-DPB1*0401).

2.2 Создание клеточных линий Ba/F3, экспрессирующих HLA-DQ2.5/пептид CLIP, HLA-DQ2.5/пептид вируса гепатита В, HLA-DQ2.5/пептид Salmonella, HLA-DQ2.5/пептид тиропероксидазы, HLA-DQ2.5/пептид Mycobacterium bovis, HLA-DQ2.5/пептид альфа 1 глиаина, HLA-DQ2.5/пептид альфа 2 глиаина, HLA-DQ2.5/пептид гамма 1 глиаина, HLA-DQ2.5/пептид гамма 2 глиаина, HLA-DQ2.5/пептид омега 1 глиаина, HLA-DQ2.5/пептид омега 2 глиаина, HLA-DQ2.5/пептид ВС-гордеина, HLA-DQ2.5/пептид альфа 3 глиаина, HLA-DQ2.5/пептид альфа 1b глиаина, HLA-DQ2.5/пептид гамма 4a глиаина, HLA-DQ2.5/пептид гамма 4b глиаина, HLA-DQ2.5/пептид авенина 1, HLA-DQ2.5/пептид авенина 2, HLA-DQ2.5/пептид авенина 3, HLA-DQ2.5/пептид гордеина 1, HLA-DQ2.5/пептид гордеина 2, HLA-DQ2.5/пептид секалина 1, HLA-DQ2.5/пептид секалина 2, HLA-DQ2.5/33-мерный пептид глиаина, HLA-DQ2.5/26-мерный пептид глиаина

кДНК HLA-DQA1*0501 (IMGT/HLA, регистрационный № HLA00613) встраивали в экспрессионный вектор pCXND3 (WO 2008/156083).

кДНК HLA-DQB1*0201 (IMGT/HLA, регистрационный № HLA00622) встраивали в экспрессионный вектор pCXZD1 (US/20090324589). HLA-DQB1*0201 для комплекса HLA-DQ2.5/каждый указанный пептид имела пептидную последовательность и линкер, расщепляемый фактором X: (Acta

Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 63(Pt 12), 1 декабря 2007 г., сс. 1021-1025) на N-конце HLA-DQB1*0201. В частности, в каждой пептидной последовательности применяли KLPKPPKPVSKMRMATPLLMQALPMGALP (SEQ ID NO: 177) в качестве пептидной последовательности CLIP (hCLIP), применяли PDRVHFA SPLHVAWR (SEQ ID NO: 178) в качестве пептидной последовательности вируса гепатита В, применяли MMAWRMMRY (SEQ ID NO: 179) в качестве пептидной последовательности *Salmonella*, применяли YIDVWLGGLAENFLPY (SEQ ID NO: 180) в качестве пептидной последовательности тиропероксидазы, применяли KPLLIAEDVEGEY (SEQ ID NO: 181) в качестве пептидной последовательности *Mycobacterium bovis*, применяли QPFPQPELPYP (SEQ ID NO: 182) в качестве пептидной последовательности альфа 1 глиаина, применяли FPQPELPYPQP (SEQ ID NO: 183) в качестве пептидной последовательности альфа 2 глиаина, применяли QPQQSFPEQQQ (SEQ ID NO: 184) в качестве пептидной последовательности гамма 1 глиаина, применяли GIQPEQPAQLP (SEQ ID NO: 185) в качестве пептидной последовательности гамма 2 глиаина, применяли QPFPQPEQPFP (SEQ ID NO: 186) в качестве пептидной последовательности омега 1 глиаина, применяли FPQPEQPFPWQ (SEQ ID NO: 187) в качестве пептидной последовательности омега 2 глиаина, применяли PQQPIPEQPQPYPQQP (SEQ ID NO: 188) в качестве пептидной последовательности ВС-гордеина, применяли PFRPEQPYPQP (SEQ ID NO: 189) в качестве пептидной последовательности альфа 3 глиаина, применяли LPYPQPELPYP (SEQ ID NO: 190) в качестве пептидной последовательности альфа 1b глиаина, применяли FSQPEQEFPQP (SEQ ID NO: 191) в качестве пептидной последовательности гамма 4a глиаина, применяли FPQPEQEFPQP (SEQ ID NO: 192) в качестве пептидной последовательности гамма 4b глиаина, применяли QPYPEQEEPFV (SEQ ID NO: 193) в качестве пептидной последовательности авенина 1, применяли QPYPEQEQPFPV (SEQ ID NO: 194) в качестве пептидной последовательности авенина 2, применяли QPYPEQEQPIL (SEQ ID NO: 195) в качестве пептидной последовательности авенина 3, применяли PQQPFPQPEQPFRQ (SEQ ID NO: 196) в качестве пептидной последовательности гордеина 1, применяли QEFPQPEQPFPQQP (SEQ ID NO: 197) в качестве пептидной последовательности гордеина 2, применяли PEQPFPQPEQPFPQ (SEQ ID NO: 198) в качестве

пептидной последовательности секалина 1, применяли QPFPQPEQPFPQSQ (SEQ ID NO: 199) в качестве пептидной последовательности секалина 2, применяли PQQQTLQPEQPAQLP (SEQ ID NO: 200) в качестве последовательности 14-мерного пептида 1, применяли LQLQPFPQPELPYPQPELPYPQPELPYPQRPQPF (SEQ ID NO: 201) в качестве пептидной последовательности 33-мерного пептида глиаина, применяли FLQPEQPFPEQPEQPYPEQPEQPFQ (SEQ ID NO: 202) в качестве пептидной последовательности 26-мерного пептида глиаина.

Каждый из линеаризованных HLA-DQA1*0501-pCXND3 и HLA-DQB1*0201/каждый указанный пептид-pCXZD1 одновременно интродуцировали в мышиную IL-3-зависимую полученную из про-B-клеток клеточную линию Ba/F3 путем электропорации (фирма LONZA, устройство 4D-Nucleofector X). Затем трансфектированные клетки культивировали в средах, содержащих генетицин и зеоцин.

Затем культивированные и размноженные клетки оценивали в отношении экспрессии молекулы HLA-DQ2.5 и подтверждали высокую экспрессию HLA-DQ2.5.

Созданные клеточные линии обозначали как Ba/F3-HLA-DQ2.5/CLIP (HLA-DQA1*0501, HLA-DQB1*0201 для HLA-DQ2.5/пептид CLIP), Ba/F3-HLA-DQ2.5/HBV1 (HLA-DQA1*0501, HLA-DQB1*0201 для HLA-DQ2.5/пептид вируса гепатита В), Ba/F3-HLA-DQ2.5/*Salmonella* (HLA-DQA1*0501, HLA-DQB1*0201 для HLA-DQ2.5 /пептид *Salmonella*), Ba/F3-HLA-DQ2.5/TPO (HLA-DQA1*0501, HLA-DQB1*0201 для HLA-DQ2.5/пептид тиропероксидазы), Ba/F3-HLA-DQ2.5/*M. bovis* (HLA-DQA1*0501, HLA-DQB1*0201 для HLA-DQ2.5/пептид *Mycobacterium bovis*), Ba/F3-HLA-DQ2.5/альфа 1 глиадин (HLA-DQA1*0501, HLA-DQB1*0201 для HLA-DQ2.5/пептид альфа 1 глиаина), Ba/F3-HLA-DQ2.5/альфа 2 глиадин (HLA-DQA1*0501, HLA-DQB1*0201 для HLA-DQ2.5/пептид альфа 2 глиаина), Ba/F3-HLA-DQ2.5/гамма 1 глиадин (HLA-DQA1*0501, HLA-DQB1*0201 для HLA-DQ2.5/пептид гамма 1 глиаина), Ba/F3-HLA-DQ2.5/гамма 2 глиадин (HLA-DQA1*0501, HLA-DQB1*0201 для HLA-DQ2.5/пептид гамма 2 глиаина), Ba/F3-HLA-DQ2.5/омега 1 глиадин (HLA-DQA1*0501, HLA-DQB1*0201 для HLA-DQ2.5/пептид омега 1 глиаина), Ba/F3-HLA-DQ2.5/омега 2 глиадин (HLA-DQA1*0501, HLA-DQB1*0201 для HLA-DQ2.5/пептид омега 2 глиаина), Ba/F3-HLA-DQ2.5/BC-гордеин (HLA-

DQA1*0501, HLA-DQB1*0201 для HLA-DQ2.5/пептид ВС-гордеина), Ва/F3-HLA-DQ2.5/альфа 3 глиадин (HLA-DQA1*0501, HLA-DQB1*0201 для HLA-DQ2.5/пептид альфа 3 глиадин), Ва/F3-HLA-DQ2.5/альфа 1b глиадин (HLA-DQA1*0501, HLA-DQB1*0201 для HLA-DQ2.5/пептид альфа 1b глиадин),
5 Ва/F3-HLA-DQ2.5/гамма 4а глиадин (HLA-DQA1*0501, HLA-DQB1*0201 для HLA-DQ2.5/пептид гамма 4а глиадин), Ва/F3-HLA-DQ2.5/гамма 4b глиадин (HLA-DQA1*0501, HLA-DQB1*0201 для HLA-DQ2.5/пептид гамма 4b глиадин), Ва/F3-HLA-DQ2.5/авенин 1 (HLA-DQA1*0501, HLA-DQB1*0201 для HLA-DQ2.5/пептид авенина 1), Ва/F3-HLA-DQ2.5/авенин 2 (HLA-DQA1*0501, HLA-DQB1*0201 для HLA-DQ2.5/пептид авенина 2), Ва/F3-HLA-DQ2.5/авенин 3 (HLA-DQA1*0501, HLA-DQB1*0201 для HLA-DQ2.5/пептид авенина 3), Ва/F3-HLA-DQ2.5/гордеин 1 (HLA-DQA1*0501, HLA-DQB1*0201 для HLA-DQ2.5/пептид гордеина 1), Ва/F3-HLA-DQ2.5/гордеин 2 (HLA-DQA1*0501, HLA-DQB1*0201 для HLA-DQ2.5/пептид гордеина 2), Ва/F3-HLA-DQ2.5/секалин 1 (HLA-DQA1*0501, HLA-DQB1*0201 для HLA-DQ2.5/пептид секалина 1), Ва/F3-HLA-DQ2.5/секалин 2 (HLA-DQA1*0501, HLA-DQB1*0201 для HLA-DQ2.5/пептид секалина 2), Ва/F3-HLA-DQ2.5/14-мерный 1 (HLA-DQA1*0501, HLA-DQB1*0201 для HLA-DQ2.5/14-мерный пептид 1), Ва/F3-HLA-DQ2.5/33-мерный глиадин (HLA-DQA1*0501, HLA-DQB1*0201 для HLA-DQ2.5/33-мерный пептид глиадин), Ва/F3-HLA-DQ2.5/26-мерный глиадин (HLA-DQA1*0501, HLA-DQB1*0201 для HLA-DQ2.5/26-мерный пептид глиадин).

Пример 3

Идентификация лидерных антител

Лидерные антитела к DQ2.5, такие как DQN0344xx (тяжелая цепь: DQN0344Hx, SEQ ID NO: 71 и легкая цепь: DQN0344Lx, SEQ ID NO: 75) и DQN0385ee (тяжелая цепь: DQN0385He, SEQ ID NO: 79 и легкая цепь: DQN0385Le, SEQ ID NO: 83), отбирали согласно процедурам, описанным в WO 2019/069993.

Гуманизация

30 Хотя DQN0344xx и DQN0385ee обладали благоприятной селективностью и перекрестной реактивностью в отношении комплексов HLA-DQ2.5/глутеновые пептиды, вариабельные области указанных антител представляли собой кроличьи последовательности, таким образом, они не пригодны для введения

пациентам из-за проблемы, связанной с иммуногенностью. Поэтому осуществляли гуманизацию вариабельных областей указанных антител.

Создавали 49 типов VH путем замены каркасных участков DQN0344Hx и DQN0385He на каркасные участки человеческой зародышевой линии (SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 в качестве FR1, SEQ ID NO: 9 для DQN0344Hx и SEQ ID NO: 10 для DQN0385He в качестве FR2, SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15, 16 или 17 в качестве FR3, SEQ ID NO: 18 для DQN0344Hx и SEQ ID NO: 19 для DQN0385He в качестве FR4). Создавали 16 типов VL путем замены каркасных участков DQN0344Lx и DQN0385Le на каркасные участки человеческой зародышевой линии (SEQ ID NO: 20, 21, 22 или 23 в качестве FR1, SEQ ID NO: 24 для DQN0344Lx и SEQ ID NO: 34 для DQN0385Le в качестве FR2, SEQ ID NO: 26, 27, 28 или 29 в качестве FR3, SEQ ID NO: 30 в качестве FR4). Полинуклеотиды, кодирующие DQN0344Hx, DQN0385He и созданные VH, клонировали в экспрессионных векторах, которые содержали полинуклеотиды, кодирующие константную область тяжелой цепи SG1 (SEQ ID NO: 31) соответственно. Полинуклеотиды, кодирующие DQN0344Lx, DQN0385Le и созданные VL, клонировали в экспрессионных векторах, которые содержали полинуклеотиды, кодирующие константную область легкой цепи SK1 (SEQ ID NO: 32) соответственно. Затем тяжелые цепи, содержащие DQN0344Hx или DQN0385He в сочетании с соответствующими созданными VH, кратковременно экспрессировали с соответствующими им легкими цепями, т.е. DQN0344Lx, DQN0385Le или соответствующими созданными VL, в Expi293 (фирма Invitrogen) с последующей очисткой с помощью белка А.

Профили связывания указанных антител с комплексами HLA-DQ2.5/различные глютенотические пептиды оценивали с помощью FCM-анализа. Активность связывания каждого антитела выражали в виде величин средней интенсивности флуоресценции (MFI). Антитела инкубировали с HLA-DQ2.5-глютенотический пептид-Ва/F3-клетки в течение 30 мин при комнатной температуре и промывали FACS-буфером (2% FBS, 2мМ EDTA в 3ФР). Затем добавляли козий F(ab')₂ к человеческому IgG, мышинный ads-PE (фирма Southern Biotech, каталожный № 2043-09) и инкубировали в течение 20 мин в темноте при 4°C, затем промывали. Сбор данных осуществляли с помощью устройства LSRFortessa X-20 (фирма Becton Dickinson), после чего проводили анализ с

использованием программного обеспечения FlowJo (фирма Tree Star) и Microsoft Office Excel2013.

Из 49 типов созданных VH и 16 типов созданных VL отбирали варианты 25H и 09L (которые представлены в таблице 2-1) в качестве последовательностей каркасных участков в DQN0344xx, основываясь на связывании с комплексом HLA-DQ2.5/глютеносвязывающие пептиды, а также на уровне экспрессии антител, и обозначали как DQN034425 (DQN034425H/09L (тяжелая цепь SEQ ID NO: 84, легкая цепь SEQ ID NO: 85)). Однако ни одна из комбинаций FR не могла поддерживать связывающую активность в отношении комплекса HLA-DQ2.5/глютеносвязывающие пептиды, сопоставимую с активностью DQN0385ee. Гуманизация DQN0385ee без ущерба связывающей активности в отношении HLA-DQ2.5/глютеносвязывающие пептиды является сложной задачей. Из многочисленных созданных вариантов, в конце концов, отбирали 0054H и 009L в качестве комбинации FR для DQN0385He и DQN0385Le (см. таблицу 2-1), и обозначали их как DQN0385ee0054 (DQN0385ee0054H/009L (тяжелая цепь SEQ ID NO: 87, легкая цепь SEQ ID NO: 86)).

Таблица 2-1

Отобранные для гуманизации последовательности FR

Обозначение VH или VL	CDR	SEQ ID NO:				
		FR1	FR2	FR3	FR4	Полноразмерн
DQN034425H	Идентичны DQN0344Hx	4	9	14	18	84
DQN034409L	Идентичны DQN0344Lx	20	24	28	30	85
DQN0385ee0054H	Идентичны DQN0385He	4	33	14	19	87
DQN0385ee009L	Идентичны DQN0385Le	20	34	28	30	86

20 Оптимизация Fab

Для повышения связывающей активности в отношении комплексов HLA-DQ2.5/глютеносвязывающие пептиды без повышения связывающей активности в отношении HLA-DQ2.5/нерелевантные пептиды осуществляли обширный мутагенез в CDR и нескольких положениях в FR. Затем осуществляли множество мутаций и комбинаций мутаций для повышения многомерных свойств, таких как селективность связывания с комплексами HLA-DQ2.5/множество глютеносвязывающих

пептидов относительно нерелевантных пептидов, а также физико-химические свойства, такие как уровень экспрессии антител и связывание с ЕСМ, что может влиять на фармакокинетику антител (US 2014/0080153).

Хотя и DQN0344xx, и DQN0385ee были гуманизированы, два остатка цистеина, локализованные в CDRH1 (положение 35a согласно нумерации Кэбота (Kabat и др., Sequence of proteins of immunological interest, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991)) и CDRH2 (положение 50 согласно нумерации Кэбота), которые обычно присутствуют в последовательностях кроличьих антител, могут приводить к неоднородности образования дисульфидных связей. Поэтому осуществляли замену этих остатков цистеина на другие аминокислоты. Однако указанные замены (С35aV/С50А в DQN034425H и С35aS/С50S и DQN0385ee0054H) существенно снижали связывающую активность в отношении HLA-DQ2.5/глютеновые пептиды и/или снижали уровень экспрессии антител. Для повышения аффинности связывания интродуцировали мутации S32A, N73T и D95E в DQN034425H; интродуцировали мутации N28E, A55Y, S56E, H92E, I94V и N95aA в DQN034409L; интродуцировали мутации S30A, S32W, W34F и S61G в DQN0385ee0054H и интродуцировали мутации A25T, L54K и S67L в DQN0385ee009L. Для повышения уровня экспрессии интродуцировали мутации, R16G, S61K, K64E и L102V в DQN034425H и интродуцировали мутации S31E и I35M в DQN0385ee0054H. Кроме того, для снижения связывания с ЕСМ и связывания с HLA-DQ2.5/нерелевантные пептиды, такие как HLA-DQ2.5/CLIP, интродуцировали мутации R16G и K64E в DQN034425H; интродуцировали мутацию S56Y в DQN034409L; интродуцировали мутации T28E, S30A, S61E и G65E в DQN0385ee0054H и интродуцировали мутации S56E и Y94K в DQN0385ee009L. Для снижения величины pI интродуцировали мутации S30E, N64E в DQN0385ee0054H, а для снижения отрицательного заряда интродуцировали мутацию E79Q в DQN0385ee009L.

Все антитела кратковременно экспрессировали в клетках млекопитающих с использованием метода, известного специалистам в данной области, применяя сконструированные гены, и очищали с использованием метода, известного специалистам в данной области. Данные о комбинации аминокислотных замен обобщены в таблице 2-2.

HL	Обозначение	Аминокислотные замены по сравнению с DQN034425H	SEQ ID NO	Обозначение VL	Аминокислотные замены по сравнению с DQN034409L	SEQ ID NO
DQN0344H0976/L0591	DQN0344H0976	R16G/S32A/C35aV/C50A/S61K/K64E/N73T/D95E	88	DQN0344L0591	N28E/A55Y/S56E/H92E/I94V/E95aA	90
DQN0344H1013/L0620	DQN0344H1013	S32A/C35aV/C50A/S61K/K64E/N73T/D95E/L102V	89	DQN0344L0620	S56Y/H92E/I94V/E95aA	91

HL	Обозначение	Аминокислотные замены по сравнению с		Обозначение VL	Аминокислотные замены по сравнению с	
DQN0385H1270/L0722	DQN0385H1270	S31E/S32W/W34F/I35M/C35aS/C50S/S61E/N64E	92	DQN0385L0722	A25T/L54K/S56E/S67L/E79Q/Y94K	98
DQN0385H1270/L0681	DQN0385H1270	S31E/S32W/W34F/I35M/C35aS/C50S/S61E/N64E	92	DQN0385L0681	A25T/L54K/S56E/S67L/Y94K	99
DQN0385H1352/L0681	DQN0385H1352	T28E/S31E/S32W/W34F/I35M/C35aS/C50S/S61E/N64E	93	DQN0385L0681	A25T/L54K/S56E/S67L/Y94K	99
DQN0385H1527/L0605	DQN0385H1527	S30A/S32W/W34F/I35M/C35aS/C50S/S61E/N64E	94	DQN0385L0605	A25T/L54K/S56E/Y94K	100
DQN0385H1255/L0605	DQN0385H1255	S31E/S32W/W34F/I35M/C35aS/C50S/S61G/N64E/G65E	95	DQN0385L0605	A25T/L54K/S56E/Y94K	100
DQN0385H1270/L0722	DQN0385H1270	S31E/S32W/W34F/I35M/C35aS/C50S/S61E/N64E	92	DQN0385L0722	A25T/L54K/S56E/S67L/E79Q/Y94K	98
DQN0385H1521/L0605	DQN0385H1521	S30E/S32W/W34F/I35M/C35aS/C50S/S61E/N64E	96	DQN0385L0605	A25T/L54K/S56E/Y94K	100
DQN0385H1270/L0681	DQN0385H1270	S31E/S32W/W34F/I35M/C35aS/C50S/S61E/N64E	92	DQN0385L0681	A25T/L54K/S56E/S67L/Y94K	99
DQN0385H1352/L0681	DQN0385H1352	T28E/S31E/S32W/W34F/I35M/C35aS/C50S/S61E/N64E	93	DQN0385L0681	A25T/L54K/S56E/S67L/Y94K	99
DQN0385H1353/L0681	DQN0385H1353	S30A/S31E/S32W/W34F/I35M/C35aS/C50S/S61E/N64E	97	DQN0385L0681	A25T/L54K/S56E/S67L/Y94K	99

Таблица 2-2 Обобщение данных об интродуцированных мутациях

Создание биспецифических антител

Для дальнейшего расширения охвата пептидов создавали биспецифические антитела, для которых продемонстрирована широкая перекрестная реактивность связывания с множеством комплексов HLA-DQ2.5/глютенный пептид. Для создания биспецифических антител использовали тринадцать селективных в отношении множества глютенных пептидов анти-HLA-DQ2.5 двухвалентных антител (DQN0344xx, DQN0385ee, DQN034425H/09L, DQN0385ee0054H/009L, DQN0344H0976/L0591, DQN0344H1013/L0620, DQN0385H1270/L0722, DQN0385H1521/L0605, DQN0385H1270/L0681, DQN0385H1352/L0681, DQN0385H1527/L0605, DQN0385H1353/L0681 и DQN0385H1255/L0605). Эти очищенные двухвалентные антитела подвергали технологии обмена Fab-плечей (описанной у Igawa и др., WO 2016/159213), создавая шестнадцать биспецифических антител:

DQN0344xx//DQN0385ee (биспецифическое антитело, содержащее DQN0344xx и DQN0385ee), DQN034425//DQN0385ee0054 (биспецифическое антитело, содержащее DQN034425H/09L и DQN0385ee0054H/009L), DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6 (биспецифическое антитело, содержащее DQN0344H0976/L0591 и DQN0385H1270/L0722), DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6 (биспецифическое антитело, содержащее DQN0344H0976/L0591 и DQN0385H1270/L0681), DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6 (биспецифическое антитело, содержащее DQN0344H0976/L0591 и DQN0385H1352/L0681), DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6 (биспецифическое антитело, содержащее DQN0344H0976/L0591 и DQN0385H1527/L0605), DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6 (биспецифическое антитело, содержащее DQN0344H0976/L0591 и DQN0385H1255/L0605), DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6 (биспецифическое антитело, содержащее DQN0344H1013/L0620 и DQN0385H1270/L0722), DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6 (биспецифическое антитело, содержащее DQN0344H1013/L0620 и DQN0385H1521/L0605), DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6 (биспецифическое антитело, содержащее DQN0344H1013/L0620 и DQN0385H1270/L0681), DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6 (биспецифическое антитело,

содержащее DQN0344H1013/L0620 и DQN0385H1352/L0681),
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6 (биспецифическое антитело,
содержащее DQN0344H1013/L0620 и DQN0385H1353/L0681),
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1521/L0605-F6 (биспецифическое антитело,
5 содержащее DQN0344H0976/L0591 и DQN0385H1521/L0605),
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1353/L0681-F6 (биспецифическое антитело,
содержащее DQN0344H0976/L0591 и DQN0385H1353/L0681),
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1255/L0605-F6 (биспецифическое антитело,
содержащее DQN0344H1013/L0620 и DQN0385H1255/L0605) и
10 DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1527/L0605-F6 (биспецифическое антитело,
содержащее DQN0344H1013/L0620 и DQN0385H1527/L0605). Данные о
комбинации и последовательностях полученных биспецифических антител
обобщены в таблицах 2-3 - 2-6.

Как описано выше, биспецифическое антитело получали с помощью
15 технологии обмена Fab-плечей. Альтернативно этому, их можно создавать путем
трансфекции клеток млекопитающих плазмидами для двух различных тяжелых
цепей и двух различных легких цепей. Для эффективного получения
представляющего интерес биспецифического антитела существуют известные
аминокислотные замены и комбинации в поверхности раздела CHI-CL-домена,
20 которые способствуют ассоциации требуемых H-цепи – L-цепи (WO
2019/065795). Известно, что описанные выше последовательности переменных
областей с указанными константными областями (константная область тяжелой
цепи DQN0344-плеча: SEQ ID NO: 162, константная область легкой цепи
DQN0344-плеча: SEQ ID NO: 106, константная область тяжелой цепи DQN0385-
25 плеча: SEQ ID NO: 163, константная область легкой цепи DQN0385-плеча: SEQ
ID NO: 107. Данные о SEQ ID NO: полноразмерных последовательностей
обобщены в таблицах 2-3 - 2-6), обладают сходными связывающими свойствами
в отношении HLA-DQ2.5/множество глютеновых пептидов.

Таблица 2-3

Обобщение данных и последовательности биспецифических антител

Обозначение биспецифического Ат		DQN0344xx// DQN0385ee	DQN034425// DQN0385ee0054	
Плечо А		DQN0344xx	DQN034425H/09L	
Плечо Б		DQN0385ee	DQN0385ee0054H/009L	
SEQ ID NO	Плечо	HCDR1	68	112
		HCDR2	69	113
		HCDR3	70	114
		VR H-цепи	71	84
		CR H-цепи	101	101
		Полноразмерн. H-цепь	35	38
		Полноразмерн. H-цепь (другая Fc)	36	39
		LCDR1	72	108
		LCDR2	73	109
		LCDR3	74	110
		VR L-цепи	75	111
		CR L-цепи	103	103
	Полноразмерн. L-цепь	37	40	
	Плечо	HCDR1	76	115
		HCDR2	77	116
		HCDR3	78	117
		VR H-цепи	79	87
		CR H-цепи	102	102
		Полноразмерн. H-цепь	47	50
		Полноразмерн. H-цепь (другая Fc)	48	51
		LCDR1	80	118
		LCDR2	81	119
		LCDR3	82	120
		VR L-цепи	83	86
CR L-цепи		103	103	
Полноразмерн. L-цепь	49	52		

Таблица 2-4

Обобщение данных и последовательности биспецифических антител

Обозначение биспецифического Ат		DQN0344 H0976/ L0591// DQN0385 H1270/ L0722-F6	DQN0344 H0976/ L0591// DQN0385 H1270/ L0681-F6	DQN0344 H0976/ L0591// DQN0385 H1352/ L0681-F6	DQN0344 H0976/ L0591// DQN0385 H1527/ L0605-F6	DQN0344 H0976/ L0591// DQN0385 H1255/ L0605-F6	
Плечо		DQN0344 H0976/ L0591	DQN0344 H0976/ L0591	DQN0344 H0976/ L0591	DQN0344 H0976/ L0591	DQN0344 H0976/ L0591	
Плечо		DQN0385 H1270/ L0722	DQN0385 H1270/ L0681	DQN0385 H1352/ L0681	DQN0385 H1527/ L0605	DQN0385 H1255/ L0605	
SEQ ID NO	Плечо А	HCDR1	129	129	129	129	129
		HCDR2	130	130	130	130	130
		HCDR3	131	131	131	131	131
		VR H-цепи	88	88	88	88	88
		CR H-цепи	105	105	105	105	105
		Полноразм. H-цепь	41	41	41	41	41
		Полноразм. H-цепь (другая Fc)	42	42	42	42	42
		LCDR1	132	132	132	132	132
		LCDR2	133	133	133	133	133
		LCDR3	134	134	134	134	134
		VR L-цепи	90	90	90	90	90
		CR L-цепи	106	106	106	106	106
	Полноразм. L-цепь	43	43	43	43	43	
	Плечо Б	HCDR1	135	135	144	147	153
		HCDR2	136	136	145	148	154
		HCDR3	137	137	146	149	155
		VR H-цепи	92	92	93	94	95
		CR H-цепи	104	104	104	104	104
		Полноразм. H-цепь	53	53	57	59	62
		Полноразм. H-цепь (другая Fc)	54	54	58	60	63
		LCDR1	138	141	141	150	150
		LCDR2	139	142	142	151	151
		LCDR3	140	143	143	152	152
VR L-цепи		98	99	99	100	100	
CR L-цепи	107	107	107	107	107		
Полноразм. L-цепь	55	56	56	61	61		

Таблица 2-5

Обобщение данных и последовательности биспецифических антител

Обозначение биспецифического Ат		DQN0344 H1013/ L0620// DQN0385 H1270/ L0722-F6	DQN0344 H1013/ L0620// DQN0385 H1521/ L0605-F6	DQN0344 H1013/ L0620// DQN0385 H1270/ L0681-F6	DQN0344 H1013/ L0620// DQN0385 H1352/ L0681-F6	DQN0344 H1013/ L0620// DQN0385 H1353/ L0681-F6	
Плечо А		DQN0344 H1013/ L0620	DQN0344 H1013/ L0620	DQN0344 H1013/ L0620	DQN0344 H1013/ L0620	DQN0344 H1013/ L0620	
Плечо Б		DQN0385 H1270/ L0722	DQN0385 H1521/ L0605	DQN0385 H1270/ L0681	DQN0385 H1352/ L0681	DQN0385 H1353/ L0681	
SEQ ID NO	Плечо А	HCDR1	164	164	164	164	164
		HCDR2	165	165	165	165	165
		HCDR3	166	166	166	166	166
		VR H-цепи	89	89	89	89	89
		CR H-цепи	105	105	105	105	105
		Полноразм. H-цепь	44	44	44	44	44
		Полноразм. H-цепь (другая Fc)	45	45	45	45	45
		LCDR1	167	167	167	167	167
		LCDR2	168	168	168	168	168
		LCDR3	169	169	169	169	169
		VR L-цепи	91	91	91	91	91
		CR L-цепи	106	106	106	106	106
	Полноразм. L-цепь	46	46	46	46	46	
	Плечо Б	HCDR1	135	156	135	144	159
		HCDR2	136	157	136	145	160
		HCDR3	137	158	137	146	161
		VR H-цепи	92	96	92	93	97
		CR H-цепи	104	104	104	104	104
		Полноразм. H-цепь	53	64	53	57	66
		Полноразм. H-цепь (другая Fc)	54	65	54	58	67
		LCDR1	138	150	141	141	141
		LCDR2	139	151	142	142	142
		LCDR3	140	152	143	143	143
		VR L-цепи	98	100	99	99	99
CR L-цепи		107	107	107	107	107	
Полноразм. L-цепь	55	61	56	56	56		

Таблица 2-6

Обобщение данных и последовательности

Обозначение биспецифического Ат		DQN0344 H0976/ L0591// DQN0385 H1521/ L0605-F6	DQN0344 H0976/ L0591// DQN0385 H1353/ L0681-F6	DQN0344 H1013/ L0620// DQN0385 H1255/ L0605-F6	DQN0344 H1013/ L0620// DQN0385 H1527/ L0605-F6	
Плечо А		DQN0344 H0976/ L0591	DQN0344 H0976/ L0591	DQN0344 H1013/ L0620	DQN0344 H1013/ L0620	
Плечо Б		DQN0385 H1521/ L0605	DQN0385 H1353/ L0681	DQN0385 H1255/ L0605	DQN0385 H1527/ L0605	
SEQ ID NO	Плечо А	HCDR1	129	129	164	164
		HCDR2	130	130	165	165
		HCDR3	131	131	166	166
		VR H-цепи	88	88	89	89
		CR H-цепи	105	105	105	105
		Полноразм. H-цепь	41	41	44	44
		Полноразм. H-цепь (другая Fe)	42	42	45	45
		LCDR1	132	132	167	167
		LCDR2	133	133	168	168
		LCDR3	134	134	169	169
		VR L-цепи	90	90	91	91
		CR L-цепи	106	106	106	106
	Полноразм. L-цепь	43	43	46	46	
	Плечо Б	HCDR1	156	159	153	147
		HCDR2	157	160	154	148
		HCDR3	158	161	155	149
		VR H-цепи	96	97	95	94
		CR H-цепи	104	104	104	104
		Полноразм. H-цепь	64	66	62	59
		Полноразм. H-цепь (другая Fe)	65	67	63	60
		LCDR1	150	141	150	150
		LCDR2	151	142	151	151
		LCDR3	152	143	152	152
		VR L-цепи	100	99	100	100
CR L-цепи		107	107	107	107	
Полноразм. L-цепь	61	56	61	61		

Пример 4

Анализ связывания антител с HLA класса II

На фиг. 1-1 – 1-16 представлены данные о связывании каждого из антител к HLA-DQ с панелью HLA-DQ в форме комплекса с несколькими экспрессирующими пептиды клеточными линиями Ва/Ф3, полученные с помощью FACS. Оценивали связывание антител к HLA-DQ с Ва/Ф3-HLA-DQ2.5, Ва/Ф3-HLA-DQ2.2, Ва/Ф3-HLA-DQ7.5, Ва/Ф3-HLA-DQ8, Ва/Ф3-HLA-DQ7.3, Ва/Ф3-HLA-DQ5.1, Ва/Ф3-HLA-DQ6.3, Ва/Ф3-HLA-DR, Ва/Ф3-HLA-DP, Ва/Ф3-HLA-DQ2.5/CLIP, Ва/Ф3-HLA-DQ2.5/HBV1, Ва/Ф3-HLA-DQ2.5/*Salmonella*, Ва/Ф3-HLA-DQ2.5/ТРО, Ва/Ф3-HLA-DQ2.5/*M. bovis*, Ва/Ф3-HLA-DQ2.5/альфа 1 глиадин, Ва/Ф3-HLA-DQ2.5/альфа 2 глиадин, Ва/Ф3-HLA-DQ2.5/гамма 1 глиадин, Ва/Ф3-HLA-DQ2.5/гамма 2 глиадин, Ва/Ф3-HLA-DQ2.5/омега 1 глиадин, Ва/Ф3-HLA-DQ2.5/омега 2 глиадин, Ва/Ф3-HLA-DQ2.5/BC-гордеин, Ва/Ф3-HLA-DQ2.5/альфа 3 глиадин, Ва/Ф3-HLA-DQ2.5/альфа 1b глиадин, Ва/Ф3-HLA-DQ2.5/гамма 4a глиадин, Ва/Ф3-HLA-DQ2.5/гамма 4b глиадин, Ва/Ф3-HLA-DQ2.5/авенин 1, Ва/Ф3-HLA-DQ2.5/авенин 2, Ва/Ф3-HLA-DQ2.5/авенин 3, Ва/Ф3-HLA-DQ2.5/гордеин 1, Ва/Ф3-HLA-DQ2.5/гордеин 2, Ва/Ф3-HLA-DQ2.5/секалин 1, Ва/Ф3-HLA-DQ2.5/секалин 2, Ва/Ф3-HLA-DQ2.5/33-мерный глиадин, Ва/Ф3-HLA-DQ2.5/26-мерный глиадин. Антитела к HLA-DQ в концентрации 50 нг/мл и контрольные антитела DQN0139bb и IC17dK в концентрации 1 мкг/мл инкубировали с каждой клеточной линией в течение 30 мин при комнатной температуре. Исключением являлись эксперименты с использованием вариантов DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1521/L0605-F6, DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1353/L0681-F6 и DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1255/L0605-F6, в которых указанные антитела к HLA-DQ применяли в концентрации 313 нг/мл и соответствующие контрольные антитела DQN0139bb и IC17dK в концентрации 20 мкг/мл, только в случае использования Ва/Ф3-HLA-DQ2.5 и Ва/Ф3-HLA-DQ2.5/CLIP. Клеточные линии после инкубации промывали FACS-буфером (2% FBS, 2мМ EDTA в 3ФР). Затем добавляли козий F(ab')₂ к человеческому IgG, мышиный ads-PE (фирма Southern Biotech, каталожный № 2043-09) и инкубировали в течение 20 мин в темноте при 4°С, затем промывали FACS-буфером. Сбор данных осуществляли с помощью устройства LSRFortessa X-20 (фирма Becton Dickinson), после чего

проводили анализ с использованием программного обеспечения FlowJo (фирма Tree Star) и Microsoft Office Excel2013. %MFI антител определяли, принимая величину MFI для антитела IC17dK за 0%, а величину MFI для антитела DQN0139bb за 100%.

5 На фиг. 1-1 -1-13 представлены данные о связывании 13 биспецифических антител к HLA-DQ (варианты DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6, DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6, DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6, DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6, 10 DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6, DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6, DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6, DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6, DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6, 15 DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6, DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1521/L0605-F6, DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1353/L0681-F6, DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1255/L0605-F6) с панелью описанных выше клеточных линий Ва/F3. Указанные 13 биспецифических антител к HLA-DQ 20 обладали выраженной связывающей активностью различной степени с HLA-DQ2.5, только, если он находился в форме комплекса с тестируемыми полученными из глютена пептидами (т.е. 33-мерным пептидом глиаина, пептидом альфа 1 глиаина, пептидом альфа 2 глиаина, пептидом гамма 1 глиаина, пептидом гамма 2 глиаина, пептидом омега 1 глиаина, пептидом 25 омега 2 глиаина, пептидом ВС-гордеина, пептидом альфа 3 глиаина, пептидом альфа 1b глиаина, пептидом гамма 4a глиаина, пептидом гамма 4b глиаина, пептидом авенина 1, пептидом авенина 2, пептидом авенина 3, пептидом гордеина 1, пептидом гордеина 2, пептидом секалина 1, пептидом секалина 2 и 26-мерным пептидом глиаина). Связывание 13 биспецифических антител к 30 HLA-DQ с пептидом гамма 2 глиаина оказалось самым слабым. С другой стороны, 13 биспецифических антител к HLA-DQ практически не обладали связывающей активностью с HLA-DQ2.5, если он находился в форме комплекса с пептидами, не родственными глютеиновым пептидам, или при воздействии

гаплотипов, отличных от HLA-DQ2.5 (включая данные, представленные на фиг. 1-14).

На фиг. 1-15 и 1-16 представлены данные о связывании положительного контроля (DQN0139bb) и связывании отрицательного контроля (IC17dK)

5 соответственно.

Пример 5

Анализ связывания антител с HLA-DQ2.5⁺ PBMC-B-клеткой

На фиг. 2 представлены данные о связывании каждого из антител к HLA-DQ с HLA-DQ2.5-позитивными PBMC-B-клетками, полученные с помощью

10 FACS.

Добавляли реагент, блокирующий человеческий FcR (фирма Miltenyi, каталожный № 130-059-901), и инкубировали в течение 10 мин при 4°C.

Антитела к HLA-DQ в концентрации 50 нг/мл и контрольные антитела DQN0139bb и IC17dK в концентрации 1 мкг/мл инкубировали с каждой

15 клеточной линией в течение 30 мин при комнатной температуре. Исключением являлись эксперименты с использованием вариантов

DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1521/L0605-F6,

DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1353/L0681-F6 и

DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1255/L0605-F6, в которых указанные антитела

20 к HLA-DQ применяли в концентрации 313 нг/мл и соответствующие

контрольные антитела DQN0139bb и IC17dK в концентрации 20 мкг/мл. После инкубации клетки промывали FACS-буфером (2% FBS, 2мМ EDTA в 3ФР).

Одновременно добавляли меченное биотином античеловеческое антитело

(фирма Chugai, BIO12-deltaGK Ат) и Pacific BlueTM –антитело к человеческому

25 CD19, мышинному IgG1k (фирма Biolegend, каталожный № 302232) и

инкубировали в течение 30 мин при 4°C, после чего промывали FACS-буфером.

Затем добавляли PE-стрептавидин (фирма Biolegend, каталожный № 405203) и

инкубировали в течение 15 мин при 4°C, после чего промывали FACS-буфером.

Сбор данных осуществляли с помощью устройства LSRFortessa X-20 (фирма

30 Becton Dickinson), после чего проводили анализ с использованием программного

обеспечения FlowJo (фирма Tree Star) и Microsoft Office Excel2013. %MFI

антител определяли, принимая величину MFI для антитела IC17dK за 0%, а

величину MFI для антитела DQN0139bb за 100%.

На фиг. 2 представлены данные, демонстрирующие, что 13
биспецифических антител к HLA-DQ (варианты
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6,
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6,
5 DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6,
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6,
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6,
10 DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6,
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1521/L0605-F6,
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1353/L0681-F6,
15 DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1255/L0605-F6) практически не связывались с
HLA-DQ2.5-позитивными РВМС-В-клетками.

Пример 6

6.1 Создание клеточной линии альфа бета TCR KO Jurkat NFAT-Luc

Рибонуклеопротеиновый (RNP) комплекс (фирма Takara Bio), который
20 состоит из Cas9 и единых гидовых РНК, таргетирующих константную область
TCR (Blood. 131, 2018, сс. 311-322), интродуцировали в клеточную линию
NFAT-RE-luc2 Jurkat (фирма Promega corporation, CS176401) путем
электропорации (фирма LONZA, устройство Nucleofector 2b). Все единые
гидовые РНК для альфа-цепи TCR и бета-цепи TCR смешивали и
25 интродуцировали одновременно. Клетки с интродуцированным RNP
культивировали в средах, содержащих гигромицин В, с последующим
клонированием единичных клеток с помощью устройства FACS Aria III (фирма
Becton, Dickinson and Company). Затем проверяли последовательности альфа-
цепи TCR и бета-цепи TCR и идентифицировали полученные из Jurkat NFAT-Luc
30 клоны с нокаутом альфа-цепи TCR и бета-цепи TCR. Созданный клон
обозначали как TCR KO Jurkat NFAT-Luc.

6.2 Создание клеточной линии альфа бета TCR KO Jurkat NFAT-Luc, кратковременно экспрессирующей TCR с рестрикцией по комплексу HLA-DQ2.5/глютенный пептид

Информацию об аминокислотных последовательностях TCR получали из
5 общедоступных данных или Университета Осло на основании соглашения о передаче материалов. Информацию об аминокислотных последовательностях TCR с рестрикцией по комплексу HLA-DQ2.5/альфа 1 глиадин (TCC ID: 387.9), TCR с рестрикцией по комплексу HLA-DQ2.5/альфа 1b глиадин (TCC ID: 370.2.25), TCR с рестрикцией по комплексу HLA-DQ2.5/омега 1 глиадин TCR
10 (TCC ID: 442D.A.2), TCR с рестрикцией по комплексу HLA-DQ2.5/омега 2 глиадин (TCC ID: 578.42), TCR с рестрикцией по комплексу HLA-DQ2.5/гамма 1 глиадин (TCC ID: 820.27), TCR с рестрикцией по комплексу HLA-DQ2.5/гамма 2 глиадин (TCC ID: 430.1.41), TCR с рестрикцией по комплексу HLA-DQ2.5/гамма 3 глиадин (TCC ID: /2.23), TCR с рестрикцией по комплексу HLA-DQ2.5/гамма
15 4a глиадин (TCC ID: 430.1.36), TCR с рестрикцией по комплексу HLA-DQ2.5/гамма 4d глиадин (TCC ID: 430.1.94) получали из Университета Осло на основании соглашения о передаче материалов. Информацию об аминокислотной последовательности TCR с рестрикцией по комплексу HLA-DQ2.5/альфа 2 глиадин (TCR с рестрикцией по комплексу DQ2.5/альфа 2 глиадин) получали из
20 Nat Struct Mol Biol. 21, 2014, сс. 480-488, а информацию об аминокислотной последовательности TCR с рестрикцией по комплексу HLA-DQ2.5/BC-гордеин (TCC ID: 1468.2) получали из Eur J Immunol. 50, 2020, сс. 256-269. Последовательность каждой бета-цепи TCR связывали с соответствующей последовательностью альфа-цепи TCR с помощью саморасщепляющейся
25 пептидной последовательности 2A (P2A, аминокислотная последовательность: GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP, SEQ ID NO: 203). Все альфа-цепи TCR и бета-цепи TCR имели свою собственную нативную последовательность сигнального пептида за исключением TCR с рестрикцией по HLA-DQ2.5/гамма 2 глиадин и TCR с рестрикцией по HLA-DQ2.5/альфа 2 глиадин. Нативную сигнальную
30 последовательность TCR с рестрикцией по HLA-DQ2.5/гамма 2 глиадин заменяли на сигнальную последовательность Campath (MGWSCIIIFLVATATGVHS, SEQ ID NO: 170). Сигнальную последовательность Campath также присоединяли к N-концу TCR с рестрикцией по HLA-

DQ2.5/альфа 2 глиадин. Затем каждую кДНК конструкции бета-цепь TCR с оптимизированными кодонами - P2A – альфа-цепь TCR встраивали в экспрессионный вектор pCXZD1 (US/20090324589) на фирме Genscript. Осуществляли электропорацию векторов в клетки альфа бета TCR-KO Jurkat-NFAT-luc2 согласно протоколу, прилагаемому к набору SE Cell Line 4D-Nucleofector™.

6.3 Подтверждение ингибирующего действия антител к HLA DQ в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/пептид альфа 1 глиадина активации Т-клеток Jurkat

10 50 мкл смеси клеток ИHW09023 (Международная рабочая группа по гистосовместимости, фирма Fred Hutch) ($8,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и 33-мерного пептида глиадина (LQLQFPQPPELPYPQPELPYPQPELPYPQPQPF, SEQ ID NO: 201, 250нМ) вносили в 96-луночные планшеты (Corning®, 3799). Затем добавляли 25 мкл серийно разведенных антител к HLA DQ и в конце добавляли 15 25 мкл трансфектированных TCR с рестрикцией по альфа 1 глиадину клеток линии альфа бета TCR-KO Jurkat-NFAT-luc2 ($2,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в течение ночи. После культивирования в течение ночи собирали 50 мкл культивированных клеток и повторно вносили в планшет OptiPlate-96 (фирма PerkinElmer, 6005299). Затем 20 добавляли 50 мкл реагента Bio-Glo (фирма Promega, G7491) и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин и измеряли люминесценцию с помощью устройства Envision (фирма PerkinElmer) с последующим анализом с использованием Outlook Excel 2013 (фирма Microsoft) и программного обеспечения GraphPad Prism (фирма GraphPad). Ингибирующее действие (%) 25 антител к HLA DQ определяли, принимая среднее количество отсчетов в секунду (cps) в лунке в отсутствии антигенного пептида без антител за 100%, а cps в лунке в присутствии антигена без антител за 0%. Величину IC₅₀ определяли, используя программное обеспечение с надстройкой XLfit Excel (IDBS).

30 Как продемонстрировано на фиг. 3-1 и в таблице 2-7, все протестированные антитела к HLA DQ обладали ингибирующим действием в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/пептид альфа 1 глиадина активации Т-клеток Jurkat в зависимости от дозы. В частности,

DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6,
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6,
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6,
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6,
5 DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6,
10 DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6 продемонстрировали более
сильную нейтрализующую активность в отношении зависящей от комплекса
HLA-DQ2.5/пептид альфа 1 глиаина активации Т-клеток Jurkat по сравнению с
DQN0344xx, DQN0344xx//DQN0385ee, DQN034425 и
DQN034425//DQN0385ee0054.

15 6.4 Подтверждение ингибирующего действия антител к HLA DQ в
отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5 /пептид альфа 2 глиаина
активации Т-клеток Jurkat

50 мкл смеси клеток ИHW09023 ($8,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и 33-мерного
пептида глиаина (LQLQPFQPELPYPQPELPYPQPELPYPQPQPF, SEQ ID NO:
20 201, 250нМ) вносили в 96-луночные планшеты (Corning®, 3799). Затем
добавляли 25 мкл серийно разведенных антител к HLA DQ и в конце добавляли
25 мкл трансфектированных TCR с рестрикцией по альфа 2 глиаину клеток
линии альфа бета TCR-KO Jurkat-NFAT-luc2 ($2,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и
инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в течение ночи. После
25 культивирования в течение ночи собирали 50 мкл культивированных клеток и
повторно вносили в планшет OptiPlate-96 (фирма PerkinElmer, 6005299). Затем
добавляли 50 мкл реагента Bio-Glo (фирма Promega, G7491) и инкубировали при
комнатной температуре в течение 10 мин и измеряли люминесценцию с
помощью устройства Envision (фирма PerkinElmer) с последующим анализом с
30 использованием Outlook Excel 2013 (фирма Microsoft) и программного
обеспечения GraphPad Prism (фирма GraphPad). Ингибирующее действие (%)
антител к HLA DQ определяли, принимая среднее количество отсчетов в секунду
(cps) в лунке в отсутствии антигенного пептида без антител за 100%, а cps в лунке в

присутствии антигена без антител за 0%. Величину IC₅₀ определяли, используя программное обеспечение с надстройкой XLfit Excel (IDBS).

Как продемонстрировано на фиг. 3-2 и в таблице 2-7, все протестированные антитела к HLA DQ обладали ингибирующим действием в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5 /пептид альфа 2 глиаина активации Т-клеток Jurkat в зависимости от дозы. В частности,

DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6,
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6,
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6,
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6,
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6 продемонстрировали более сильную нейтрализующую активность в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/пептид альфа 2 глиаина активации Т-клеток Jurkat по сравнению с DQN0344xx, DQN0344xx//DQN0385ee, DQN034425 и DQN034425//DQN0385ee0054.

6.5 Подтверждение ингибирующего действия антител к HLA DQ в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5 /пептид альфа 1b глиаина активации Т-клеток Jurkat

50 мкл смеси клеток ИHW09023 ($8,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и 33-мерного пептида глиаина (LQLQPFPPQPELPYPQPELPYPQPELPYPQPQPF, SEQ ID NO: 201, 250нМ) вносили в 96-луночные планшеты (Corning®, 3799). Затем добавляли 25 мкл серийно разведенных антител к HLA DQ и в конце добавляли 25 мкл трансфектированных TCR с рестрикцией по альфа 1b глиаину клеток линии альфа бета TCR-КО Jurkat-NFAT-luc2 ($2,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в течение ночи. После культивирования в течение ночи собирали 50 мкл культивированных клеток и повторно вносили в планшет OptiPlate-96 (фирма PerkinElmer, 6005299). Затем добавляли 50 мкл реагента Bio-Glo (фирма Promega, G7491) и инкубировали при

комнатной температуре в течение 10 мин и измеряли люминесценцию с помощью устройства Envision (фирма PerkinElmer) с последующим анализом с использованием Outlook Excel 2013 (фирма Microsoft) и программного обеспечения GraphPad Prism (фирма GraphPad). Ингибирующее действие (%) антител к HLA DQ определяли, принимая среднее количество отсчетов в секунду (cps) в лунке в отсутствии антигенного пептида без антител за 100%, а cps в лунке в присутствии антигена без антител за 0%. Величину IC₅₀ определяли, используя программное обеспечение с надстройкой XLfit Excel (IDBS).

Как продемонстрировано на фиг. 3-3 и в таблице 2-7, все протестированные антитела к HLA DQ обладали ингибирующим действием в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5 /пептид альфа 1b глиаина активации Т-клеток Jurkat в зависимости от дозы. В частности,

DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6,
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6,
15 DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6,
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6,
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6,
20 DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6 продемонстрировали более сильную нейтрализующую активность в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/пептид альфа 1b глиаина активации Т-клеток Jurkat по сравнению с
25 DQN0344xx, DQN0344xx//DQN0385ee, DQN034425 и
DQN034425//DQN0385ee0054.

6.6 Подтверждение ингибирующего действия антител к HLA DQ в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/пептид омега 1 глиаина активации Т-клеток Jurkat

30 50 мкл смеси клеток ИHW09023 ($8,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и пептида омега1/2 глиаина (EQPFPQPEQPFPWQP, SEQ ID NO: 204, 25мкМ) вносили в 96-луночные планшеты (Corning®, 3799). Затем добавляли 25 мкл серийно разведенных антител к HLA DQ и в конце добавляли 25 мкл

трансфектированных TCR с рестрикцией по омега 1 глиадину клеток линии альфа бета TCR-КО Jurkat-NFAT-luc2 ($2,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в течение ночи. После культивирования в течение ночи собирали 50 мкл культивированных клеток и повторно вносили в 5 планшет OptiPlate-96 (фирма PerkinElmer, 6005299). Затем добавляли 50 мкл реагента Bio-Glo (фирма Promega, G7491) и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин и измеряли люминесценцию с помощью устройства Envision (фирма PerkinElmer) с последующим анализом с использованием Outlook Excel 2013 (фирма Microsoft) и программного 10 обеспечения GraphPad Prism (фирма GraphPad). Ингибирующее действие (%) антител к HLA DQ определяли, принимая среднее количество отсчетов в секунду (cps) в лунке в отсутствии антигенного пептида без антител за 100%, а cps в лунке в присутствии антигена без антител за 0%. Величину IC₅₀ определяли, используя программное обеспечение с надстройкой XLfit Excel (IDBS).

15 Как продемонстрировано на фиг. 3-4 и в таблице 2-7, все протестированные антитела к HLA DQ обладали ингибирующим действием в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/пептид омега 1 глиадин активации Т-клеток Jurkat в зависимости от дозы. В частности,

DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6,
20 DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6,
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6,
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6,
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6,
25 DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6 продемонстрировали более сильную нейтрализующую активность в отношении зависящей от комплекса 30 HLA-DQ2.5/пептид омега 1 глиадин активации Т-клеток Jurkat по сравнению с DQN0344xx, DQN0344xx//DQN0385ee, DQN034425 и DQN034425//DQN0385ee0054.

6.7 Подтверждение ингибирующего действия антител к HLA DQ в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/пептид омега 2 глиаина активации Т-клеток Jurkat

50 мкл смеси клеток IHW09023 ($8,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и пептида омега1/2
5 глиаина (EQPFPQPEQFPWQP, SEQ ID NO: 204, 250 нМ) вносили в 96-
луночные планшеты (Corning®, 3799). Затем добавляли 25 мкл серийно
разведенных антител к HLA DQ и в конце добавляли 25 мкл
трансфектированных TCR с рестрикцией по омега 2 глиаину клеток линии
альфа бета TCR-KO Jurkat-NFAT-luc2 ($2,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и инкубировали
10 при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в течение ночи. После культивирования в
течение ночи собирали 50 мкл культивированных клеток и повторно вносили в
планшет OptiPlate-96 (фирма PerkinElmer, 6005299). Затем добавляли 50 мкл
реагента Bio-Glo (фирма Promega, G7491) и инкубировали при комнатной
температуре в течение 10 мин и измеряли люминесценцию с помощью
15 устройства Envision (фирма PerkinElmer) с последующим анализом с
использованием Outlook Excel 2013 (фирма Microsoft) и программного
обеспечения GraphPad Prism (фирма GraphPad). Ингибирующее действие (%)
антител к HLA DQ определяли, принимая среднее количество отсчетов в секунду
(cps) в лунке в отсутствии антигенного пептида без антител за 100%, а cps в лунке в
20 присутствии антигена без антител за 0%. Величину IC₅₀ определяли, используя
программное обеспечение с надстройкой XLfit Excel (IDBS).

Как продемонстрировано на фиг. 3-5 и в таблице 2-7, все протестированные
антитела к HLA DQ за исключением DQN0344xx и DQN034425 обладали
ингибирующим действием в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5
25 /пептид омега 2 глиаина активации Т-клеток Jurkat в зависимости от дозы. В
частности, DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6,
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6,
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6,
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6,
30 DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6,

DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6 продемонстрировали более
сильную нейтрализующую активность в отношении зависящей от комплекса
HLA-DQ2.5/пептид омега 2 глиаина активации Т-клеток Jurkat по сравнению с
5 DQN0344xx, DQN0344xx//DQN0385ee, DQN034425 и
DQN034425//DQN0385ee0054.

6.8 Подтверждение ингибирующего действия антител к HLA DQ в
отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/пептид ВС-гордеина активации
Т-клеток Jurkat

10 50 мкл смеси клеток ИHW09023 ($8,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и пептида ВС-
гордеина (EPEQPIPEQPQPYPQQ, SEQ ID NO: 205, 250нМ) вносили в 96-
луночные планшеты (Corning®, 3799). Затем добавляли 25 мкл серийно
разведенных антител к HLA DQ и в конце добавляли 25 мкл
трансфектированных TCR с рестрикцией по ВС-гордеину клеток линии альфа
15 бета TCR-KO Jurkat-NFAT-luc2 ($2,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и инкубировали при 37°C
в атмосфере с 5% CO₂ в течение ночи. После культивирования в течение ночи
собирали 50 мкл культивированных клеток и повторно вносили в планшет
OptiPlate-96 (фирма PerkinElmer, 6005299). Затем добавляли 50 мкл реагента Bio-
Glo (фирма Promega, G7491) и инкубировали при комнатной температуре в
20 течение 10 мин и измеряли люминесценцию с помощью устройства Envision
(фирма PerkinElmer) с последующим анализом с использованием Outlook Excel
2013 (фирма Microsoft) и программного обеспечения GraphPad Prism (фирма
GraphPad). Ингибирующее действие (%) антител к HLA DQ определяли,
принимая среднее количество отсчетов в секунду (cps) в лунке в отсутствии
25 антигенного пептида без антител за 100%, а cps в лунке в присутствии антигена без
антител за 0%. Величину IC₅₀ определяли, используя программное обеспечение с
надстройкой XLfit Excel (IDBS).

Как продемонстрировано на фиг. 3-6 и в таблице 2-7, все протестированные
антитела к HLA DQ за исключением DQN0344xx и DQN034425 обладали
30 ингибирующим действием в отношении зависящей от комплекса HLA-
DQ2.5/пептид ВС-гордеин активации Т-клеток Jurkat в зависимости от дозы. В
частности, DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6,
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6,

DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6,
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6,
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6,
5 DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6 продемонстрировали более
сильную нейтрализующую активность в отношении зависящей от комплекса
10 HLA-DQ2.5/пептид ВС-гордеина активации Т-клеток Jurkat по сравнению с
DQN0344xx, DQN0344xx//DQN0385ee, DQN034425 и
DQN034425//DQN0385ee0054.

6.9 Подтверждение ингибирующего действия антител к HLA DQ в
отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5 /пептид гамма 1 глиаина
15 активации Т-клеток Jurkat

50 мкл смеси клеток ИHW09023 ($8,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и пептида гамма 1
глиаина (PQQPQQSFPEQEQA, SEQ ID NO: 206, 250нМ) вносили в 96-
луночные планшеты (Corning®, 3799). Затем добавляли 25 мкл серийно
разведенных антител к HLA DQ и в конце добавляли 25 мкл
20 трансфектированных TCR с рестрикцией по гамма 1 глиадину клеток линии
альфа бета TCR-KO Jurkat-NFAT-luc2 ($2,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и инкубировали
при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в течение ночи. После культивирования в
течение ночи собирали 50 мкл культивированных клеток и повторно вносили в
планшет OptiPlate-96 (фирма PerkinElmer, 6005299). Затем добавляли 50 мкл
25 реагента Bio-Glo (фирма Promega, G7491) и инкубировали при комнатной
температуре в течение 10 мин и измеряли люминесценцию с помощью
устройства Envision (фирма PerkinElmer) с последующим анализом с
использованием Outlook Excel 2013 (фирма Microsoft) и программного
обеспечения GraphPad Prism (фирма GraphPad). Ингибирующее действие (%)
30 антител к HLA DQ определяли, принимая среднее количество отсчетов в секунду
(cps) в лунке в отсутствии антигенного пептида без антител за 100%, а cps в лунке в
присутствии антигена без антител за 0%. Величину IC₅₀ определяли, используя
программное обеспечение с надстройкой XLfit Excel (IDBS).

Как продемонстрировано на фиг. 3-7 и в таблице 2-7, все протестированные антитела к HLA DQ за исключением DQN0344xx и DQN034425 обладали ингибирующим действием в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/пептид гамма 1 глиаина активации Т-клеток Jurkat в зависимости от дозы. В частности, DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6, DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6, DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6, DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6, DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6, DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6, DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6, DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6, DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6, DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6 продемонстрировали более сильную нейтрализующую активность в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/пептид гамма 1 глиаина активации Т-клеток Jurkat по сравнению с DQN0344xx, DQN0344xx//DQN0385ee, DQN034425 и DQN034425//DQN0385ee0054.

6.10 Подтверждение ингибирующего действия антител к HLA DQ в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/пептид гамма 2 глиаина активации Т-клеток Jurkat

50 мкл смеси клеток ИHW09023 ($8,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и пептида гамма 2 глиаина (GQGIIQPEQPAQLIR, SEQ ID NO: 207, 250нМ) вносили в 96-луночные планшеты (Corning®, 3799). Затем добавляли 25 мкл серийно разведенных антител к HLA DQ и в конце добавляли 25 мкл трансфектированных TCR с рестрикцией по гамма 2 глиаину клеток линии альфа бета TCR-КО Jurkat-NFAT-luc2 ($2,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в течение ночи. После культивирования в течение ночи собирали 50 мкл культивированных клеток и повторно вносили в планшет OptiPlate-96 (фирма PerkinElmer, 6005299). Затем добавляли 50 мкл реагента Bio-Glo (фирма Promega, G7491) и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин и измеряли люминесценцию с помощью устройства Envision (фирма PerkinElmer) с последующим анализом с использованием Outlook Excel 2013 (фирма Microsoft)

и программного обеспечения GraphPad Prism (фирма GraphPad). Ингибирующее действие (%) антител к HLA DQ определяли, принимая среднее количество отсчетов в секунду (cps) в лунке в отсутствие антигенного пептида без антител за 100%, а cps в лунке в присутствии антигена без антител за 0%. Величину IC₅₀ определяли, используя программное обеспечение с надстройкой XLfit Excel (IDBS).

Как продемонстрировано на фиг. 3-8 и в таблице 2-7, все протестированные антитела к HLA DQ за исключением DQN0344xx и DQN034425 обладали ингибирующим действием в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5 /пептид гамма 2 глиаина активации Т-клеток Jurkat в зависимости от дозы. В частности, DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6, DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6, DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6, DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6, DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6, DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6, DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6, DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6, DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6, DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6 продемонстрировали более сильную нейтрализующую активность в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/пептид гамма 2 глиаина активации Т-клеток Jurkat по сравнению с DQN0344xx, DQN0344xx//DQN0385ee, DQN034425 и DQN034425//DQN0385ee0054.

25 6.11 Подтверждение ингибирующего действия антител к HLA DQ в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/пептид гамма 3 глиаина активации Т-клеток Jurkat

50 мкл смеси клеток ИHW09023 ($8,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и пептида гамма 3 глиаина (EQPFREQREQPYREQREQPFQP, SEQ ID NO: 208, 100мкМ) вносили в 96-луночные планшеты (Corning®, 3799). Затем добавляли 25 мкл серийно разведенных антител к HLA DQ и в конце добавляли 25 мкл трансфектированных TCR с рестрикцией по гамма 3 глиаину клеток линии альфа бета TCR-KO Jurkat-NFAT-luc2 ($2,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и инкубировали

при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в течение ночи. После культивирования в течение ночи собирали 50 мкл культивированных клеток и повторно вносили в планшет OptiPlate-96 (фирма PerkinElmer, 6005299). Затем добавляли 50 мкл реагента Bio-Glo (фирма Promega, G7491) и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин и измеряли люминесценцию с помощью устройства Envision (фирма PerkinElmer) с последующим анализом с использованием Outlook Excel 2013 (фирма Microsoft) и программного обеспечения GraphPad Prism (фирма GraphPad). Ингибирующее действие (%) антител к HLA DQ определяли, принимая среднее количество отсчетов в секунду (cps) в лунке в отсутствие антигенного пептида без антител за 100%, а cps в лунке в присутствии антигена без антител за 0%. Величину IC₅₀ определяли, используя программное обеспечение с надстройкой XLfit Excel (IDBS).

Как продемонстрировано на фиг. 3-9 и в таблице 2-7, все протестированные антитела к HLA DQ обладали ингибирующим действием в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/пептид гамма 3 глиаина активации Т-клеток Jurkat в зависимости от дозы. В частности,

DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6,
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6,
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6,
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6,
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6 продемонстрировали более сильную нейтрализующую активность в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/пептид гамма 3 глиаина активации Т-клеток Jurkat по сравнению с DQN0344xx, DQN0344xx//DQN0385ee, DQN034425 и DQN034425//DQN0385ee0054.

6.12 Подтверждение ингибирующего действия антител к HLA DQ в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/пептид гамма 4а глиаина активации Т-клеток Jurkat

50 мкл смеси клеток ИHW09023 ($8,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и пептида гамма 4а глиаина (FSQPEQEFPQPQ, SEQ ID NO: 209, 25мкМ) вносили в 96-луночные планшеты (Corning®, 3799). Затем добавляли 25 мкл серийно разведенных антител к HLA DQ и в конце добавляли 25 мкл трансфектированных TCR с рестрикцией по гамма 4а глиаину клеток линии альфа бета TCR-КО Jurkat-NFAT-luc2 ($2,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в течение ночи. После культивирования в течение ночи собирали 50 мкл культивированных клеток и повторно вносили в планшет OptiPlate-96 (фирма PerkinElmer, 6005299). Затем добавляли 50 мкл реагента Bio-Glo (фирма Promega, G7491) и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин и измеряли люминесценцию с помощью устройства Envision (фирма PerkinElmer) с последующим анализом с использованием Outlook Excel 2013 (фирма Microsoft) и программного обеспечения GraphPad Prism (фирма GraphPad). Ингибирующее действие (%) антител к HLA DQ определяли, принимая среднее количество отсчетов в секунду (cps) в лунке в отсутствие антигенного пептида без антител за 100%, а cps в лунке в присутствии антигена без антител за 0%. Величину IC₅₀ определяли, используя программное обеспечение с настройкой XLfit Excel (IDBS).

Как продемонстрировано на фиг. 3-10 и в таблице 2-7, все протестированные антитела к HLA DQ за исключением DQN0344xx, DQN034425 и DQN034425//DQN0385ee0054 обладали ингибирующим действием в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/пептид гамма 4а глиаина активации Т-клеток Jurkat в зависимости от дозы. В частности, DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6, DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6, DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6, DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6, DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6, DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6, DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6,

DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6 продемонстрировали более
сильную нейтрализующую активность в отношении зависящей от комплекса
5 HLA-DQ2.5/пептид гамма 4а глиаина активации Т-клеток Jurkat по сравнению с
DQN0344xx, DQN0344xx//DQN0385ee, DQN034425 и
DQN034425//DQN0385ee0054.

6.13 Подтверждение ингибирующего действия антител к HLA DQ в
отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/пептид гамма 4d глиаина
10 активации Т-клеток Jurkat

50 мкл смеси клеток ИHW09023 ($8,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и пептида гамма 4d
глиаина (WPQQQPFQPEQPFCEQPQR, SEQ ID NO: 210, 100мкМ) вносили в
96-луночные планшеты (Corning®, 3799). Затем добавляли 25 мкл серийно
разведенных антител к HLA DQ и в конце добавляли 25 мкл
15 трансфектированных TCR с рестрикцией по гамма 4d глиаину клеток линии
альфа бета TCR-КО Jurkat-NFAT-luc2 ($2,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и инкубировали
при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в течение ночи. После культивирования в
течение ночи собирали 50 мкл культивированных клеток и повторно вносили в
планшет OptiPlate-96 (фирма PerkinElmer, 6005299). Затем добавляли 50 мкл
20 реагента Bio-Glo (фирма Promega, G7491) и инкубировали при комнатной
температуре в течение 10 мин и измеряли люминесценцию с помощью
устройства Envision (фирма PerkinElmer) с последующим анализом с
использованием Outlook Excel 2013 (фирма Microsoft) и программного
обеспечения GraphPad Prism (фирма GraphPad). Ингибирующее действие (%)
25 антител к HLA DQ определяли, принимая среднее количество отсчетов в секунду
(cps) в лунке в отсутствии антигенного пептида без антител за 100%, а cps в лунке в
присутствии антигена без антител за 0%. Величину IC₅₀ определяли, используя
программное обеспечение с надстройкой XLfit Excel (IDBS).

Как продемонстрировано в таблице 2-7, все протестированные антитела к HLA
30 DQ за исключением DQN0344xx, DQN0344xx//DQN0385ee, DQN034425 и
DQN034425//DQN0385ee0054 обладали ингибирующим действием в отношении
зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/пептид гамма 4d глиаина активации Т-
клеток Jurkat в зависимости от дозы.

Как продемонстрирована на фиг. 3-1 - 3-10 и в таблице 2-7,
нейтрализующая активность

DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6,
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6,
5 DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6,
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6,
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6,
10 DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6 в отношении всех
протестированных глютеиновых пептидов была сильнее по сравнению с
активностью DQN0344xx, DQN0344xx//DQN0385ee, DQN034425 и
15 DQN034425//DQN0385ee0054.

Кроме того, DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6,
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6,
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6,
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6,
20 DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6,
25 DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6 продемонстрировали более
значительную нейтрализующую активность в отношении глютеиновых пептидов
по сравнению с DQN0344xx, DQN0344xx//DQN0385ee, DQN034425 и
DQN034425//DQN0385ee0054.

Как продемонстрировано в таблице 2-7, десять протестированных антител к
30 HLA-DQ обладали ингибирующим действием (нейтрализующая активность) в
отношении активации Т-клеток Jurkat в зависимости, в частности, от пептида
омега 2 глиаина, пептида ВС-гордеина, пептида гамма 1 глиаина, пептида
гамма 2 глиаина, пептида гамма 4а глиаина и пептида гамма 4d глиаина.

Известные из существующего уровня техники антитела до модификаций, предлагаемых в изобретении, не обладали нейтрализующей активностью в отношении указанных глютенных пептидов. Это означает, что у антигенсвязывающих молекул, предлагаемых в изобретении, перекрестная реактивность в отношении глютенных пептидов повышена по сравнению с молекулами до модификации.

Таблица 2-7. Нейтрализующая активность (ингибирующее действие)

антител к HLA-DQ в отношении зависящей от комплекса HLA-

DQ2.5/глютенный пептид активации Т-клеток Jurkat

Обозначение Ат	IC ₅₀ (нг/мл)										
	TCR, распозн. α1а глицин, 250нМ	TCR, распозн. α2 глицин, 250нМ	TCR, распозн. αβ глицин, 250нМ	TCR, распозн. α1 глицин, 25мкМ	TCR, распозн. α2 глицин, 250нМ	TCR, распозн. ВС-орган, 250нМ	TCR, распозн. γ1 глицин, 250нМ	TCR, распозн. γ2 глицин, 250нМ	TCR, распозн. γ3 глицин, 100нМ	TCR, распозн. γ4а глицин, 25мкМ	TCR, распозн. γ4d глицин, 100мкМ
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6	0.38	0.31	1.41	2.55	0.26	13.16	0.66	281.04	2.88	726.43	16.31
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6	0.58	0.34	1.36	2.07	0.26	12.03	1.05	181.56	2.40	748.78	11.81
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6	0.29	0.31	1.37	1.48	0.24	10.82	1.11	284.12	2.99	801.85	9.82
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6	0.70	0.51	1.84	3.25	0.30	6.54	0.59	636.88	2.09	1207.42	11.40
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6	0.49	0.56	2.66	2.62	0.25	13.57	0.91	440.28	2.31	1425.94	12.45
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6	0.27	0.33	1.25	2.17	0.22	9.70	1.03	276.71	3.31	1146.02	10.09
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6	0.28	0.33	1.76	1.91	0.19	8.98	0.68	852.68	1.40	1349.11	13.01
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6	0.38	0.33	1.78	2.51	0.20	7.54	1.11	322.12	2.63	1164.09	13.05
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6	0.26	0.38	1.13	1.88	0.27	11.58	1.71	279.48	3.15	1728.33	3.15
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6	0.29	0.34	1.13	1.17	0.17	8.78	0.56	100.28	2.29	1250.38	2.06
DQN0344xx	31.11	3.68	112.82	6.85	>500	>20000	>20000	>20000	3825.09	>20000	>20000
DQN0344xx//DQN0385ee	38.29	2.14	74.59	6.78	3.18	18.40	15.84	>20000	9.94	11216.66	784.22
DQN034425	10.57	1.75	46.36	3.12	>500	>20000	>20000	>20000	3104.55	>20000	>20000
DQN034425//DQN0385ee0054	102.29	6.46	437.53	16.06	16.33	979.74	28.32	>20000	18.65	>20000	>20000

Пример 7

Пример 7-1

Аффинность антител к HLA-DQ2.5, связывающихся с комплексом
5 человеческого HLA-DQ2.5/33-мерный пептид глиаина, комплексом HLA-
DQ2.5/пептид гамма 2 глиаина и комплексом HLA-DQ2.5/пептид ВС-гордеина
при pH 7,4 определяли при 37°C с помощью устройства Biacore 8k (фирма GE
Healthcare). Антитело к человеческой Fc-области (фирма GE Healthcare)
иммобилизовывали на всех проточных ячейках сенсорного CM4-чипа, используя
10 набор для аминного сочетания (фирма GE Healthcare). Все антитела и аналиты
приготавливали в ACES-буфере, pH 7,4, содержащем 20мМ ACES, 150мМ NaCl,
0,05% Твин 20, 0,005% NaN₃. Каждое антитело захватывали на сенсорной
поверхности с помощью антитела к человеческой Fc. Уровни захвата антител
соответствовали 200 резонансным единицам (RU). Комплекс человеческого HLA-
15 DQ2.5/33-мерный пептид глиаина инъецировали в концентрациях от 12,5 до
200нМ, приготовленных с помощью двукратных серийных разведений, с
последующей диссоциацией. Комплекс человеческого HLA-DQ2.5/пептид гамма
2 глиаина инъецировали в концентрациях от 25 до 400нМ, приготовленных с
помощью двукратных серийных разведений, с последующей диссоциацией.

20 Комплекс человеческого HLA-DQ2.5/пептид ВС-гордеина инъецировали в
концентрациях от 25 до 400нМ, приготовленных с помощью двукратных
серийных разведений, с последующей диссоциацией. Сенсорную поверхность
регенерировали после каждого цикла с помощью 3М MgCl₂. Аффинность
связывания определяли путем обработки и подгонки данных к модели связывания
25 1:1, используя программное обеспечение Biacore Insight Evaluation (фирма GE
Healthcare).

Данные об аффинности антител к HLA-DQ2.5, связывающихся с
комплексом человеческого HLA-DQ2.5/33-мерный пептид глиаина, комплексом
HLA-DQ2.5/пептид гамма 2 глиаина и комплексом HLA-DQ2.5/пептид ВС-
30 гордеина представлены в таблице 3-1.

Таблица 3-1 Аффинность антител к HLA-DQ2.5 к комплексам HLA-DQ2.5/глютенный пептид

Обозначение Ат	Комплекс HLA-DQ2.5/33-мерный пептид глиаина			Комплекс HLA-DQ2.5/пептид 2 глиаина			Комплекс HLA-DQ2.5/пептид ВС-гордеина		
	ka (M ⁻¹ c ⁻¹)	kd (c ⁻¹)	KD (M)	ka (M ⁻¹ c ⁻¹)	kd (c ⁻¹)	KD (M)	ka (M ⁻¹ c ⁻¹)	kd (c ⁻¹)	KD (M)
DQN0344xx	1.86E+05	1.43E-03	7.71E-09	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
DQN0385ee	6.36E+04	3.41E-04	5.36E-09	9.69E+04	1.25E-02	1.29E-07	1.67E+05	6.85E-04	4.10E-09
DQN034425H/09L0012	2.23E+05	1.27E-03	5.70E-09	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
DQN0385ee0054H/009L	4.06E+04	6.18E-04	1.52E-08	3.34E+04	4.42E-02	1.32E-06	8.18E+04	1.21E-02	1.48E-07
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6	3.62E+05	1.27E-03	3.50E-09	5.62E+05	4.72E-03	8.39E-09	4.00E+05	2.42E-03	6.06E-09
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6	3.59E+05	1.24E-03	3.46E-09	5.80E+05	4.68E-03	8.06E-09	3.78E+05	2.46E-03	6.52E-09
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6	3.67E+05	1.23E-03	3.35E-09	6.56E+05	6.15E-03	9.37E-09	4.23E+05	2.78E-03	6.57E-09
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6	3.69E+05	1.28E-03	3.48E-09	5.66E+05	8.25E-03	1.46E-08	3.55E+05	2.65E-03	7.46E-09
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6	3.66E+05	1.25E-03	3.41E-09	6.40E+05	7.51E-03	1.17E-08	4.01E+05	3.29E-03	8.20E-09
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6	3.54E+05	1.44E-03	4.09E-09	5.37E+05	4.58E-03	8.54E-09	3.62E+05	2.37E-03	6.53E-09
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6	3.52E+05	1.44E-03	4.08E-09	4.46E+05	8.46E-03	1.90E-08	3.05E+05	2.62E-03	8.59E-09
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6	3.64E+05	1.46E-03	4.02E-09	5.62E+05	4.62E-03	8.22E-09	3.64E+05	2.43E-03	6.67E-09
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6	3.66E+05	1.44E-03	3.93E-09	6.10E+05	5.91E-03	9.69E-09	4.48E+05	2.72E-03	6.06E-09
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6	3.73E+05	1.37E-03	3.69E-09	5.36E+05	3.94E-03	7.36E-09	3.78E+05	2.16E-03	5.71E-09

*N.D.: не определяли

Пример 7-2

Аффинность антител к HLA-DQ2.5, связывающихся с 33-мерным пептидом глиаина, при pH 7,4 определяли при 25°C с помощью устройства Biacore 8k (фирма GE Healthcare). Антитело к человеческой Fc-области (фирма GE Healthcare) иммобилизовывали на всех проточных ячейках сенсорного CM4-чипа, используя набор для аминного сочетания (фирма GE Healthcare). Все антитела и аналиты приготавливали в ACES-буфере, pH 7,4, содержащем 20мМ ACES, 150мМ NaCl, 0,05% Твин 20, 0,005% NaN₃. Каждое антитело захватывали на сенсорной поверхности с помощью антитела к человеческой Fc. Уровни захвата антител соответствовали 600 резонансным единицам (RU). 33-мерный пептид глиаина инъецировали в концентрациях от 2,5 до 40нМ, приготовленных с помощью двукратных серийных разведений, с последующей диссоциацией. Сенсорную поверхность регенерировали после каждого цикла с помощью 3М MgCl₂. Аффинность связывания определяли путем обработки и подгонки данных к модели связывания 1:1, используя программное обеспечение Biacore Insight Evaluation (фирма GE Healthcare).

Данные об аффинности антител к HLA-DQ2.5, связывающихся с 33-мерным пептидом глиаина, представлены в таблице 3-2. Все протестированные антитела за исключением DQN0315hh не обладали способностью связываться с самим (не входящим в комплекс) 33-мерным пептидом глиаина.

Таблица 3-2. Аффинность антител к HLA-DQ2.5 к 33-мерному пептиду

глиаина

Обозначение Ат	33-мерный пептид глиаина		
	ка ($M^{-1}c^{-1}$)	ка (c^{-1})	KD (M)
DQN0315hh	6.13E+06	6.15E-04	1.00E-10
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6	N.D.	N.D.	N.D.
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6	N.D.	N.D.	N.D.
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6	N.D.	N.D.	N.D.
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6	N.D.	N.D.	N.D.
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6	N.D.	N.D.	N.D.
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6	N.D.	N.D.	N.D.
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6	N.D.	N.D.	N.D.
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6	N.D.	N.D.	N.D.
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6	N.D.	N.D.	N.D.
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6	N.D.	N.D.	N.D.

*N.D.: не определяли

Пример 8

8.1 Создание клеточной линии альфа/бета TCR KO Jurkat NFAT-Luc

Рибонуклеопротеиновый (RNP) комплекс (фирма Takara Bio), который состоит из Cas9 и единых гидовых РНК, таргетирующих константную область TCR (Blood. 131, 2018, сс. 311-322), интродуцировали в клеточную линию NFAT-RE-luc2 Jurkat (фирма Promega corporation, CS176401) путем электропорации (фирма LONZA, устройство Nucleofector 2b). Все единые гидовые РНК для альфа-цепи TCR и бета-цепи TCR смешивали и интродуцировали одновременно. Клетки с интродуцированным RNP культивировали в средах, содержащих гигромицин В, с последующим клонированием единичных клеток с помощью устройства FACS Aria III (фирма Becton, Dickinson and Company). Затем проверяли последовательности альфа-цепи TCR и бета-цепи TCR и идентифицировали полученные из Jurkat NFAT-Luc клоны с нокаутом альфа-цепи TCR и бета-цепи TCR. Созданный клон обозначали как TCR KO Jurkat NFAT-Luc.

8.2 Создание клеточной линии альфа бета TCR KO Jurkat NFAT-Luc, кратковременно экспрессирующей TCR с рестрикцией по комплексу HLA-DQ2.5/глютеновый пептид

Информацию об аминокислотных последовательностях TCR получали из общедоступных данных или Университета Осло на основании соглашения о передаче материалов. Информацию об аминокислотных последовательностях TCR с рестрикцией по комплексу HLA-DQ2.5/альфа 1a глиадин (TCC ID: 387.9), TCR с рестрикцией по комплексу HLA-DQ2.5/альфа 1b глиадин (TCC ID: 370.2.25), TCR с рестрикцией по комплексу HLA-DQ2.5/омега 1 глиадин TCR (TCC ID: 442D.A.2), TCR с рестрикцией по комплексу HLA-DQ2.5/омега 2 глиадин (TCC ID: 578.42), TCR с рестрикцией по комплексу HLA-DQ2.5/гамма 1 глиадин (TCC ID: 820.27), TCR с рестрикцией по комплексу HLA-DQ2.5/гамма 2 глиадин (TCC ID: 430.1.41), TCR с рестрикцией по комплексу HLA-DQ2.5/гамма 3 глиадин (TCC ID: /2.23), TCR с рестрикцией по комплексу HLA-DQ2.5/гамма 4a глиадин (TCC ID: 430.1.36), TCR с рестрикцией по комплексу HLA-DQ2.5/гамма 4d глиадин (TCC ID: 430.1.94) получали из Университета Осло на основании соглашения о передаче материалов. Информацию об аминокислотной последовательности TCR с рестрикцией по комплексу HLA-DQ2.5/альфа 2

глиадин (TCR с рестрикцией по комплексу DQ2.5/альфа 2 глиадин) получали из Nat Struct Mol Biol. 21, 2014, сс. 480-488, а информацию об аминокислотной последовательности TCR с рестрикцией по комплексу HLA-DQ2.5/BC-гордеин (TCC ID: 1468.2) получали из Eur J Immunol. 50, 2020, сс. 256-269.

5 Последовательность каждой бета-цепи TCR связывали с соответствующей последовательностью альфа-цепи TCR с помощью саморасщепляющейся пептидной последовательности 2A (P2A, аминокислотная последовательность: GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP, SEQ ID NO: 203). Все альфа-цепи TCR и бета-цепи TCR имели свою собственную нативную последовательность сигнального пептида за исключением TCR с рестрикцией по HLA-DQ2.5/гамма 2 глиадин и TCR с рестрикцией по HLA-DQ2.5/альфа 2 глиадин. Нативную сигнальную последовательность TCR с рестрикцией по HLA-DQ2.5/гамма 2 глиадин заменяли на сигнальную последовательность Campath (MGWSCIIILFLVATATGVHS, SEQ ID NO: 170). Сигнальную последовательность Campath также присоединяли к N-концу TCR с рестрикцией по HLA-DQ2.5/альфа 2 глиадин. Затем каждую кДНК конструкции бета-цепь TCR с оптимизированными кодонами - P2A – альфа-цепь TCR встраивали в экспрессионный вектор pCXZD1 (US/20090324589) на фирме Genscript. Осуществляли электропорацию векторов в клетки альфа бета TCR-KO Jurkat-NFAT-luc2 согласно протоколу, прилагаемому к набору SE Cell Line 4D-Nucleofector™.

8.3 Подтверждение ингибирующего действия антител к HLA DQ в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/пептид альфа 1 глиадина активации Т-клеток Jurkat

25 50 мкл смеси клеток ИHW09023 ($8,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и 33-мерного пептида глиадина (LQLQPFQPELPYRQPELPYRQPELPYRQPF, SEQ ID NO: 201, 250нМ) вносили в 96-луночные планшеты. Затем добавляли 25 мкл серийно разведенных антител к HLA DQ и в конце добавляли 25 мкл трансфектированных TCR с рестрикцией по альфа 1 глиадину клеток линии альфа бета TCR-KO Jurkat-NFAT-luc2 ($2,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в течение ночи. После культивирования в течение ночи собирали 50 мкл культивированных клеток и повторно вносили в планшет OptiPlate-96 (фирма PerkinElmer, 6005299). Затем добавляли 50 мкл

реагента Bio-Glo (фирма Promega, G7491) и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин и измеряли люминесценцию с помощью устройства Envision (фирма PerkinElmer) с последующим анализом с использованием Outlook Excel 2013 (фирма Microsoft) и программного обеспечения GraphPad Prism (фирма GraphPad). Ингибирующее действие (%) антител к HLA DQ определяли, принимая среднее количество отсчетов в секунду (cps) в лунке в отсутствие антигенного пептида без антител за 100%, а cps в лунке в присутствии антигена без антител за 0%. Величину IC₅₀ определяли, используя программное обеспечение с надстройкой XLfit Excel (IDBS).

10 Как продемонстрировано на фиг. 4-1 и в таблице 4, все протестированные антитела к HLA DQ (DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6.v2, DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6.v2, DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6.v2) опосредовали зависящую от концентрации нейтрализацию зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/пептид альфа 1 глиаина активацию Т-клеток Jurkat, которая характеризовалась величинами IC₅₀ в диапазоне концентраций в пг/мл.

8.4 Подтверждение ингибирующего действия антител к HLA DQ в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/пептид альфа 2 глиаина активации Т-клеток Jurkat

20 50 мкл смеси клеток ИHW09023 ($8,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и 33-мерного пептида глиаина (LQLQPFPELPYPQPELPYPQPELPYPQPF, SEQ ID NO: 201, 250нМ) вносили в 96-луночные планшеты. Затем добавляли 25 мкл серийно разведенных антител к HLA DQ и в конце добавляли 25 мкл трансфектированных TCR с рестрикцией по альфа 2 глиаину клеток линии альфа бета TCR-KO Jurkat-NFAT-luc2 ($2,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в течение ночи. После культивирования в течение ночи собирали 50 мкл культивированных клеток и повторно вносили в планшет OptiPlate-96 (фирма PerkinElmer, 6005299). Затем добавляли 50 мкл реагента Bio-Glo (фирма Promega, G7491) и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин и измеряли люминесценцию с помощью устройства Envision (фирма PerkinElmer) с последующим анализом с использованием Outlook Excel 2013 (фирма Microsoft) и программного обеспечения GraphPad Prism (фирма GraphPad). Ингибирующее действие (%)

антител к HLA DQ определяли, принимая среднее количество отсчетов в секунду (cps) в лунке в отсутствии антигенного пептида без антител за 100%, а cps в лунке в присутствии антигена без антител за 0%. Величину IC₅₀ определяли, используя программное обеспечение с надстройкой XLfit Excel (IDBS).

5 Как продемонстрировано на фиг. 4-2 и в таблице 4, все протестированные антитела к HLA DQ (DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6.v2, DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6.v2, DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6.v2) опосредовали зависящую от концентрации нейтрализацию зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/пептид альфа 2 глиаина активацию Т-клеток Jurkat, которая характеризовалась величинами IC₅₀ в диапазоне концентраций в пг/мл.

8.5 Подтверждение ингибирующего действия антител к HLA DQ в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/пептид альфа 1b глиаина активации Т-клеток Jurkat

15 50 мкл смеси клеток ИHW09023 ($8,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и 33-мерного пептида глиаина (LQLQPFQPELPYPQPELPYPQPELPYPQPF, SEQ ID NO: 201, 250нМ) вносили в 96-луночные планшеты. Затем добавляли 25 мкл серийно разведенных антител к HLA DQ и в конце добавляли 25 мкл трансфектированных TCR с рестрикцией по альфа 1b глиаину клеток линии альфа бета TCR-КО Jurkat-NFAT-luc2 ($2,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в течение ночи. После культивирования в течение ночи собирали 50 мкл культивированных клеток и повторно вносили в планшет OptiPlate-96 (фирма PerkinElmer, 6005299). Затем добавляли 50 мкл реагента Bio-Glo (фирма Promega, G7491) и инкубировали при комнатной 25 температуре в течение 10 мин и измеряли люминесценцию с помощью устройства Envision (фирма PerkinElmer) с последующим анализом с использованием Outlook Excel 2013 (фирма Microsoft) и программного обеспечения GraphPad Prism (фирма GraphPad). Ингибирующее действие (%) антител к HLA DQ определяли, принимая среднее количество отсчетов в секунду 30 (cps) в лунке в отсутствии антигенного пептида без антител за 100%, а cps в лунке в присутствии антигена без антител за 0%. Величину IC₅₀ определяли, используя программное обеспечение с надстройкой XLfit Excel (IDBS).

Как продемонстрировано на фиг. 4-3 и в таблице 4, все протестированные антитела к HLA DQ 8.5 (DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6.v2, DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6.v2, DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6.v2) опосредовали зависящую от концентрации нейтрализацию зависящей от комплекса HLA-DQ2.5 /пептид альфа 1b глиаина активацию Т-клеток Jurkat, которая характеризовалась величинами IC₅₀ в диапазоне низких концентраций в нг/мл.

8.6 Подтверждение ингибирующего действия антител к HLA DQ в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/пептид омега 1 глиаина активации Т-клеток Jurkat

50 мкл смеси клеток ИHW09023 ($8,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и пептида омега1/2 глиаина (EQPFPQPEQFPWQP, SEQ ID NO: 204, 25мкМ) вносили в 96-луночные планшеты. Затем добавляли 25 мкл серийно разведенных антител к HLA DQ и в конце добавляли 25 мкл трансфектированных TCR с рестрикцией по омега 1 глиаину клеток линии альфа бета TCR-КО Jurkat-NFAT-luc2 ($2,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в течение ночи. После культивирования в течение ночи собирали 50 мкл культивированных клеток и повторно вносили в планшет OptiPlate-96 (фирма PerkinElmer, 6005299). Затем добавляли 50 мкл реагента Bio-Glo (фирма Promega, G7491) и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин и измеряли люминесценцию с помощью устройства Envision (фирма PerkinElmer) с последующим анализом с использованием Outlook Excel 2013 (фирма Microsoft) и программного обеспечения GraphPad Prism (фирма GraphPad). Ингибирующее действие (%) антител к HLA DQ определяли, принимая среднее количество отсчетов в секунду (cps) в лунке в отсутствие антигенного пептида без антител за 100%, а cps в лунке в присутствии антигена без антител за 0%. Величину IC₅₀ определяли, используя программное обеспечение с надстройкой XLfit Excel (IDBS).

Как продемонстрировано на фиг. 4-4 и в таблице 4, все протестированные антитела к HLA DQ (DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6.v2, DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6.v2, DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6.v2) опосредовали зависящую от концентрации нейтрализацию зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/пептид

омега 1 глиаина активацию Т-клеток Jurkat, которая характеризовалась величинами IC_{50} в диапазоне низких концентраций в нг/мл.

8.7 Подтверждение ингибирующего действия антител к HLA DQ в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/пептид омега 2 глиаина активации Т-клеток Jurkat

50 мкл смеси клеток ИHW09023 ($8,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и пептида омега1/2 глиаина (EQPFPQPEQFPWQP, SEQ ID NO: 204, 25мкМ) вносили в 96-луночные планшеты. Затем добавляли 25 мкл серийно разведенных антител к HLA DQ и в конце добавляли 25 мкл трансфектированных TCR с рестрикцией по омега 2 глиаину клеток линии альфа бета TCR-КО Jurkat-NFAT-luc2 ($2,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO_2 в течение ночи. После культивирования в течение ночи собирали 50 мкл культивированных клеток и повторно вносили в планшет OptiPlate-96 (фирма PerkinElmer, 6005299). Затем добавляли 50 мкл реагента Bio-Glo (фирма Promega, G7491) и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин и измеряли люминесценцию с помощью устройства Envision (фирма PerkinElmer) с последующим анализом с использованием Outlook Excel 2013 (фирма Microsoft) и программного обеспечения GraphPad Prism (фирма GraphPad). Ингибирующее действие (%) антител к HLA DQ определяли, принимая среднее количество отсчетов в секунду (cps) в лунке в отсутствие антигенного пептида без антител за 100%, а cps в лунке в присутствии антигена без антител за 0%. Величину IC_{50} определяли, используя программное обеспечение с надстройкой XLfit Excel (IDBS).

Как продемонстрировано на фиг. 4-5 и в таблице 4, все протестированные антитела к HLA DQ (DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6.v2, DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6.v2, DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6.v2) опосредовали зависящую от концентрации нейтрализацию зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/пептид омега 2 глиаина активацию Т-клеток Jurkat, которая характеризовалась величинами IC_{50} в диапазоне концентраций в пг/мл.

8.8 Подтверждение ингибирующего действия антител к HLA DQ в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/пептид ВС-гордеина активации Т-клеток Jurkat

50 мкл смеси клеток IHW09023 ($8,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и пептида ВС-гордеина (EPEQPIPEQRPQYRQQ, SEQ ID NO: 205, 250нМ) вносили в 96-луночные планшеты. Затем добавляли 25 мкл серийно разведенных антител к HLA DQ и в конце добавляли 25 мкл трансфектированных TCR с рестрикцией по ВС-гордеину клеток линии альфа бета TCR-КО Jurkat-NFAT-luc2 ($2,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в течение ночи. После культивирования в течение ночи собирали 50 мкл культивированных клеток и повторно вносили в планшет OptiPlate-96 (фирма PerkinElmer, 6005299). Затем добавляли 50 мкл реагента Bio-Glo (фирма Promega, G7491) и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин и измеряли люминесценцию с помощью устройства Envision (фирма PerkinElmer) с последующим анализом с использованием Outlook Excel 2013 (фирма Microsoft) и программного обеспечения GraphPad Prism (фирма GraphPad). Ингибирующее действие (%) антител к HLA DQ определяли, принимая среднее количество отсчетов в секунду (cps) в лунке в отсутствии антигенного пептида без антител за 100%, а cps в лунке в присутствии антигена без антител за 0%. Величину IC₅₀ определяли, используя программное обеспечение с надстройкой XLfit Excel (IDBS).

Как продемонстрировано на фиг. 3-6 и в таблице 2-7, все протестированные антитела к HLA DQ (DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6.v2, DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6.v2, DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6.v2) опосредовали зависящую от концентрации нейтрализацию зависящей от комплекса HLA-DQ2.5 /пептид ВС-гордеина активацию Т-клеток Jurkat, которая характеризовалась величинами IC₅₀ в диапазоне концентраций в нг/мл.

8.9 Подтверждение ингибирующего действия антител к HLA DQ в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/пептид гамма 1 глиадина активации Т-клеток Jurkat

50 мкл смеси клеток IHW09023 ($8,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и пептида гамма 1 глиадина (PQQRPQQSFPEQEQA, SEQ ID NO: 206, 250нМ) вносили в 96-

луночные планшеты. Затем добавляли 25 мкл серийно разведенных антител к HLA DQ и в конце добавляли 25 мкл трансфектированных TCR с рестрикцией по гамма 1 глиадину клеток линии альфа бета TCR-КО Jurkat-NFAT-luc2 ($2,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в течение ночи.

5 После культивирования в течение ночи собирали 50 мкл культивированных клеток и повторно вносили в планшет OptiPlate-96 (фирма PerkinElmer, 6005299). Затем добавляли 50 мкл реагента Bio-Glo (фирма Promega, G7491) и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин и измеряли люминесценцию с помощью устройства Envision (фирма PerkinElmer) с
10 последующим анализом с использованием Outlook Excel 2013 (фирма Microsoft) и программного обеспечения GraphPad Prism (фирма GraphPad). Ингибирующее действие (%) антител к HLA DQ определяли, принимая среднее количество отсчетов в секунду (cps) в лунке в отсутствие антигенного пептида без антител за 100%, а cps в лунке в присутствии антигена без антител за 0%. Величину IC₅₀
15 определяли, используя программное обеспечение с надстройкой XLfit Excel (IDBS).

Как продемонстрировано на фиг. 4-7 и в таблице 4, все протестированные антитела к HLA DQ (DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6.v2, DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6.v2,
20 DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6.v2) опосредовали зависящую от концентрации нейтрализацию зависящей от комплекса HLA-DQ2.5 /пептид гамма 1 глиадин активацию Т-клеток Jurkat, которая характеризовалась величинами IC₅₀ в диапазоне низких концентраций в нг/мл.

8.10 Подтверждение ингибирующего действия антител к HLA DQ в
25 отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/пептид гамма 2 глиадин активации Т-клеток Jurkat

50 мкл смеси клеток INW09023 ($8,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и пептида гамма 2 глиадин (GQGIIQPEQPAQLIR SEQ ID NO: 207, 250нМ) вносили в 96-луночные планшеты. Затем добавляли 25 мкл серийно разведенных антител к HLA DQ и в
30 конце добавляли 25 мкл трансфектированных TCR с рестрикцией по гамма 2 глиадину клеток линии альфа бета TCR-КО Jurkat-NFAT-luc2 ($2,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в течение ночи. После культивирования в течение ночи собирали 50 мкл культивированных

клеток и повторно вносили в планшет OptiPlate-96 (фирма PerkinElmer, 6005299). Затем добавляли 50 мкл реагента Bio-Glo (фирма Promega, G7491) и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин и измеряли люминесценцию с помощью устройства Envision (фирма PerkinElmer) с последующим анализом с использованием Outlook Excel 2013 (фирма Microsoft) и программного обеспечения GraphPad Prism (фирма GraphPad). Ингибирующее действие (%) антител к HLA DQ определяли, принимая среднее количество отсчетов в секунду (cps) в лунке в отсутствие антигенного пептида без антител за 100%, а cps в лунке в присутствии антигена без антител за 0%. Величину IC₅₀ определяли, используя программное обеспечение с надстройкой XLfit Excel (IDBS).

Как продемонстрировано на фиг. 4-8 и в таблице 4, все протестированные антитела к HLA DQ (DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6.v2, DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6.v2, DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6.v2) опосредовали зависящую от концентрации нейтрализацию зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/пептид гамма 2 глиаина активацию Т-клеток Jurkat, которая характеризовалась величинами IC₅₀ в диапазоне концентраций нг/мл.

8.11 Подтверждение ингибирующего действия антител к HLA DQ в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5 /пептид гамма 3 глиаина активации Т-клеток Jurkat

50 мкл смеси клеток INW09023 ($8,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и пептида гамма 3 глиаина (EQPFREQREQPYREQREQPFQP SEQ ID NO: 208, 100мкМ) вносили в 96-луночные планшеты. Затем добавляли 25 мкл серийно разведенных антител к HLA DQ и в конце добавляли 25 мкл трансфектированных TCR с рестрикцией по гамма 3 глиаину клеток линии альфа бета TCR-КО Jurkat-NFAT-luc2 ($2,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в течение ночи. После культивирования в течение ночи собирали 50 мкл культивированных клеток и повторно вносили в планшет OptiPlate-96 (фирма PerkinElmer, 6005299). Затем добавляли 50 мкл реагента Bio-Glo (фирма Promega, G7491) и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин и измеряли люминесценцию с помощью устройства Envision (фирма PerkinElmer) с последующим анализом с использованием Outlook Excel 2013 (фирма Microsoft)

и программного обеспечения GraphPad Prism (фирма GraphPad). Ингибирующее действие (%) антител к HLA DQ определяли, принимая среднее количество отсчетов в секунду (cps) в лунке в отсутствии антигенного пептида без антител за 100%, а cps в лунке в присутствии антигена без антител за 0%. Величину IC₅₀ определяли, используя программное обеспечение с надстройкой XLfit Excel (IDBS).

Как продемонстрировано на фиг. 4-9 и в таблице 4, все протестированные антитела к HLA DQ (DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6.v2, DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6.v2, DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6.v2) опосредовали зависящую от концентрации нейтрализацию зависящей от комплекса HLA-DQ2.5 /пептид гамма 3 глиаина активацию Т-клеток Jurkat, которая характеризовалась величинами IC₅₀ в диапазоне низких концентраций в нг/мл.

8.12 Подтверждение ингибирующего действия антител к HLA DQ в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/пептид гамма 4а глиаина активации Т-клеток Jurkat

50 мкл смеси клеток ИHW09023 ($8,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и пептида гамма 4а глиаина (FSQPEQEFPQPQ SEQ ID NO: 209, 25мкМ) вносили в 96-луночные планшеты. Затем добавляли 25 мкл серийно разведенных антител к HLA DQ и в конце добавляли 25 мкл трансфектированных TCR с рестрикцией по гамма 4а глиаину клеток линии альфа бета TCR-KO Jurkat-NFAT-luc2 ($2,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в течение ночи. После культивирования в течение ночи собирали 50 мкл культивированных клеток и повторно вносили в планшет OptiPlate-96 (фирма PerkinElmer, 6005299). Затем добавляли 50 мкл реагента Bio-Glo (фирма Promega, G7491) и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин и измеряли люминесценцию с помощью устройства Envision (фирма PerkinElmer) с последующим анализом с использованием Outlook Excel 2013 (фирма Microsoft) и программного обеспечения GraphPad Prism (фирма GraphPad). Ингибирующее действие (%) антител к HLA DQ определяли, принимая среднее количество отсчетов в секунду (cps) в лунке в отсутствии антигенного пептида без антител за 100%, а cps в лунке в присутствии антигена без антител за 0%. Величину IC₅₀

определяли, используя программное обеспечение с надстройкой XLfit Excel (IDBS).

Как продемонстрировано на фиг. 4-10 и в таблице 4, все протестированные антитела к HLA DQ (DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6.v2, DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6.v2, DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6.v2) опосредовали зависящую от концентрации нейтрализацию зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/пептид гамма 4а глиаина активацию Т-клеток Jurkat, которая характеризовалась величинами IC₅₀ в диапазоне от низких концентраций в мкг/мл до концентраций в нг/мл.

8.13 Подтверждение ингибирующего действия антител к HLA DQ в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/пептид гамма 4d глиаина активации Т-клеток Jurkat

50 мкл смеси клеток ИHW09023 ($8,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и пептида гамма 4d глиаина (WPQQQPFQPEQPFCEQPQR SEQ ID NO: 210, 100мкМ) вносили в 96-луночные планшеты. Затем добавляли 25 мкл серийно разведенных антител к HLA DQ и в конце добавляли 25 мкл трансфектированных TCR с рестрикцией по гамма 4d глиаину клеток линии альфа бета TCR-КО Jurkat-NFAT-luc2 ($2,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в течение ночи. После культивирования в течение ночи собирали 50 мкл культивированных клеток и повторно вносили в планшет OptiPlate-96 (фирма PerkinElmer, 6005299). Затем добавляли 50 мкл реагента Bio-Glo (фирма Promega, G7491) и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин и измеряли люминесценцию с помощью устройства Envision (фирма PerkinElmer) с последующим анализом с использованием Outlook Excel 2013 (фирма Microsoft) и программного обеспечения GraphPad Prism (фирма GraphPad). Ингибирующее действие (%) антител к HLA DQ определяли, принимая среднее количество отсчетов в секунду (cps) в лунке в отсутствие антигенного пептида без антител за 100%, а cps в лунке в присутствии антигена без антител за 0%. Величину IC₅₀ определяли, используя программное обеспечение с надстройкой XLfit Excel (IDBS).

Как продемонстрировано в таблице 4, все протестированные антитела к HLA DQ (DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6.v2,

DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6.v2,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6.v2) опосредовали зависящую
от концентрации нейтрализацию зависящей от комплекса HLA-DQ2.5/пептид
гамма 4d глиаина активацию Т-клеток Jurkat, которая характеризовалась
5 величинами IC_{50} в диапазоне концентраций в нг/мл.

Обозначение Ат	IC ₅₀ (нг/мл)										
	TCR, раслозн. α1а глицин, 250нМ	TCR, раслозн. α2 глицин, 250нМ	TCR, раслозн. α1b глицин, 250нМ	TCR, раслозн. α1 глицин, 25нМ	TCR, раслозн. α2 глицин, 250нМ	TCR, раслозн. BC-гордон, 250нМ	TCR, раслозн. γ1 глицин, 250нМ	TCR, раслозн. γ2 глицин, 250нМ	TCR, раслозн. γ3 глицин, 100нМ	TCR, раслозн. γ4а глицин, 25нМ	TCR, раслозн. γ4b глицин, 100нМ
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6.v2	0.46	0.29	1.33	1.62	0.18	9.52	1.62	252.22	1.55	636.21	8.69
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6.v2	0.60	0.33	1.81	1.96	0.20	11.41	1.90	785.29	1.21	1249.93	9.23
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6.v2	0.63	0.53	1.42	3.19	0.49	25.25	5.85	279.61	4.84	1979.98	27.83

Таблица 4

Пример 9

9.1 Создание клеточной линии альфа бета TCR KO Jurkat NFAT-Luc, кратковременно экспрессирующей TCR с рестрикцией по комплексу HLA-DQ2.5/глютенный пептид

5 Информацию об аминокислотных последовательностях TCR получали из общедоступных данных или Университета Осло на основании соглашения о передаче материалов. Информацию об аминокислотной последовательности TCR с рестрикцией по комплексу HLA-DQ2.5/альфа 1а глиадин (TCC ID: 387.9) получали из Университета Осло на основании соглашения о передаче

10 материалов. Информацию об аминокислотной последовательности TCR с рестрикцией по комплексу HLA-DQ2.5/альфа 2 глиадин (TCR с рестрикцией по комплексу DQ2.5/альфа 2 глиадин) получали из Nat Struct Mol Biol. 21, 2014, сс. 480-488. Хотя указанные TCR характеризуются рестрикцией по HLA-DQ2.5, но они обладают перекрестной реактивностью в отношении HLA-DQ2.2, когда

15 HLA-DQ2.2 находится в комплексе с альфа 1а глиадином, альфа 2 глиадином (фиг. 5-1 и 5-2). Последовательность каждой бета-цепи TCR связывали с соответствующей последовательностью альфа-цепи TCR с помощью саморасщепляющейся пептидной последовательности 2А (P2A, аминокислотная последовательность: GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP, SEQ ID NO: 203). Альфа-

20 цепь TCR и бета-цепь TCR с рестрикцией по комплексу HLA-DQ2.5/альфа 1а глиадин имели свою собственную нативную последовательность сигнального пептида. Сигнальную последовательность Campath (MGWSCILFLVATATGVHS, SEQ ID NO: 170) присоединяли к N-концу TCR с рестрикцией по комплексу HLA-DQ2.5/альфа 2 глиадин. Затем каждую кДНК конструкции бета-цепь TCR с

25 оптимизированными кодонами - P2A – альфа-цепь TCR встраивали в экспрессионный вектор pCXZD1 (US/20090324589) на фирме Genscript. Осуществляли электропорацию векторов в клетки альфа бета TCR-KO Jurkat-NFAT-luc2 согласно протоколу, прилагаемому к набору SE Cell Line 4D-Nucleofector™.

9.2 Создание HLA-DQ2.2⁺ бустерных В-клеток В-клеток крови человека (HBVB2.2)

В-клетки выделяли из HLA-DQ2.2+PBMC (фирма Precision for Medicines). Затем В-клетки иммортализировали с помощью бустерной В клетки крови человека (Human Blood B Booster® (фирма DENDRITICS).

9.3 Подтверждение ингибирующего действия антител к HLA DQ в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.2/пептид альфа 1а глиадина активации Т-клеток Jurkat

50 мкл смеси клеток HBVB2.2 ($8,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и 33-мерного пептида глиадина (LQLQPFQPPELPYPQPELPYPQPELPYPQPF, SEQ ID NO: 201, 25мкМ) вносили в 96-луночные планшеты. Затем добавляли 25 мкл серийно разведенных антител к HLA DQ и в конце добавляли 25 мкл трансфектированных TCR с рестрикцией по альфа 1а глиадину клеток линии альфа бета TCR-КО Jurkat-NFAT-luc2 ($2,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в течение ночи. После культивирования в течение ночи собирали 50 мкл культивированных клеток и повторно вносили в планшет OptiPlate-96 (фирма PerkinElmer, 6005299). Затем добавляли 50 мкл реагента Bio-Glo (фирма Promega, G7491) и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин и измеряли люминесценцию с помощью устройства Envision (фирма PerkinElmer) с последующим анализом с использованием Microsoft® Excel® для Office 365 MSO и программного обеспечения GraphPad Prism (фирма GraphPad). Ингибирующее действие (%) антител к HLA DQ определяли, принимая среднее количество отсчетов в секунду (cps) в лунке в отсутствии антигенного пептида без антител за 100%, а cps в лунке в присутствии антигена без антител за 0%. Величину IC₅₀ определяли, используя программное обеспечение с надстройкой XLfit Excel (IDBS).

Как продемонстрировано на фиг. 5-3 и в таблице 5, все протестированные антитела к HLA DQ (DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6.v2, DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6.v2, DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6.v2) опосредовали зависящую от концентрации нейтрализацию зависящей от комплекса HLA-DQ2.2 /пептид альфа 1а глиадина активацию Т-клеток Jurkat, которая характеризовалась величинами IC₅₀ в диапазоне концентраций в нг/мл.

9.4.Подтверждение ингибирующего действия антител к HLA DQ в отношении зависящей от комплекса HLA-DQ2.2/пептид альфа 2 глиаина активации Т-клеток Jurkat

50 мкл смеси клеток HBВВ2.2 ($8,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и 33-мерного пептида глиаина (LQLQPFQPELPYRQPELPYRQPELPYRQPF, SEQ ID NO: 201, 1мкМ) вносили в 96-луночные планшеты. Затем добавляли 25 мкл серийно разведенных антител к HLA DQ и в конце добавляли 25 мкл трансфектированных TCR с рестрикцией по альфа 2 глиаину клеток линии альфа бета TCR-KO Jurkat-NFAT-luc2 ($2,0 \times 10^4$ клеток/лунку) и инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в течение ночи. После культивирования в течение ночи собирали 50 мкл культивированных клеток и повторно вносили в планшет OptiPlate-96 (фирма PerkinElmer, 6005299). Затем добавляли 50 мкл реагента Bio-Glo (фирма Promega, G7491) и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин и измеряли люминесценцию с помощью устройства Envision (фирма PerkinElmer) с последующим анализом с использованием Microsoft® Excel® для Office 365 MSO Outlook Excel 2013 (фирма Microsoft) и программного обеспечения GraphPad Prism (фирма GraphPad). Ингибирующее действие (%) антител к HLA DQ определяли, принимая среднее количество отсчетов в секунду (cps) в лунке в отсутствие антигенного пептида без антител за 100%, а cps в лунке в присутствии антигена без антител за 0%. Величину IC₅₀ определяли, используя программное обеспечение с надстройкой XLfit Excel (IDBS).

Как продемонстрировано на фиг. 5-4 и в таблице 5, все протестированные антитела к HLA DQ (DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6.v2, DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6.v2, DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6.v2) опосредовали зависящую от концентрации нейтрализацию зависящей от комплекса HLA-DQ2.2/пептид альфа 2 глиаина активацию Т-клеток Jurkat, которая характеризовалась величинами IC₅₀ в диапазоне низких концентраций в нг/мл.

Как продемонстрировано на фиг. 5-3 - 5-4 и в таблице 5, DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6.v2, DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6.v2, DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6.v2 опосредовали зависящую от

концентрации нейтрализацию HLA-DQ2.2/пептид альфа 1 глиаина и альфа 2 глиаина.

- Как продемонстрировано на фиг. 4-1 - 5-4 и в таблице 4, таблице 5
- 5 DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6.v2,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6.v2,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6.v2 опосредовали зависящую от концентрации нейтрализацию всех протестированных эпитопов глютена. Кроме того, как продемонстрировано в таблице 2-7 и таблице 4, нейтрализующая активность DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6.v2,
- 10 DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6.v2,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6.v2 была сопоставима с активностью
- DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6,
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6,
- 15 DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6 соответственно.

Таблица 5

Обозначение Ат	IC ₅₀ HLA-DQ2.2	
	TCR, распознающий α1а глиадин, 25мкМ 33-мерн. глиадин	TCR, распознающий α2 глиадин, 1мкМ 33-мерн. глиадин
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6.v2	1.72	9.48
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6.v2	1.16	6.51
DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6.v2	1.62	4.60

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая содержит:

5 (I) первый антигенсвязывающий фрагмент, который обладает связывающей активностью в отношении HLA-DQ2.5 в форме комплекса с глютенным пептидом; и

(II) второй антигенсвязывающий фрагмент, который обладает связывающей активностью в отношении HLA-DQ2.5 в форме комплекса с глютенным пептидом;

10 где антигенсвязывающая молекула связывается с двумя или бóльшим количеством комплексов HLA-DQ2.5 и глютенных пептидов,

где по меньшей мере один из глютенных пептидов в комплексах, с которыми связывается первый антигенсвязывающий фрагмент, отличается от по меньшей мере одного из глютенных пептидов в комплексах, с которыми связывается второй антигенсвязывающий фрагмент; и

15 где антигенсвязывающая молекула практически не обладает связывающей активностью в отношении либо HLA-DQ2.5-позитивной В-клетки РВМС, либо Ва/Ф3-клетки, которая экспрессирует HLA-DQ2.5, либо обоих типов клеток,

20 где антигенсвязывающая молекула является гуманизированной, и где одна или несколько аминокислот в тяжелой цепи и/или легкой цепи первого антигенсвязывающего фрагмента и/или второго антигенсвязывающего фрагмента в мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы изменена(ы).

25 2. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 1, где антигенсвязывающая молекула практически не обладает связывающей активностью в отношении Ва/Ф3-клетки, которая экспрессирует HLA-DQ2.2. Q2.2.

30 3. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 1 или п. 2, где глютенный пептид представляет собой иммунодоминантный пептид, связанный с глютенной энтеропатией.

4. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. 1-3, где глютенный пептид выбирают из группы, которая состоит из: 33-мерного пептида глиаина, пептида альфа 1 глиаина, пептида альфа 2 глиаина, пептида гамма 1 глиаина, пептида гамма 2 глиаина, пептида омега 1 глиаина, пептида омега 2 глиаина, пептида ВС-гордеина, пептида альфа 3 глиаина, пептида альфа 1b глиаина, пептида гамма 4a глиаина, пептида гамма 4b глиаина, пептида авенина 1, пептида авенина 2, пептида авенина 3, пептида гордеина 1, пептида гордеина 2, пептида секалина 1, пептида секалина 2 и 26-мерного пептида глиаина.

10

5. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. 1-4, которая практически не обладает связывающей активностью в отношении HLA-DQ2.5 в форме комплекса с нерелевантным пептидом, где нерелевантный пептид представляет собой по меньшей мере один пептид, выбранный из группы, которая состоит из: CLIP-пептида, пептида вируса гепатита В 1, пептида *Salmonella*, пептида *Mycobacterium bovis* и пептида тиропероксидазы.

15

6. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. 1-5, которая практически не обладает связывающей активностью в отношении HLA-DP, HLA-DR, HLA-DQ5.1, HLA-DQ6.3, HLA-DQ7.3, HLA-DQ7.5 и HLA-DQ8.

20

7. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. 1-6, которая блокирует (I) взаимодействие между комплексом HLA-DQ2.5/глютенный пептид и CD4+ Т-клеткой с рестрикцией по комплексу HLA-DQ2.5/глютенный пептид; и/или (II) взаимодействие между комплексом HLA-DQ2.2/глютенный пептид и CD4+ Т-клеткой с рестрикцией по комплексу HLA-DQ2.2/глютенный пептид.

25

8. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 7, где глютенный пептид выбирают из группы, состоящей из: пептида альфа 1 глиаина, пептида альфа 1b глиаина, пептида альфа 2 глиаина, пептида омега 1 глиаина, пептида омега 2 глиаина, пептида гамма 1 глиаина, пептида гамма

30

2 глиаина, пептида гамма 3 глиаина, пептида гамма 4а глиаина, пептида гамма 4d глиаина и пептида ВС-гордеина.

5 9. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. 1-8, где антигенсвязывающая молекула обладает более высокой связывающей активностью в отношении комплекса, образованного HLA-DQ2.5 и глютенным пептидом, по сравнению с активностью до указанных гуманизации и изменения.

10 10. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. 1-9, где антигенсвязывающая молекула обладает более высокой перекрестной реактивностью в отношении глютенных пептидов по сравнению с реактивностью до указанных гуманизации и изменения.

15 11. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. 1-10, в которой один, два, три или все наборы аминокислотных остатков, выбранных из группы, которая состоит из наборов аминокислотных остатков, указанных ниже в подпунктах (а)-(г), в тяжелой цепи и легкой цепи антигенсвязывающей молекулы, представляют собой аминокислотные остатки, которые электростатически отталкиваются друг от друга:

20 (а) аминокислотный остаток в константной области тяжелой цепи (СН1), который находится в положении 175 согласно EU-нумерации, и аминокислотный остаток в константной области легкой цепи (СL), который находится в положении 131 согласно нумерации Кэбота,

25 (б) аминокислотный остаток в СН1, который находится в положении 175 согласно EU-нумерации, и аминокислотный остаток в СL, который находится в положении 160 согласно нумерации Кэбота,

(в) аминокислотный остаток в СН1, который находится в положении 175 согласно EU-нумерации, и аминокислотные остатки в СL, которые находятся в положениях 131 и 160 согласно нумерации Кэбота,

30 (г) аминокислотные остатки в СН1, которые находятся в положениях 147 и 175 согласно EU-нумерации, и аминокислотные остатки в СL, которые находятся в положениях 131 и 160 согласно нумерации Кэбота.

12. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 11, в которой дополнительно два или большее количество аминокислотных остатков, которые образуют поверхность раздела между вариабельной областью тяжелой цепи и вариабельной областью легкой цепи, представляют собой
5 аминокислотные остатки, которые электростатически отталкиваются друг от друга.

13. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 12, в которой аминокислотные остатки, которые электростатически отталкиваются
10 друг от друга, представляют собой один или два набора аминокислотных остатков, выбранных из группы, которая состоит из наборов аминокислотных остатков, указанных ниже в подпунктах (а) и (б):

(а) аминокислотный остаток в вариабельной области тяжелой цепи, который находится в положении 39 согласно нумерации Кэбота, и
15 аминокислотный остаток в вариабельной области легкой цепи, который находится в положении 38 согласно нумерации Кэбота,

(б) аминокислотный остаток в вариабельной области тяжелой цепи, который находится в положении 45 согласно нумерации Кэбота, и
аминокислотный остаток в вариабельной области легкой цепи, который
20 находится в положении 44 согласно нумерации Кэбота.

14. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. 11-13, в которой аминокислотные остатки, которые электростатически отталкиваются друг от друга, выбраны из аминокислотных остатков, входящих в
25 любой из наборов (X) или (Y), указанных ниже:

(X) глутаминовая кислота (E), аспарагиновая кислота (D),

(Y) лизин (K), аргинин (R), гистидин (H).

15. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. 30 11-14, которая дополнительно содержит Fc-домен, обладающий пониженной аффинностью связывания с человеческим Fc-гамма рецептором по сравнению с нативным Fc-доменом человеческого IgG1.

16. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 15, в которой Fc-домен содержит Arg в положении 235 и Arg в положении 236, где нумерация аминокислотных положений соответствует EU-нумерации.

5 17. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 15 или п. 16, в которой Fc-домен состоит из первой субъединицы Fc-области и второй субъединицы Fc-области, которые обладают способностью к стабильной ассоциации.

10 18. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 17, в которой Fc-домен содержит вариант (д1) или (д2), указанный ниже:

15 (д1) первую субъединицу Fc-области, содержащую Cys в положении 349, Ser в положении 366, Ala в положении 368 и Val в положении 407, и вторую субъединицу Fc-области, содержащую Cys в положении 354 и Trp в положении 366;

(д2) первую субъединицу Fc-области, содержащую Glu в положении 439, и вторую субъединицу Fc-области, содержащую Lys в положении 356, где нумерация аминокислотных положений соответствует EU-нумерации.

20 19. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. 15-18, в которой Fc-домен обладает дополнительно более сильной FcRn-связывающей аффинностью с человеческим FcRn, по сравнению с нативным Fc-доменом человеческого IgG1.

25 20. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 18, в которой первая и/или вторая субъединица Fc-области содержит Leu в положении 428, Ala в положении 434, Arg в положении 438 и Glu в положении 440, где нумерация аминокислотных положений соответствует EU-нумерации.

30 21. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. 1-20, где мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула практически не обладает связывающей активностью в отношении самого глютенного пептида.

22. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. 1-10, где мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит один или несколько аминокислотных остатков, указанных ниже в подпунктах (I)-(XII):

- 5 (I) глутаминовая кислота или лизин в положении 175 (EU-нумерация) в константной области тяжелой цепи;
- (II) глутаминовая кислота в положении 147 (EU-нумерация) в константной области тяжелой цепи;
- (III) глутаминовая кислота или лизин в положении 131 (нумерация Кэбота)
- 10 в константной области легкой цепи;
- (IV) глутаминовая кислота или лизин в положении 160 (нумерация Кэбота) в константной области легкой цепи;
- (V) аргинин в положении 235 (EU-нумерация) в константной области тяжелой цепи;
- 15 (VI) аргинин в положении 236 (EU-нумерация) в константной области тяжелой цепи;
- (VII) лизин в положении 356 (EU-нумерация) в константной области тяжелой цепи;
- (VIII) лейцин в положении 428 (EU-нумерация) в константной области
- 20 тяжелой цепи;
- (IX) аланин в положении 434 (EU-нумерация) в константной области тяжелой цепи;
- (X) аргинин в положении 438 (EU-нумерация) в константной области тяжелой цепи;
- 25 (XI) глутаминовая кислота в положении 439 (EU-нумерация) в константной области тяжелой цепи;
- (XII) глутаминовая кислота в положении 440 (EU-нумерация) в константной области тяжелой цепи.

30 23. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент;

в которой первый антигенсвязывающий фрагмент содержит любой из вариантов, указанных ниже в подпунктах (a1)-(a3):

5 (a1) первую переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 129, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 130, CDR 3, имеющий of SEQ ID NO: 131, и вторую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 132, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 133, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 134;

10 (a2) первую переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 164, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 165, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 166, и вторую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 167, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 168, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 169; и

15 (a3) первую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности первой переменной области антитела, указанной в подпункте (a1) или подпункте (a2), и вторую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности второй переменной области антитела, указанной в подпункте (a1) или подпункте (a2).

20

24. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 23, в которой второй антигенсвязывающий фрагмент содержит любой из вариантов, указанных ниже в подпунктах (b1)-(b8):

25 (b1) третью переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 135, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 136, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 137, и четвертую переменную область антитела, которая содержит переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 138, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 139, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 140;

30 (b2) третью переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 135, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 136, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 137, и четвертую переменную область антитела, которая содержит переменную область

область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 141, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 142, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 143;

(б3) третью переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 144, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 145, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 146, и четвертую переменную область антитела, которая содержит переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 141, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 142, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 143;

(б4) третью переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 147, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 148, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 149, и четвертую переменную область антитела, которая содержит переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 150, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 151, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 152;

(б5) третью переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 153, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 154, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 155, и четвертую переменную область антитела, которая содержит переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 150, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 151, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 152;

(б6) третью переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 156, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 157, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 158, и четвертую переменную область антитела, которая содержит переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 150, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 151, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 152;

(б7) третью переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 159, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 160, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 161, и четвертую переменную область антитела, которая содержит переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 141, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 142, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 143; и

(б8) третью аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности третьей
вариабельной области антитела, указанной в одном из подпунктов (б1)-(б7), и
5 четвертую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере
на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности четвертой
вариабельной области антитела, указанной в одном из подпунктов (б1)-(б7).

25. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая
первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий
10 фрагмент,

в которой второй антигенсвязывающий фрагмент содержит любой из
вариантов, указанных ниже в подпунктах (б1)-(б8):

(б1) первую вариабельную область антитела, которая содержит
определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 135,
15 CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 136, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 137, и вторую
вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO:
138, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 139, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 140;

(б2) первую вариабельную область антитела, которая содержит
определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 135,
20 CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 136, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 137, и вторую
вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO:
141, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 142, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 143;

(б3) первую вариабельную область антитела, которая содержит
определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 144,
25 CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 145, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 146, и вторую
вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO:
141, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 142, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 143;

(б4) первую вариабельную область антитела, которая содержит
определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 147,
30 CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 148, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 149, и вторую
вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO:
150, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 151, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 152;

(б5) первую переменную область антитела, которая содержит определяющую комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 153, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 154, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 155, и вторую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 150, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 151, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 152;

(б6) первую переменную область антитела, которая содержит определяющую комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 156, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 157, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 158, и вторую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 150, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 151, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 152;

(б7) первую переменную область антитела, которая содержит определяющую комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 159, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 160, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 161, и вторую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 141, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 142, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 143; и

(б8) первую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности первой переменной области антитела, указанной в одном из подпунктов (б1)-(б7), и вторую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности второй переменной области антитела, указанной в одном из подпунктов (б1)-(б7).

26. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент,

в которой первый антигенсвязывающий фрагмент содержит любой из вариантов, указанных ниже в подпунктах (в1)-(в3):

(в1) первую переменную область антитела, которая содержит определяющую комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 129, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 130, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 131, и вторую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 132, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 133, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 134;

(в2) первую переменную область антитела, которая содержит определяющую комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 164, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 165, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 166, и вторую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 167, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 168, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 169; и

(в3) первую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности первой переменной области антитела, указанной подпункте (в1) или (в2), и вторую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности второй переменной области антитела, указанной подпункте (в1) или (в2),

в которой второй антигенсвязывающий фрагмент содержит любой из вариантов, указанных ниже в подпунктах (г1)-(г8):

(г1) третью переменную область антитела, которая содержит определяющую комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 135, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 136, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 137, и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 138, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 139, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 140;

(г2) третью переменную область антитела, которая содержит определяющую комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 135, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 136, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 137, и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 141, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 142, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 143;

(г3) третью переменную область антитела, которая содержит определяющую комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 144, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 145, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 146, и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 141, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 142, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 143;

(г4) третью переменную область антитела, которая содержит определяющую комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 147,

CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 148, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 149, и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 150, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 151, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 152;

5 (г5) третью переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 153, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 154, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 155, и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 150, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 151, CDR 3, имеющий SEQ ID
10 NO: 152;

(г6) третью переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 156, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 157, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 158, и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий
15 SEQ ID NO: 150, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 151, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 152;

(г7) третью переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 159, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 160, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 161, и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий
20 SEQ ID NO: 141, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 142, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 143; и

(г8) третью аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности третьей
25 переменной области антитела, указанной в одном из подпунктов (г1)-(г7), и четвертую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности четвертой переменной области антитела, указанной в одном из подпунктов (г1)-(г7).

30 27. Мультиспецифическая антигенсвязывающая, которая содержит первый антигенсвязывающий фрагмент, содержащий первую и вторую переменные области антитела, и второй антигенсвязывающий фрагмент, содержащий третью и четвертую переменные области антитела, где мультиспецифическая

антигенсвязывающая молекула содержит любой из вариантов, указанных ниже в подпунктах (1)-(15):

(1) первую переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 129, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 130, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 131; вторую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 132, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 133, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 134; третью переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 135, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 136, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 137; и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 138, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 139, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 140;

(2) первую переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 129, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 130, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 131; вторую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 132, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 133, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 134; третью переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 135, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 136, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 137; и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 141, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 142, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 143;

(3) первую переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 129, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 130, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 131; вторую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 132, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 133, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 134; третью переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 144, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 145, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 146; и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 141, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 142, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 143;

(4) первую переменную область антитела, которая содержит определяющую комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 129, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 130, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 131; вторую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 132, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 133, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 134; третью переменную область антитела, которая содержит определяющую комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 147, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 148, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 149; и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 150, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 151, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 152;

(5) первую переменную область антитела, которая содержит определяющую комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 129, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 130, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 131; вторую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 132, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 133, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 134; третью переменную область антитела, которая содержит определяющую комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 153, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 154, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 155; и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 150, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 151, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 152;

(6) первую переменную область антитела, которая содержит определяющую комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 129, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 130, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 131; вторую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 132, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 133, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 134; третью переменную область антитела, которая содержит определяющую комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 156, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 157, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 158; и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 150, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 151, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 152;

(7) первую переменную область антитела, которая содержит определяющую комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 129, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 130, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 131; вторую

вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 132, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 133, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 134; третью вариабельную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 159, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 160, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 161; и четвертую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 141, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 142, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 143; и

5 (8) первую вариабельную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 164, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 165, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 166; вторую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 167, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 168, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 169; третью вариабельную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 135, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 136, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 137; и четвертую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 138, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 139, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 140;

10 (9) первую вариабельную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 164, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 165, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 166; вторую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 167, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 168, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 169; третью вариабельную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 135, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 136, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 137; и четвертую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 141, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 142, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 143;

25 (10) первую вариабельную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 164, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 165, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 166; вторую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 167, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 168, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 169; третью вариабельную область антитела, которая содержит определяющий

комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 144, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 145, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 146; и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 141, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 142, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 143;

5 (11) первую переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 164, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 165, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 166; вторую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 167, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 168, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 169;

10 третью переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 147, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 148, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 149; и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 150, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 151, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 152;

15 (12) первую переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 164, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 165, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 166; вторую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 167, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 168, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 169;

20 третью переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 153, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 154, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 155; и четвертую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 150, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 151, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 152;

25 (13) первую переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 164, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 165, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 166; вторую переменную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 167, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 168, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 169;

30 третью переменную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 156, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 157, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 158; и четвертую

вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 150, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 151, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 152;

(14) первую вариабельную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 164, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 165, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 166; вторую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 167, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 168, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 169; третью вариабельную область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 159, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 160, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 161; и четвертую вариабельную область антитела, которая содержит CDR 1, имеющий SEQ ID NO: 141, CDR 2, имеющий SEQ ID NO: 142, CDR 3, имеющий SEQ ID NO: 143; и

(15) первую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности первой вариабельной области антитела, указанной в одном из подпунктов (1)-(14); вторую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности второй вариабельной области антитела, указанной в одном из подпунктов (1)-(14); третью аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности третьей вариабельной области антитела, указанной в одном из подпунктов (1)-(14); и четвертую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности четвертой вариабельной области антитела, указанной в одном из подпунктов (1)-(14).

28. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. 23-27, в которой вариабельная область антитела, входящая в первый и/или второй антигенсвязывающий фрагмент, содержит каркасные участки человеческого антитела или каркасные участки гуманизированного антитела.

29. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент;

в которой первый антигенсвязывающий фрагмент содержит любой из вариантов, указанных ниже в подпунктах (д1)-(д3):

5 (д1) первую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88, и вторую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90;

10 (д2) первую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89, и вторую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91; и

15 (д3) первую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности первой переменной области антитела, указанной подпункте (д1) или (д2), и вторую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности второй переменной области антитела, указанной в подпункте (д1) или (д2).

20 30. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 29, в которой второй антигенсвязывающий фрагмент содержит любой из вариантов, указанных ниже в подпунктах (е1)-(е8):

(е1) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98;

25 (е2) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99;

30 (е3) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99;

(e4) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100;

5 (e5) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100;

10 (e6) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100;

15 (e7) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99; и

20 (e8) третью аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности третьей переменной области антитела, указанной в одном из подпунктов (e1)-(e7); и четвертую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности четвертой переменной области антитела, указанной в одном из подпунктов (e1)-(e7).

25 31. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент; в которой первый антигенсвязывающий фрагмент содержит любой из вариантов, указанных ниже в подпунктах (d1)-(d3):

30 (d1) первую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88, и вторую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90;

(д2) первую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89, и вторую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91; и

5 (д3) первую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности первой переменной области антитела, указанной подпункте (д1) или (д2), и вторую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности второй переменной области антитела, указанной в подпункте (д1) или (д2), и

10 в которой второй антигенсвязывающий фрагмент содержит любой из вариантов, указанных ниже в подпунктах (е1)-(е8):

(е1) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98;

15 (е2) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99;

20 (е3) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99;

25 (е4) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100;

30 (е5) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100;

(e6) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100;

5 (e7) третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97, и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99; и

10 (e8) третью аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности третьей переменной области антитела, указанной в одном из подпунктов (e1)-(e7); и четвертую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности четвертой переменной области антитела, указанной в одном из подпунктов (e1)-(e7).

15

32. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая содержит первый антигенсвязывающий фрагмент, содержащий первую и вторую переменные области антитела, и второй антигенсвязывающий фрагмент, содержащий третью и четвертую переменные области антитела, где

20 мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит любой из вариантов, указанных ниже в подпунктах (1)-(15):

(1) первую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88; вторую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90; третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92; и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98;

25

(2) первую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88; вторую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90; третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92; и четвертую переменную

30

(12) первую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89; вторую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91; третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95; и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100;

(13) первую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89; вторую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91; третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96; и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100;

(14) первую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89; вторую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91; третью переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97; и четвертую переменную область антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99;

(15) первую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности первой переменной области антитела, указанной в одном из подпунктов (1) - (14); вторую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности второй переменной области антитела, указанной в одном из подпунктов (1)-(14); третью аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности третьей переменной области антитела, указанной в одном из подпунктов (1)-(14); и четвертую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности четвертой переменной области антитела, указанной в одном из подпунктов (1)-(14).

33. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая содержит комбинацию двух полипептидных цепей, выбранных из группы, которая состоит из вариантов, указанных ниже в подпунктах (A1)-(A3):

5 (A1) первая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, и первая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43;

(A2) первая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и первая легкая цепь, содержащая
10 аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46; и

(A3) первая аминокислотная последовательность, идентичная по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности первой тяжелой цепи, указанной в подпункте (A1) или (A2), и вторая аминокислотная последовательность, идентичная по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%
15 или 95% последовательности первой легкой цепи, указанной в подпункте (A1) или (A2).

34. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 33, которая дополнительно содержит комбинацию двух полипептидных цепей, выбранных из
20 группы, которая состоит из вариантов, указанных ниже в подпунктах (B1)-(B8):

(B1) вторая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и вторая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55;

(B2) вторая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную
25 последовательность SEQ ID NO: 54, и вторая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56;

(B3) вторая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58, и вторая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56;

30 (B4) вторая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и вторая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61;

(Б5) вторая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63, и вторая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61;

5 (Б6) вторая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, и вторая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61;

(Б7) вторая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, и вторая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56; и

10 (Б8) третья аминокислотная последовательность, идентичная по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности второй тяжелой цепи, указанной в одном из подпунктов (Б1)-(Б7), и четвертая аминокислотная последовательность, идентичная по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности второй легкой цепи, указанной в одном из
15 подпунктов (Б1)-(Б7).

35. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая содержит комбинацию четырех полипептидных цепей, выбранных из группы, которая состоит из вариантов, указанных ниже в подпунктах (1)-(15):

20 (1) первая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, и первая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, и вторая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и вторая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55;

25 (2) первая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, и первая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, и вторая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и вторая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56;

30 (3) первая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, и первая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, и вторая тяжелая цепь, содержащая

(10) первая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и первая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и вторая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, и вторая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56;

(11) первая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, и первая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, и вторая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, и вторая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61;

(12) первая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, и первая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, и вторая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, и вторая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56;

(13) первая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и первая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и вторая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63, и вторая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61;

(14) первая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, и первая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и вторая тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и вторая легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61; и

(15) первая аминокислотная последовательность, идентичная по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности первой тяжелой цепи, указанной в одном из подпунктов (1)-(14); вторая аминокислотная последовательность, идентичная по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности первой легкой цепи, указанной в одном из подпунктов (1)-(14); третья аминокислотная последовательность, идентичная по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности второй тяжелой цепи, указанной в одном из подпунктов (1)-(14); и четвертая

аминокислотная последовательность, идентичная по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% последовательности второй легкой цепи, указанной в одном из подпунктов (1)-(14).

5 36. Комбинация по одному из п.п. (I)-(III), указанных ниже:

(I) мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая содержит последовательности, указанные в одном из подпунктов (a1)-(a3) в п. 23, и мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая содержит последовательности, указанные в одном из подпунктов (b1)-(b8) в п. 24;

10 (II) мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая содержит последовательности, указанные в одном из подпунктов (d1)-(d3) в п. 29, и мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая содержит последовательности, указанные в одном из подпунктов (e1)-(e8) в п. 30; и

15 (III) мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая содержит последовательности, указанные в одном из подпунктов (A1)-(A3) в п. 33, и мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая содержит последовательности, указанные в одном из подпунктов (B1)-(B8) в п. 34.

20 37. Нуклеиновая кислота, кодирующая мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу по одному из п.п. 1-35.

38. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 37.

39. Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 37 или вектор по п. 38.

25 40. Способ получения мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы, включающий культивирование клетки по п. 39 с получением мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы.

30 41. Способ по п. 40, дополнительно включающий выделение мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы из клеточной культуры.

42. Фармацевтическая композиция, содержащая мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу по одному из п.п. 1-35 или комбинацию по п. 36 и фармацевтически приемлемый носитель.

5 43. Композиция по п. 42, представляющая собой фармацевтическую композицию, предназначенную для применения для лечения и/или предупреждения глютеновой энтеропатии.

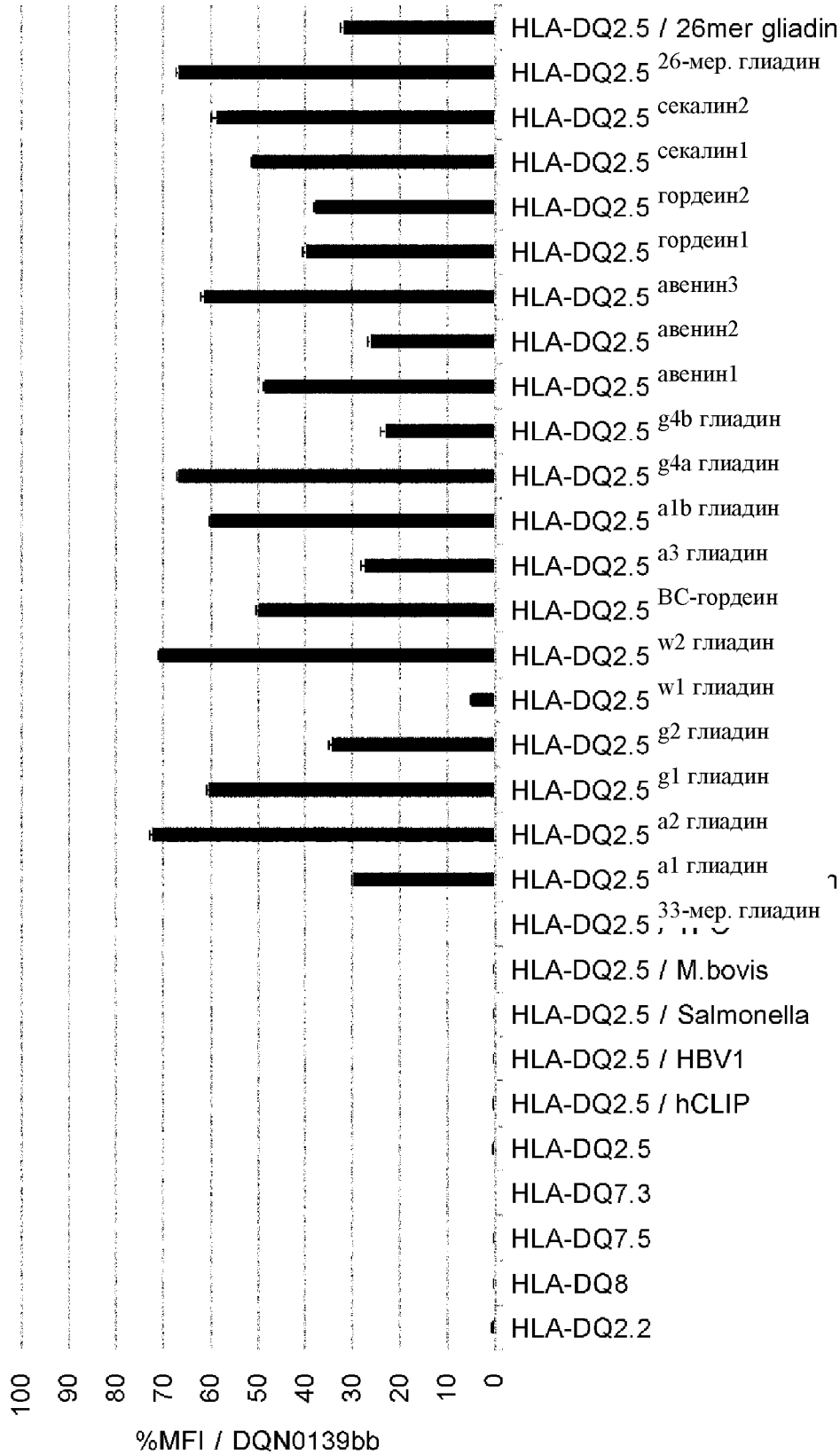
10 44. Применение мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы по одному из п.п. 1-35 или комбинации по п. 36 для приготовления лекарственного средства.

15 45. Применение по п. 44, в котором лекарственное средство представляет собой лекарственное средство, предназначенное для лечения и/или предупреждения глютеновой энтеропатии.

20 46. Способ лечения индивидуума, имеющего глютеновую энтеропатию, который включает введение индивидууму в эффективном количестве мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы по одному из п.п. 1-35 или комбинации по п. 36.

25 47. Набор, предназначенный для лечения и/или предупреждения глютеновой энтеропатии, который содержит по меньшей мере мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу по одному из п.п. 1-35 или комбинацию по п. 36 и инструкции по применению.

DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6

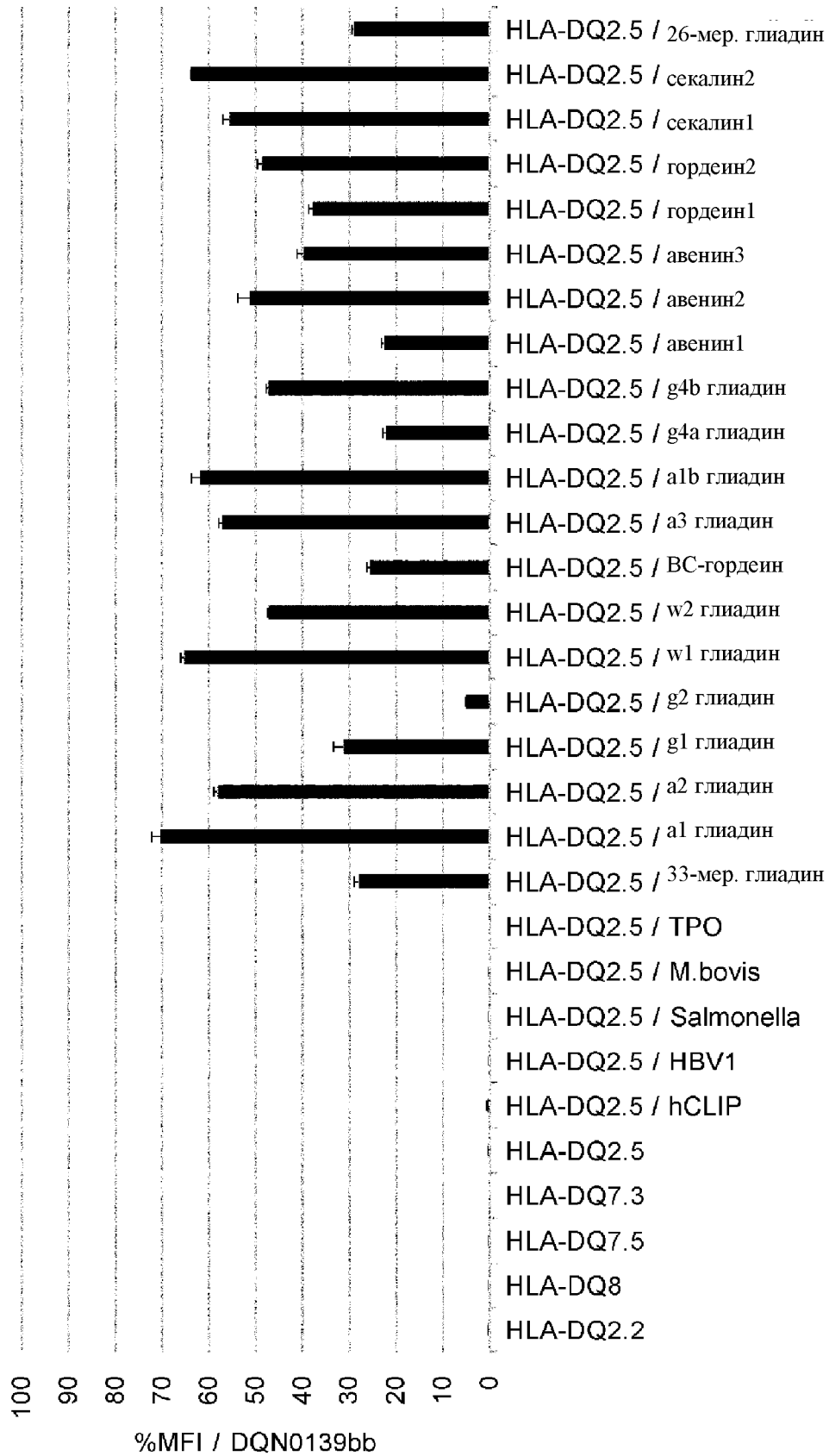


Пептиды, имеющие происхождение из глютена

Нерелевантные пептиды

Фиг. 1-1

DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6

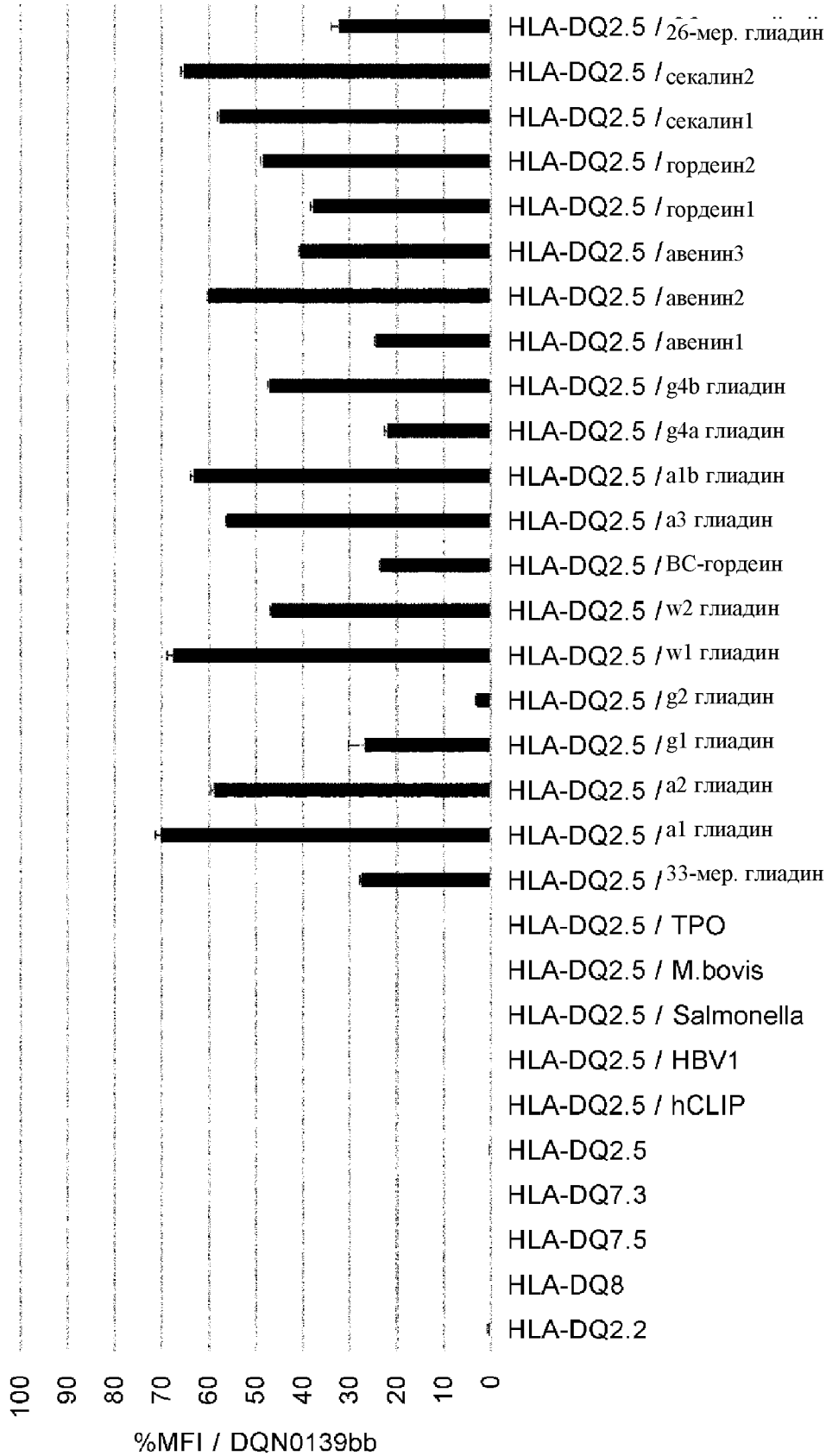


Пептиды, имеющие происхождение из глютена

Нерелевантные пептиды

Фиг. 1-2

DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6

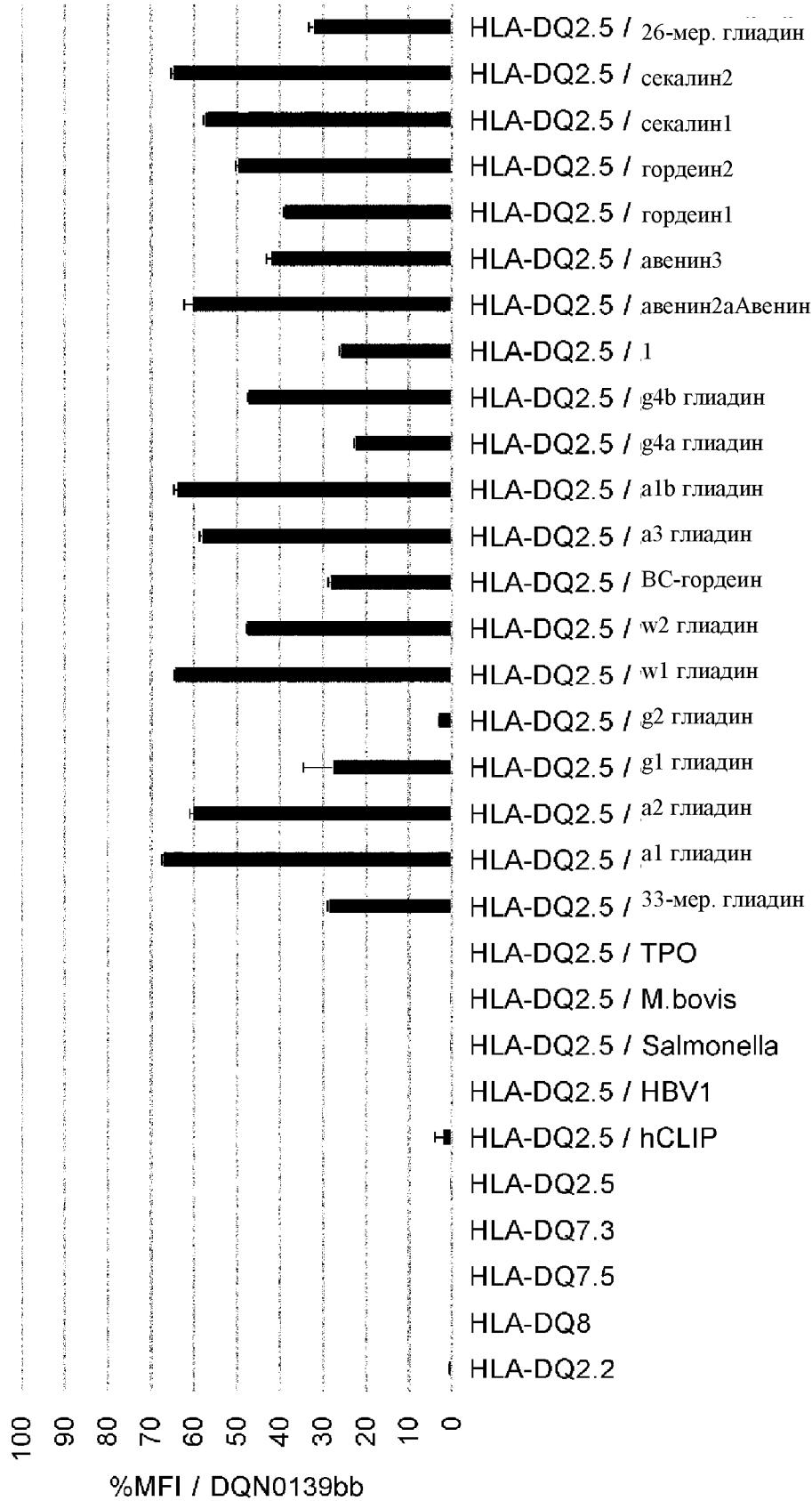


Фиг. 1-3

Пептиды, имеющие происхождение из глютена

Нерелевантные пептиды

DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6

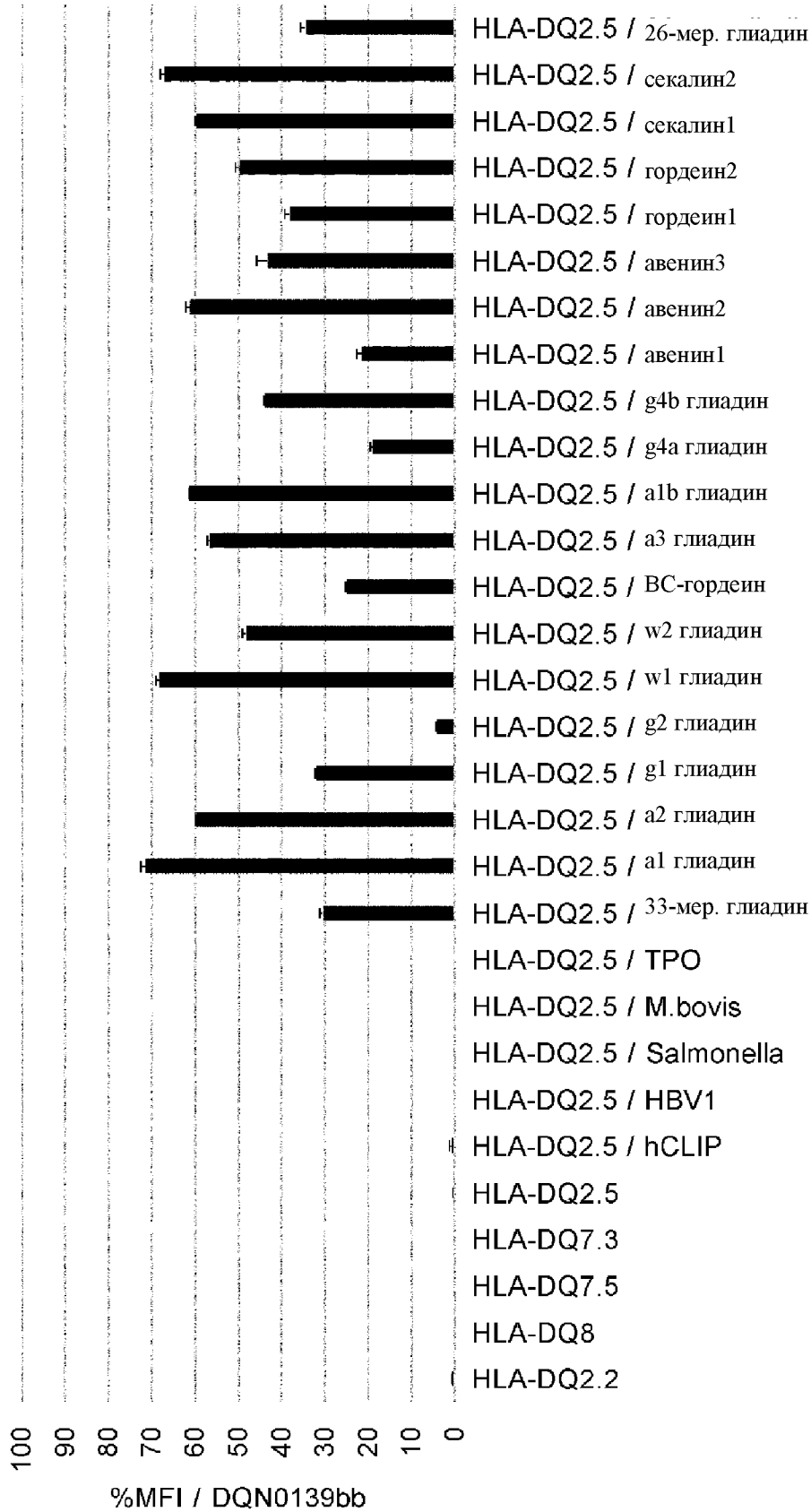


Пептиды, имеющие происхождение из глютена

Нерелевантные пептиды

Фиг. 1-4

DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6

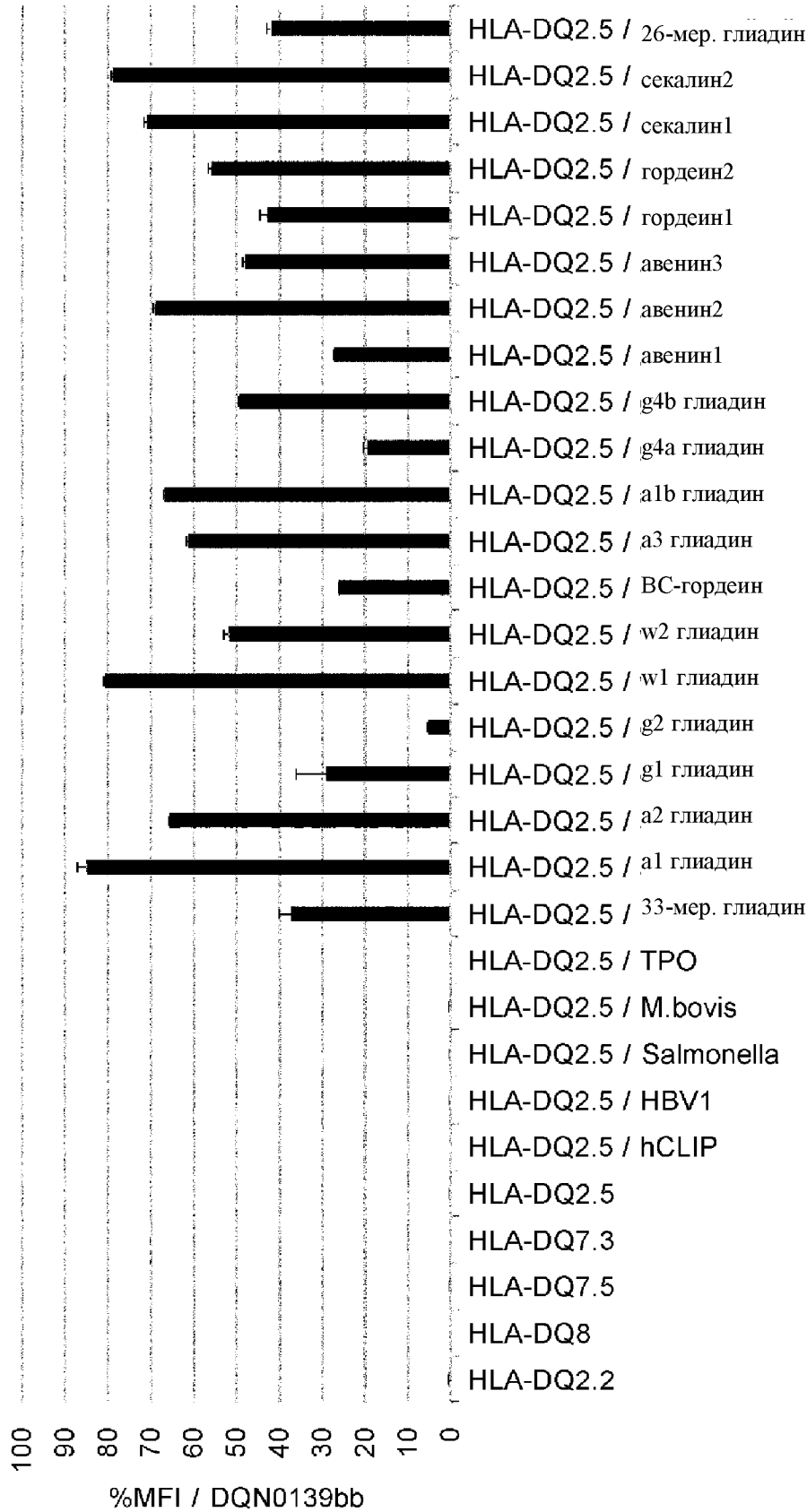


Пептиды, имеющие происхождение из глютена

Нерелевантные пептиды

Фиг. 1-5

DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6

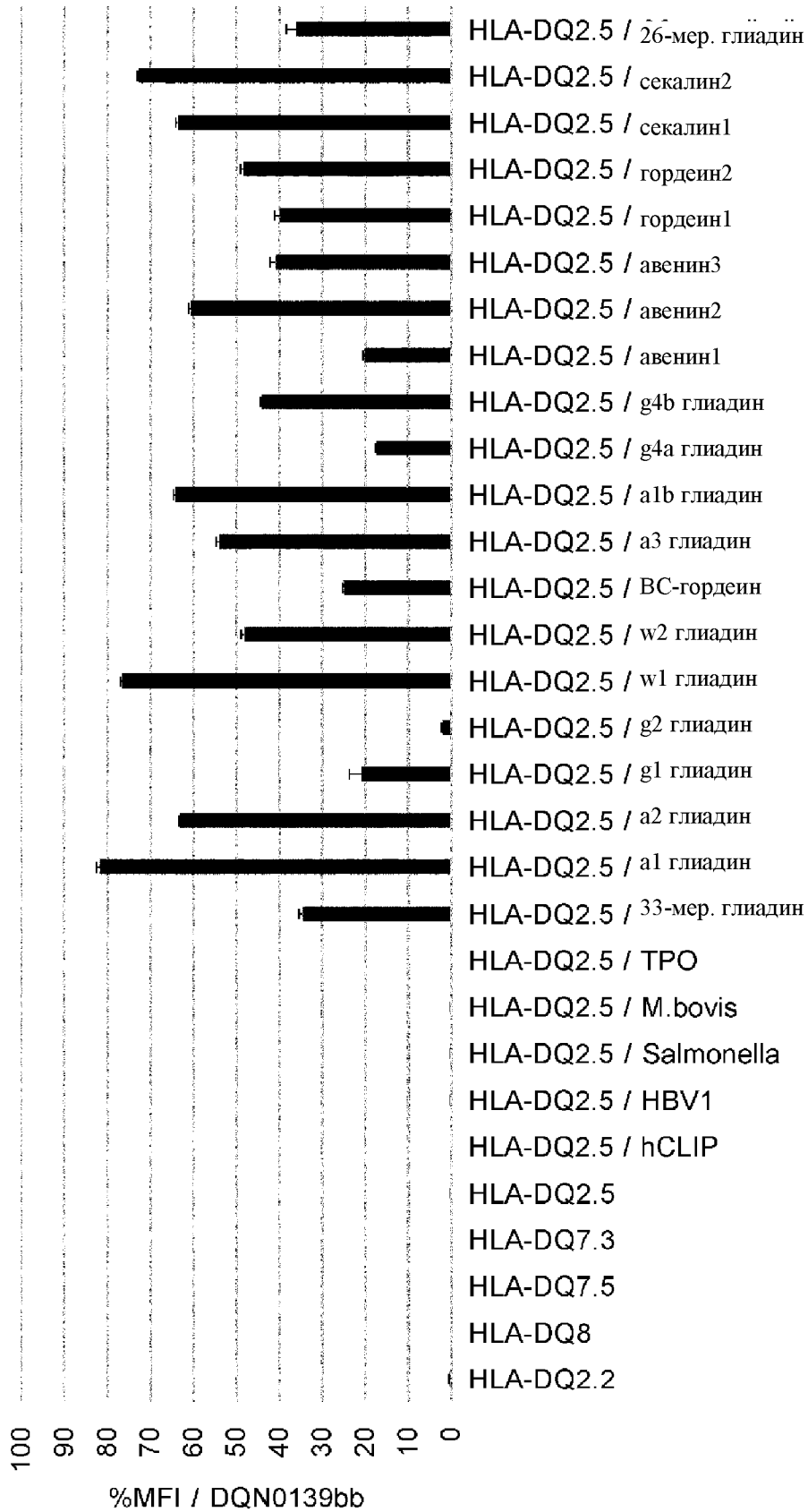


Пептиды, имеющие происхождение из глютена

Нерелевантные пептиды

Фиг. 1-6

DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6

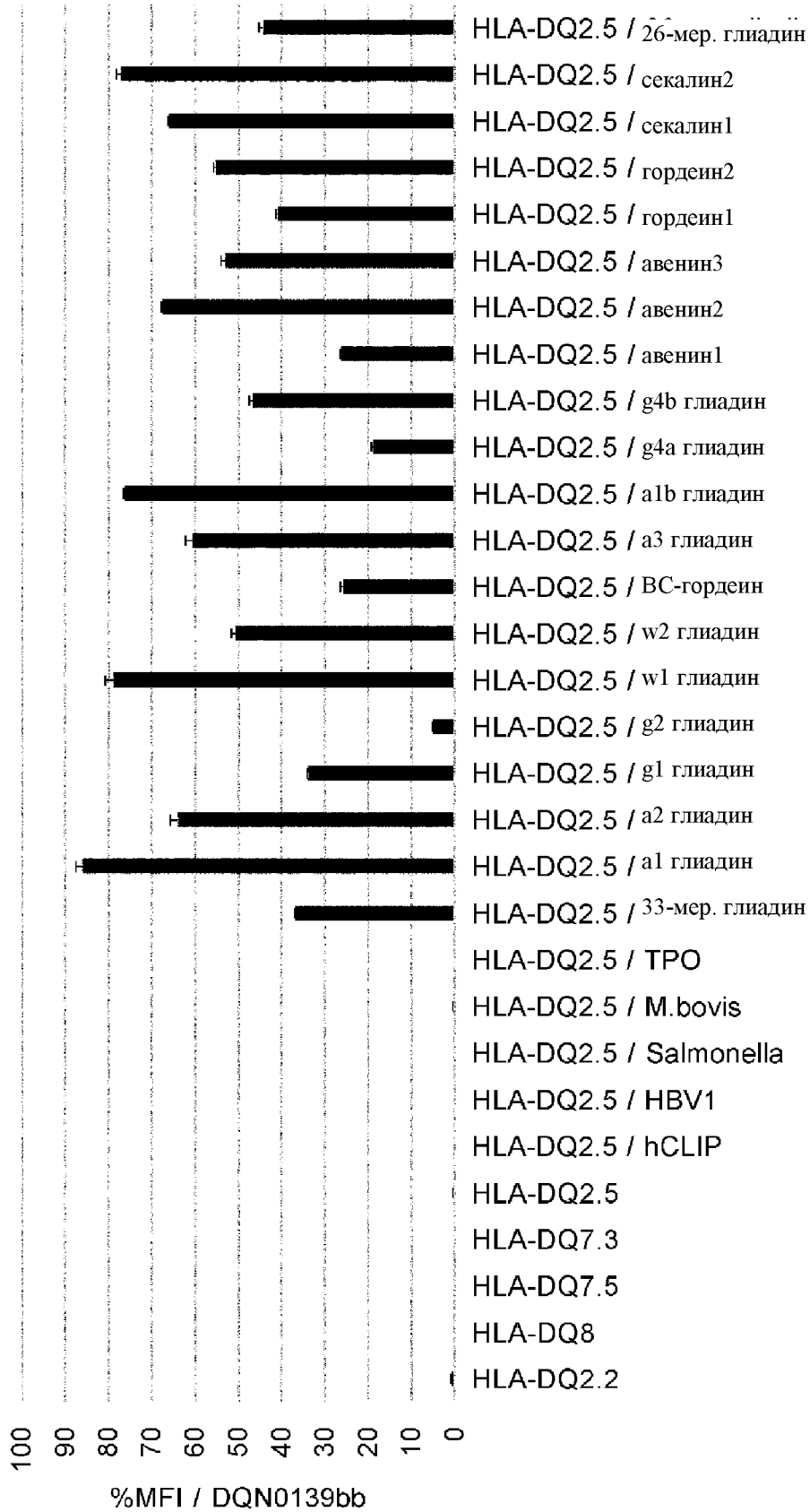


Пептиды, имеющие происхождение из глютена

Нерелевантные пептиды

Фиг. 1-7

DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6

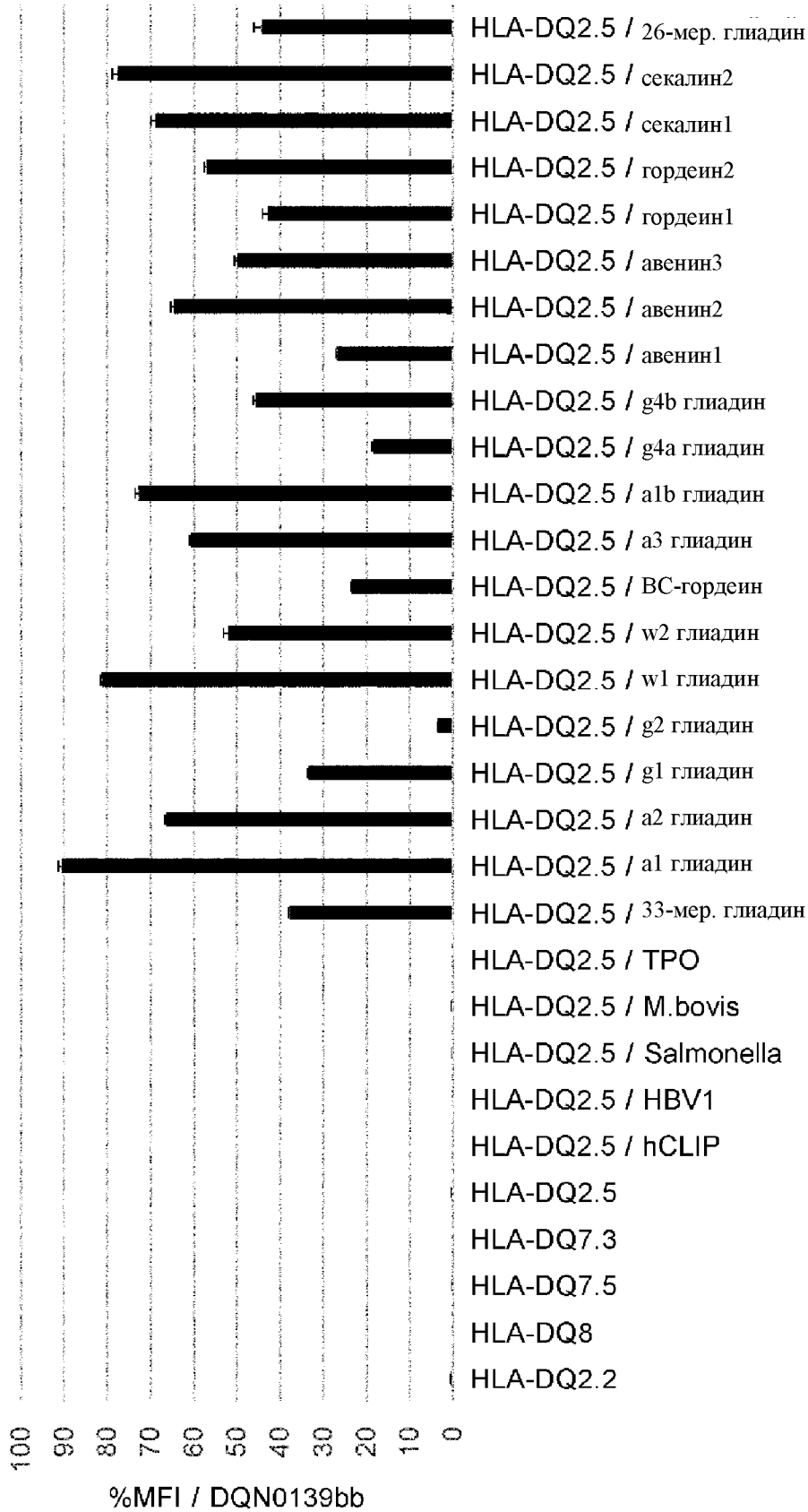


Пептиды, имеющие происхождение из глютена

Нерелевантные пептиды

Фиг. 1-8

DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6

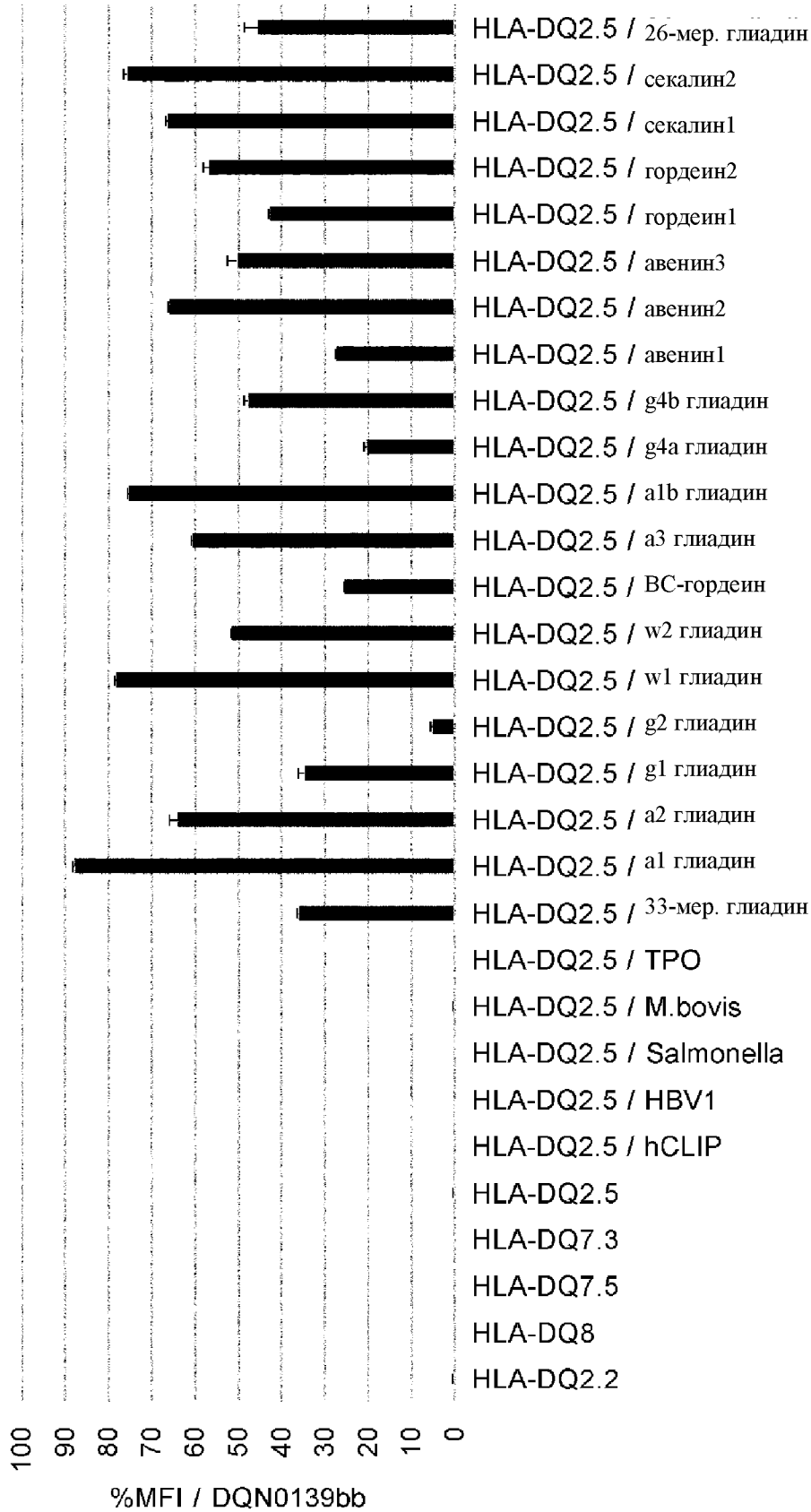


Пептиды, имеющие происхождение из глютена

Нерелевантные пептиды

Фиг. 1-9

DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6

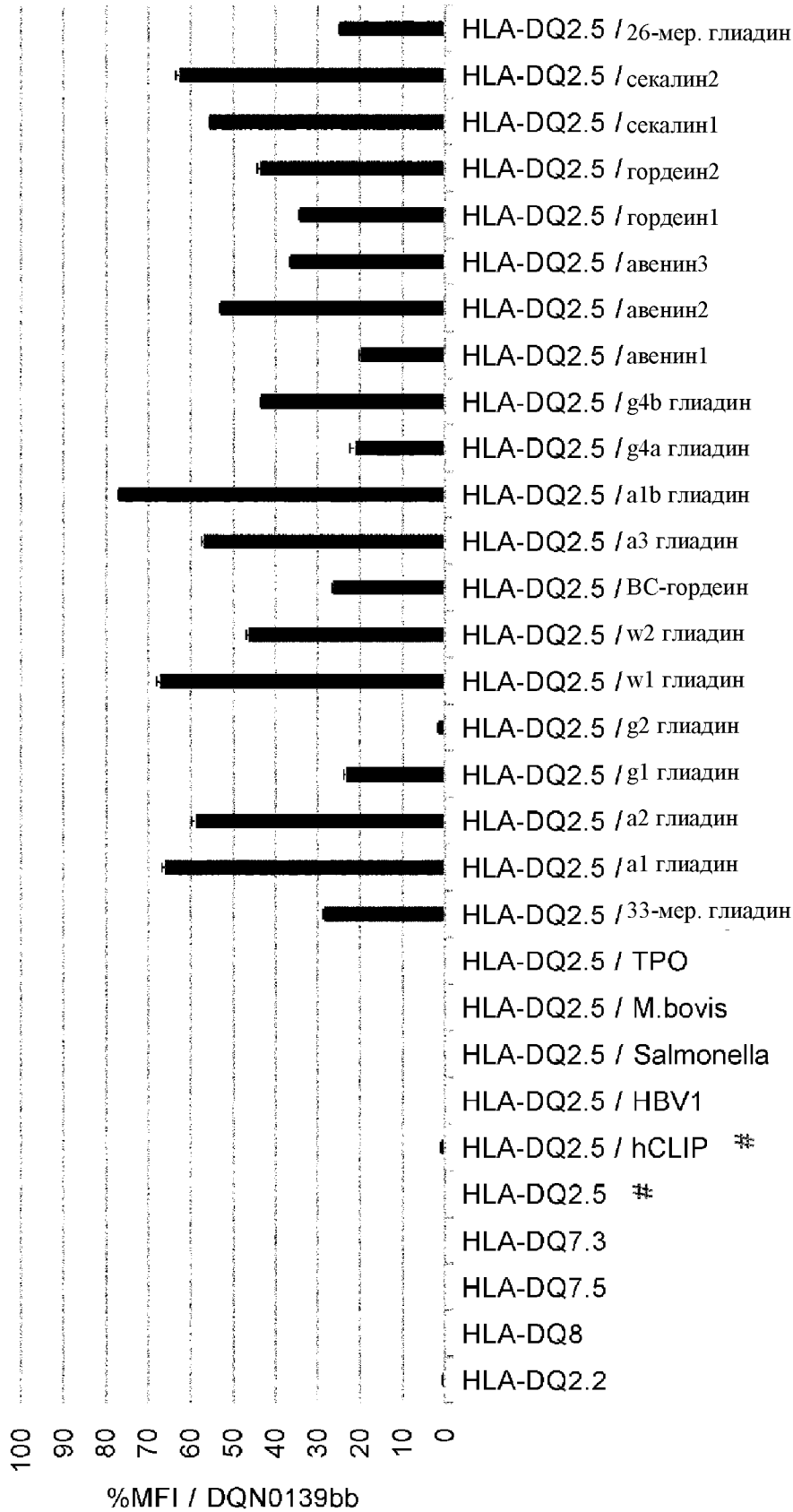


Фиг. 1-10

Пептиды, имеющие происхождение из глютена

Нерелевантные пептиды

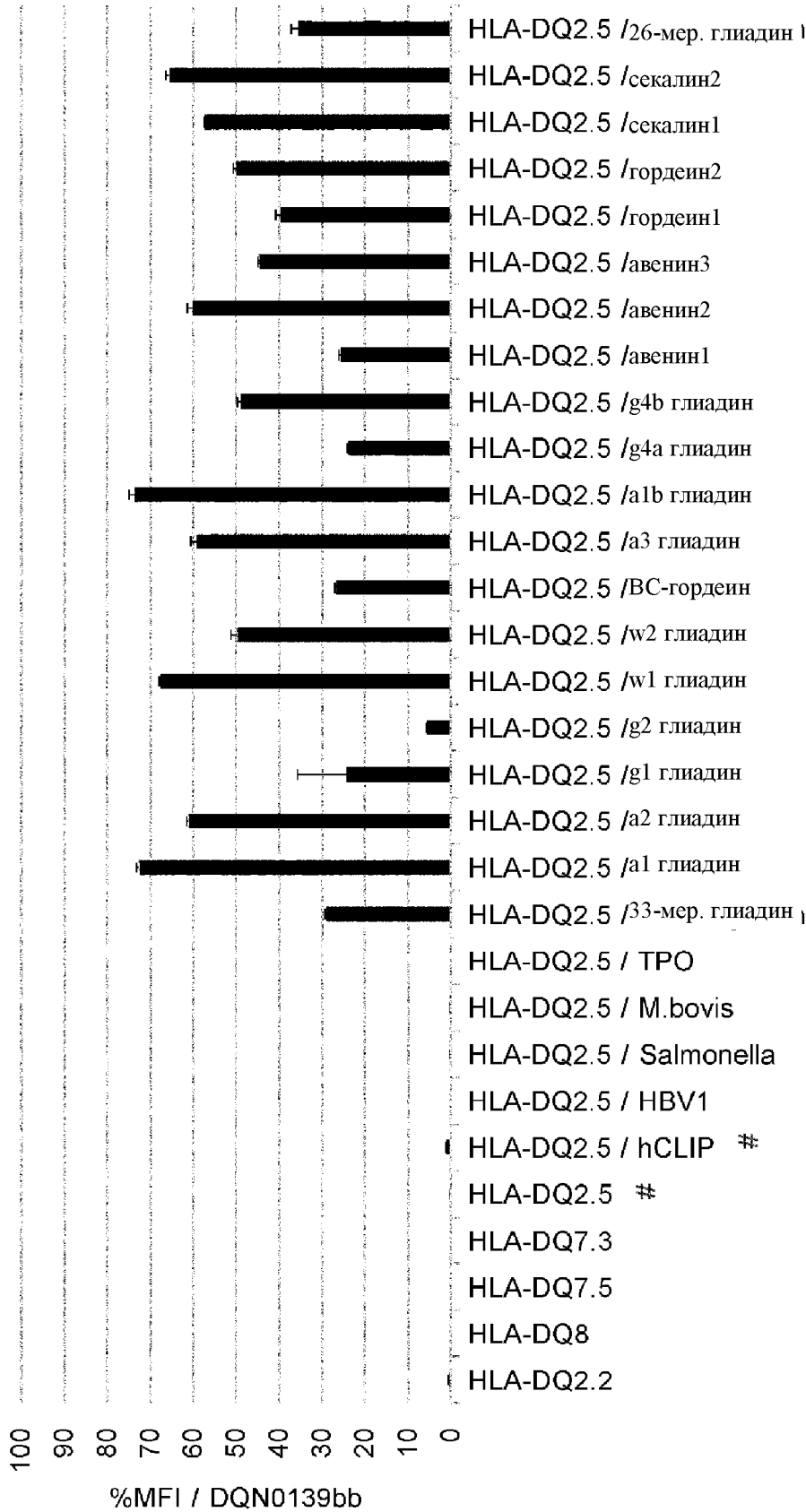
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1521/L0605-F6



Нерелевантные пептиды | Пептиды, имеющие происхождение из глютена

Фиг. 1-11

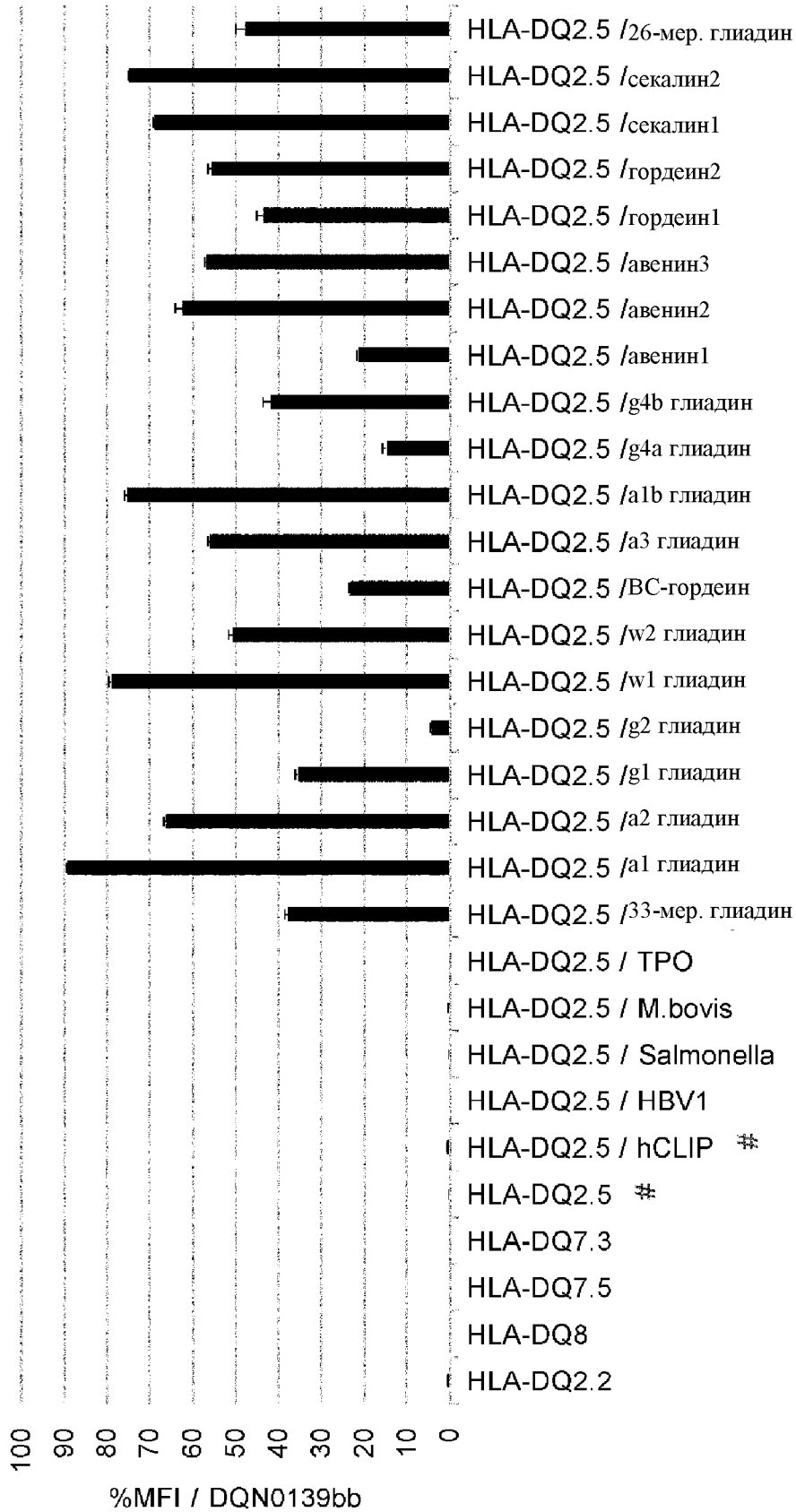
DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1353/L0681-F6



Нерелевантные пептиды | Пептиды, имеющие происхождение из глютена

Фиг. 1-12

DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1255/L0605-F6

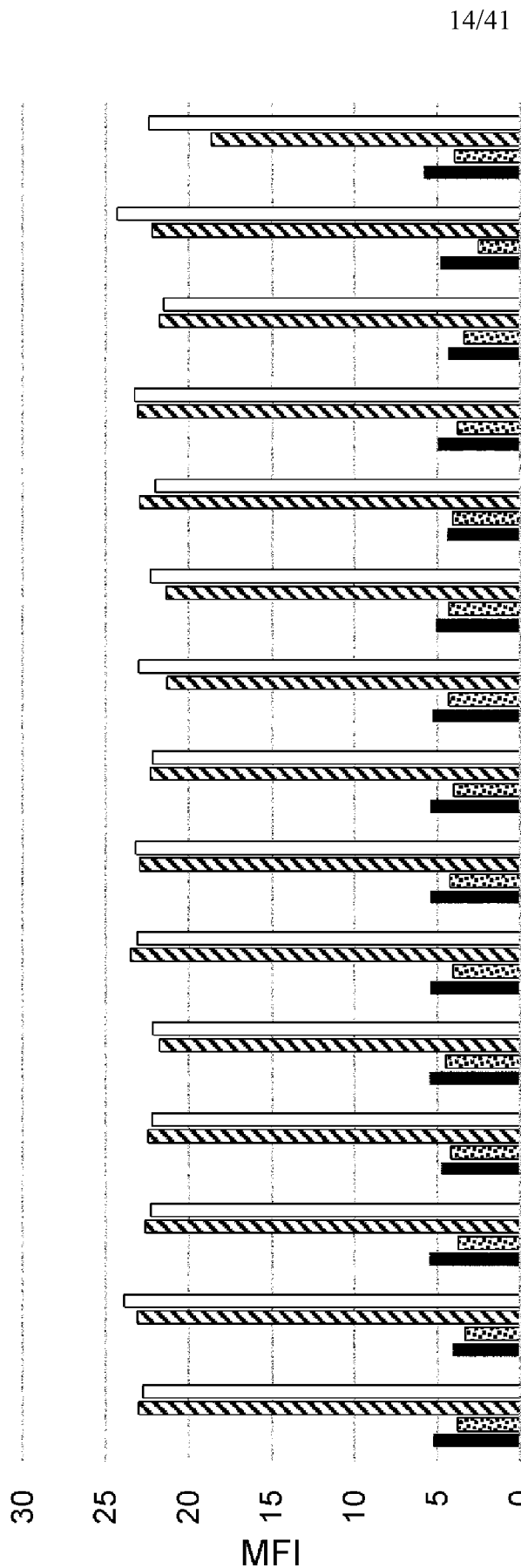


Пептиды, имеющие происхождение из глютена

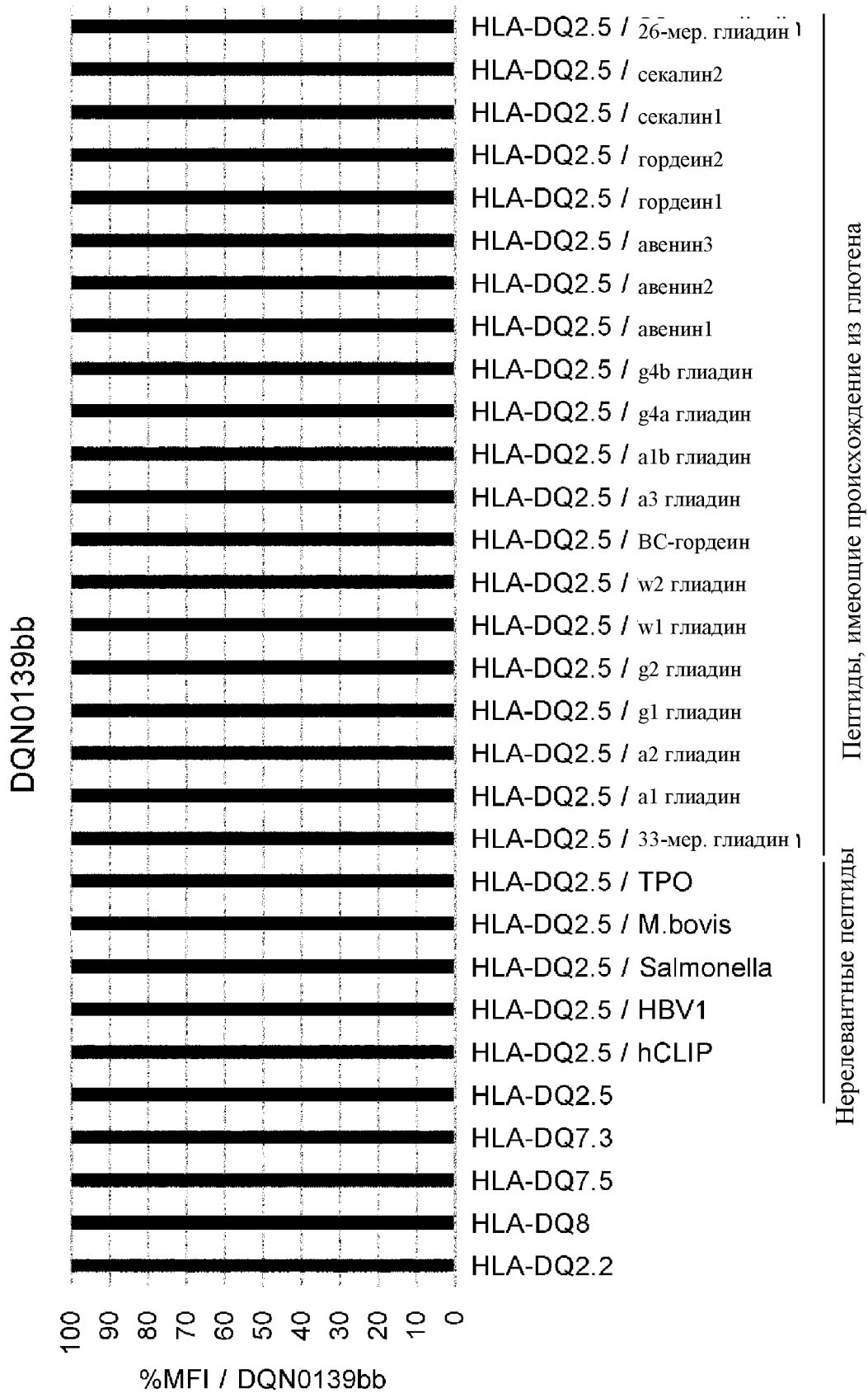
Нерелевантные пептиды

Фиг. 1-13

Связывание с HLA-DP, DR, DQ5.1, DQ6.3

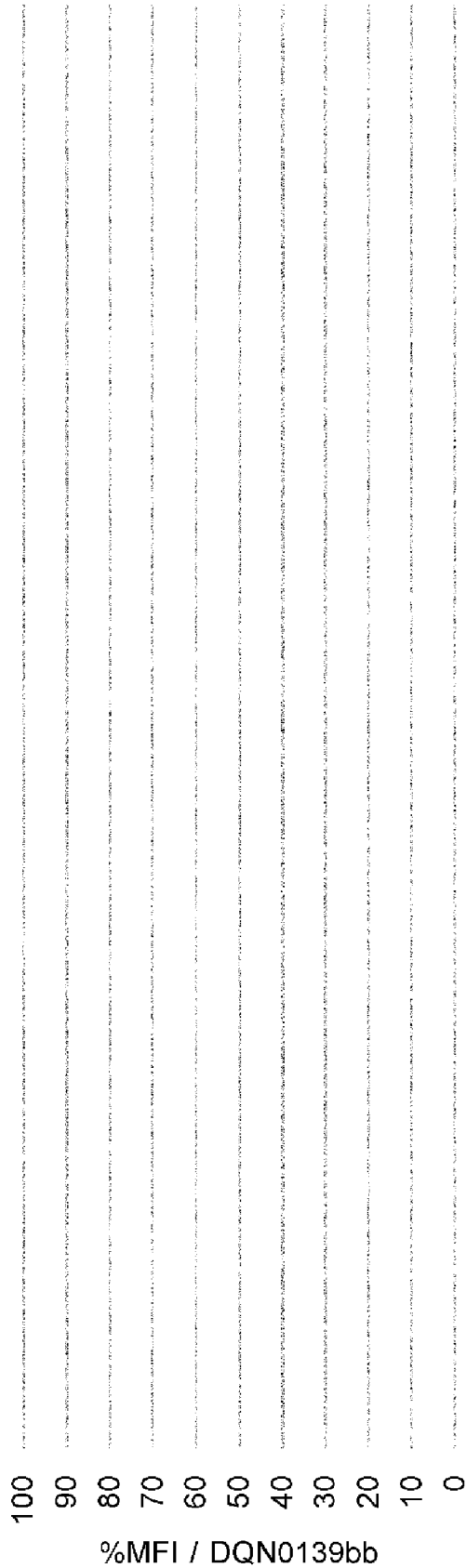


Фиг. 1-14



Фиг. 1-15

IC17dK

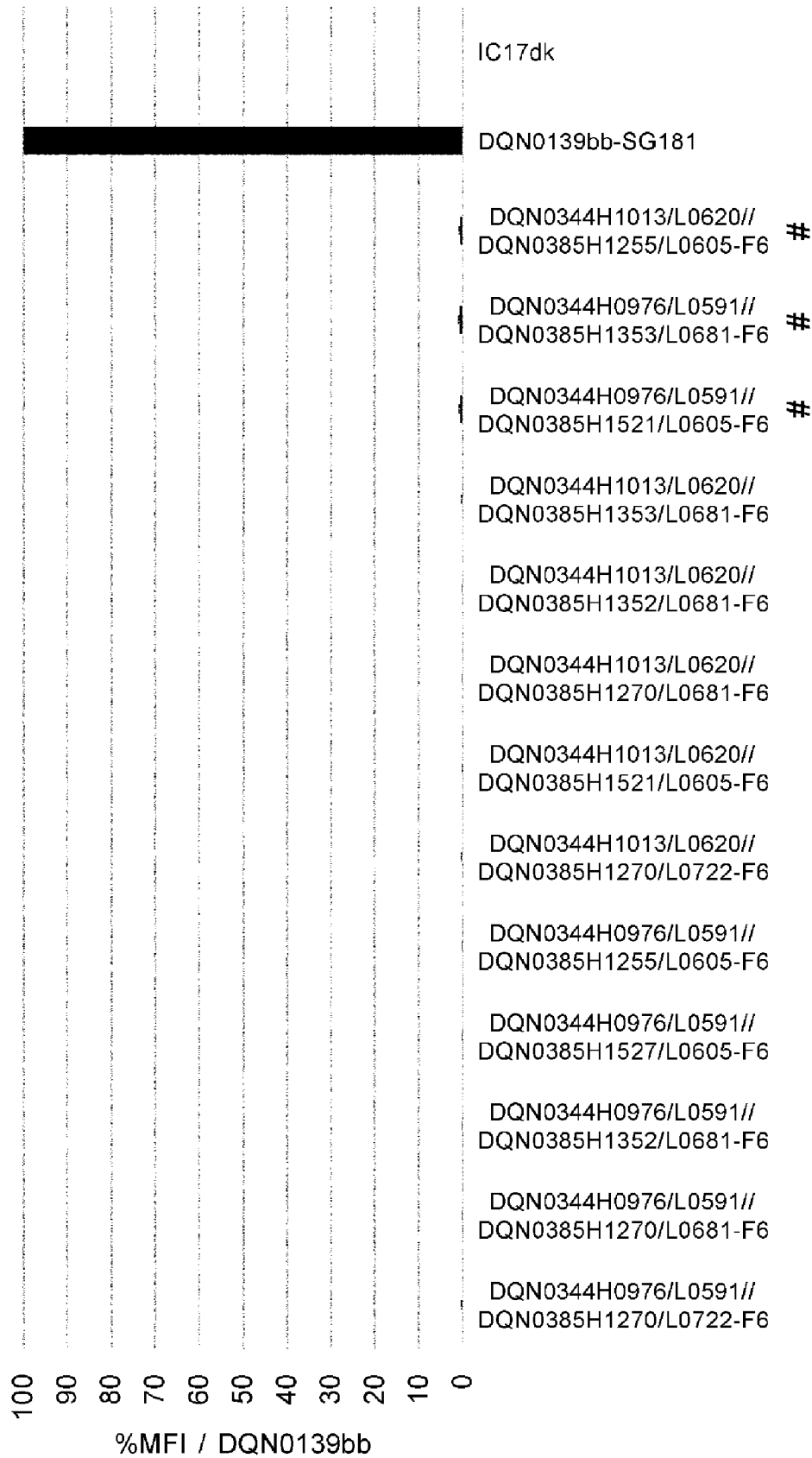


Пептиды, имеющие происхождение из глютена

Нерелевантные пептиды

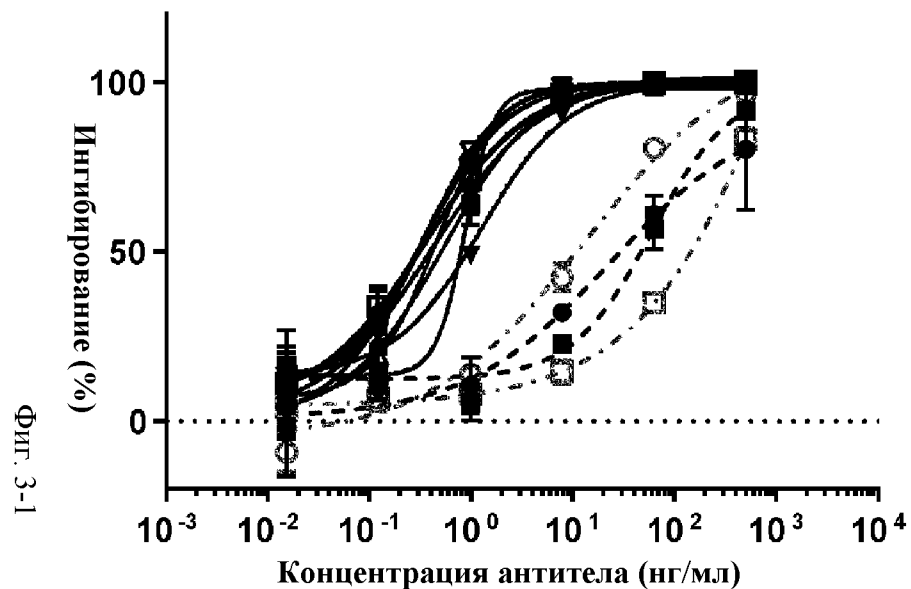
Фиг. 1-16

Связывание антитела с CD19⁺ В-клетками, полученными из РМБС



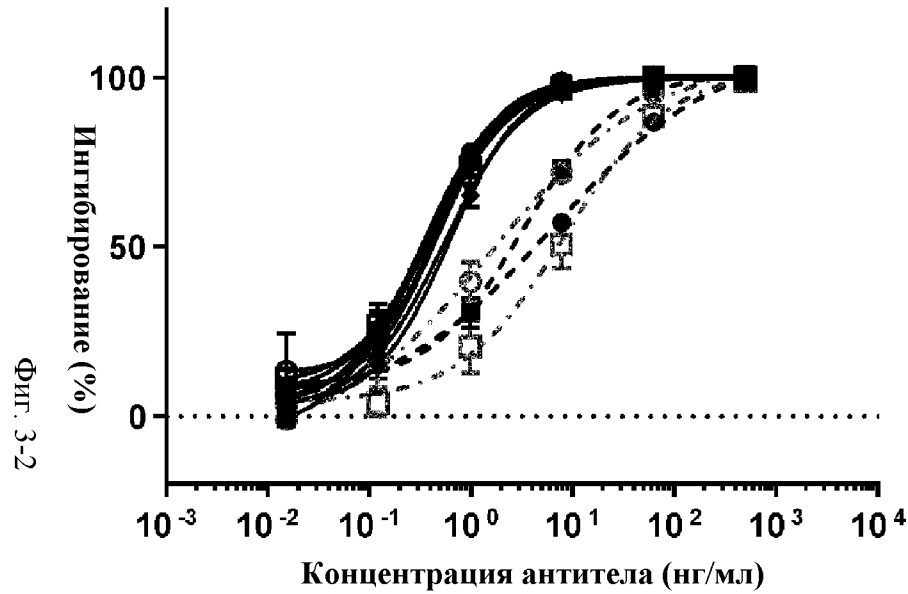
Фиг. 2

TCR, распознающий $\alpha 1$ глиадин



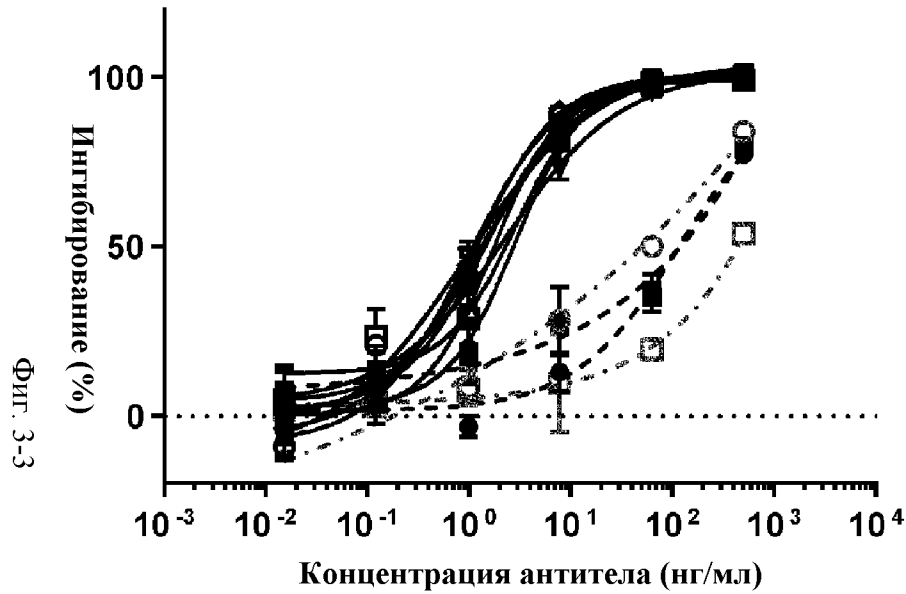
- DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6
- DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6
- ▲ DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6
- ▼ DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6
- ◆ DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6
- DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6
- DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6
- △ DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6
- ▽ DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6
- ◇ DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6
- DQN0344xx
- DQN0344xx//DQN0385ee
- DQN034425
- DQN034425//DQN0385ee0054

TCR, распознающий $\alpha 2$ глиадин



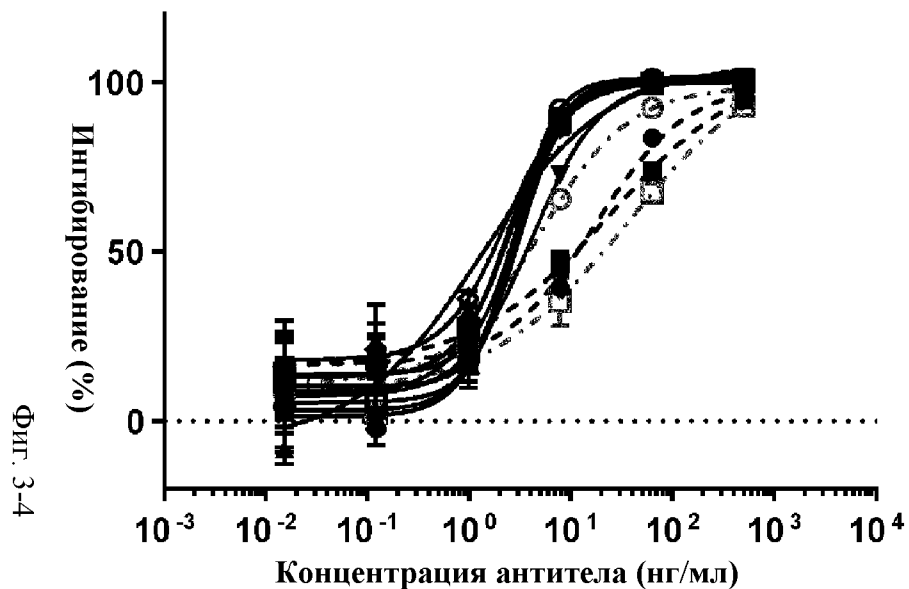
- DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6
- DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6
- ▲ DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6
- ▼ DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6
- ◆ DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6
- DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6
- DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6
- △ DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6
- ▽ DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6
- ◇ DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6
- DQN0344xx
- DQN0344xx//DQN0385ee
- DQN034425
- DQN034425//DQN0385ee0054

TCR, распознающий $\alpha 1b$ глиадин



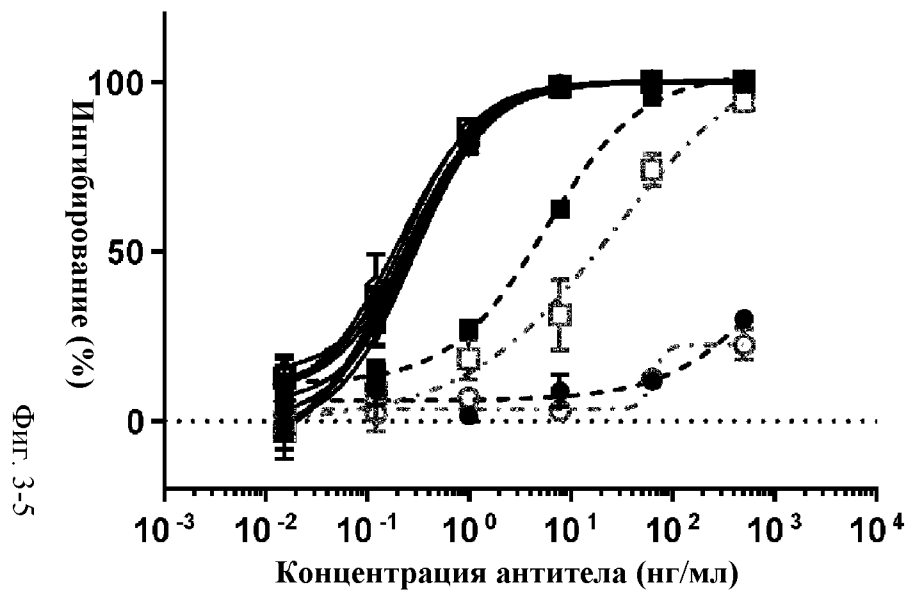
- DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6
- DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6
- ▲ DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6
- ▼ DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6
- ◆ DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6
- DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6
- DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6
- △ DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6
- ▽ DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6
- ◇ DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6
- DQN0344xx
- DQN0344xx//DQN0385ee
- DQN034425
- DQN034425//DQN0385ee0054

TCR, распознающий ω 1 глиадин



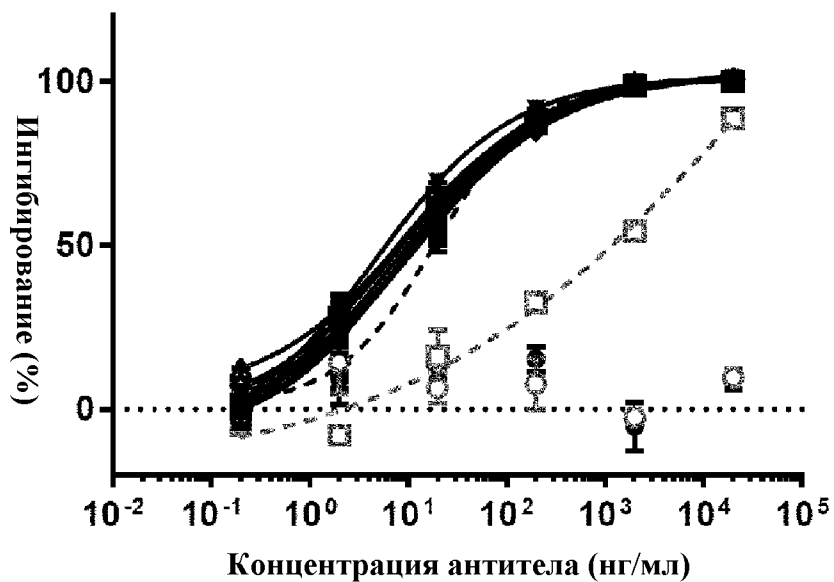
- DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6
- DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6
- ▲ DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6
- ▼ DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6
- ◆ DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6
- DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6
- DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6
- △ DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6
- ▽ DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6
- ◇ DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6
- DQN0344xx
- DQN0344xx//DQN0385ee
- DQN034425
- DQN034425//DQN0385ee0054

TCR, распознающий ω 2 глиадин



- DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6
- DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6
- ▲ DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6
- ▼ DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6
- ◆ DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6
- DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6
- DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6
- △ DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6
- ▽ DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6
- ◇ DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6
- DQN0344xx
- DQN0344xx//DQN0385ee
- DQN034425
- DQN034425//DQN0385ee0054

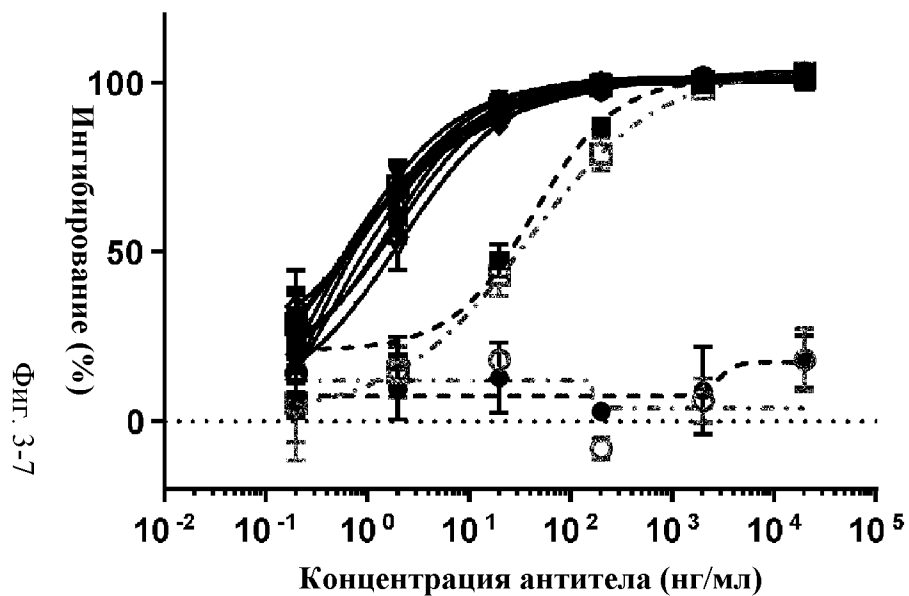
TCR, распознающий ВС-гордеин



- DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6
- DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6
- ▲ DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6
- ▼ DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6
- ◆ DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6
- DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6
- ▣ DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6
- △ DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6
- ▽ DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6
- ◇ DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6
- DQN0344xx
- DQN0344xx//DQN0385ee
- DQN034425
- ▣ DQN034425//DQN0385ee0054

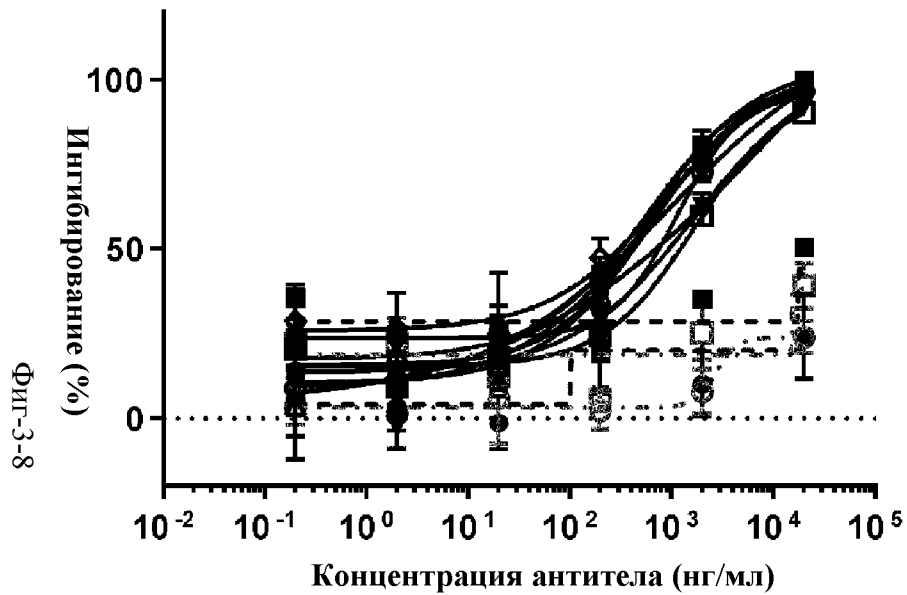
Фиг. 3-6

TCR, распознающий $\gamma 1$ глиадин



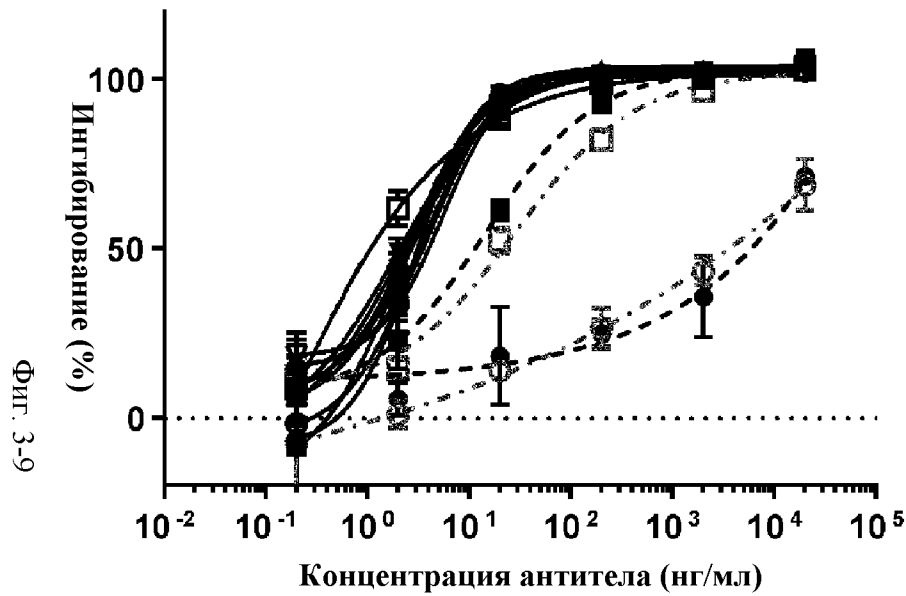
- DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6
- DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6
- ▲ DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6
- ▼ DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6
- ◆ DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6
- DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6
- ▣ DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6
- △ DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6
- ▽ DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6
- ◇ DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6
- DQN0344xx
- DQN0344xx//DQN0385ee
- DQN034425
- ▣ DQN034425//DQN0385ee0054

TCR, распознающий $\gamma 2$ глиадин



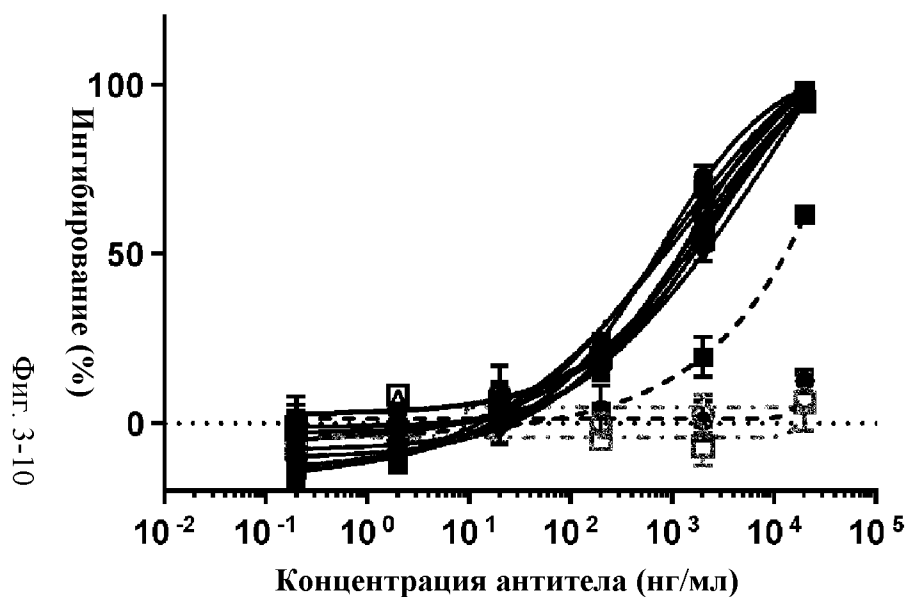
- DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6
- DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6
- ▲ DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6
- ▼ DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6
- ◆ DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6
- ⊖ DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6
- ⊞ DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6
- △ DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6
- ▽ DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6
- ◇ DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6
- · DQN0344xx
- · DQN0344xx//DQN0385ee
- ⊖ · DQN034425
- ⊞ · DQN034425//DQN0385ee0054

TCR, распознающий $\gamma 3$ глиадин



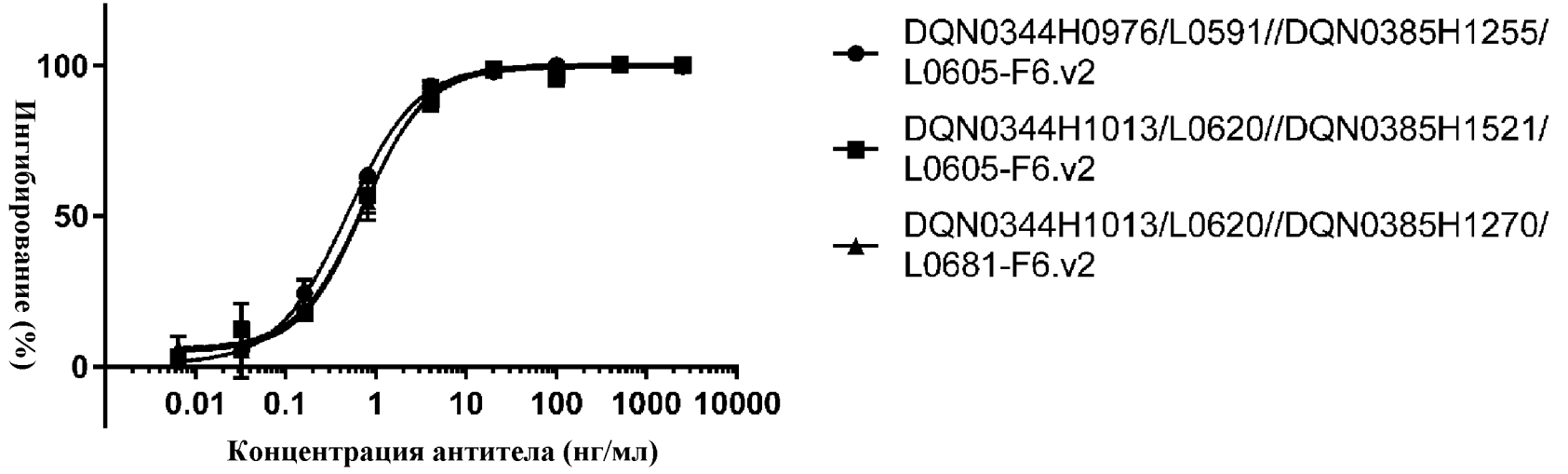
- DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6
- DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6
- ▲ DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6
- ▼ DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6
- ◆ DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6
- DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6
- DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6
- △ DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6
- ▽ DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6
- ◇ DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6
- DQN0344xx
- DQN0344xx//DQN0385ee
- DQN034425
- DQN034425//DQN0385ee0054

TCR, распознающий γ 4а глиадин



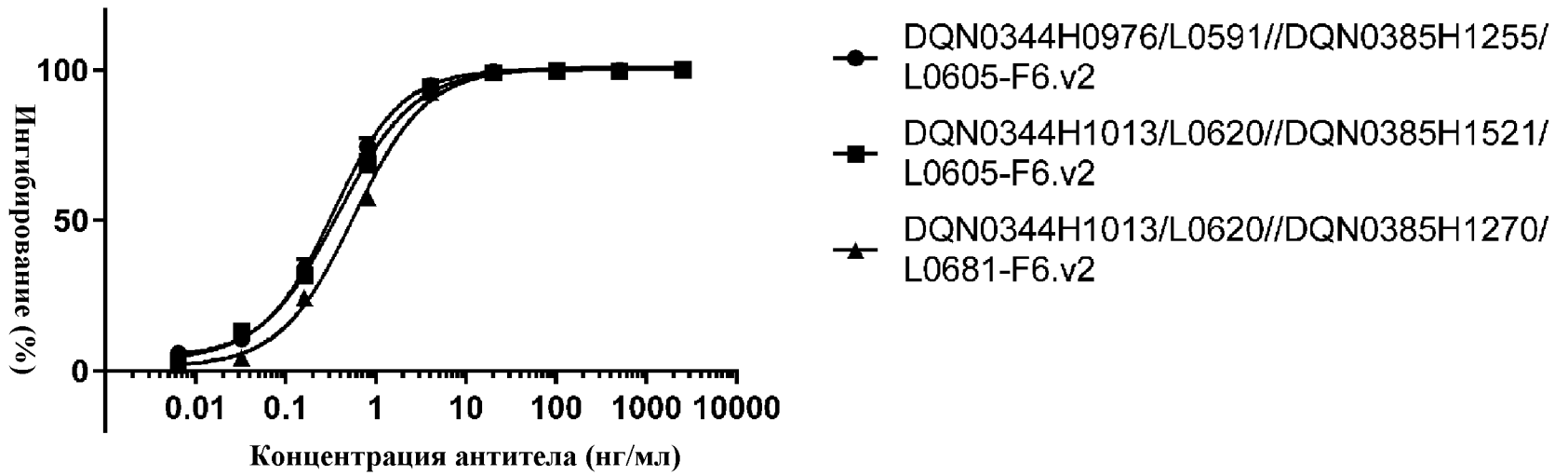
- DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0722-F6
- DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1270/L0681-F6
- ▲ DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1352/L0681-F6
- ▼ DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1527/L0605-F6
- ◆ DQN0344H0976/L0591//DQN0385H1255/L0605-F6
- DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0722-F6
- DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1521/L0605-F6
- △ DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1270/L0681-F6
- ▽ DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1352/L0681-F6
- ◇ DQN0344H1013/L0620//DQN0385H1353/L0681-F6
- DQN0344xx
- DQN0344xx//DQN0385ee
- DQN034425
- DQN034425//DQN0385ee0054

TCR, распознающий $\alpha 1$ глиадин



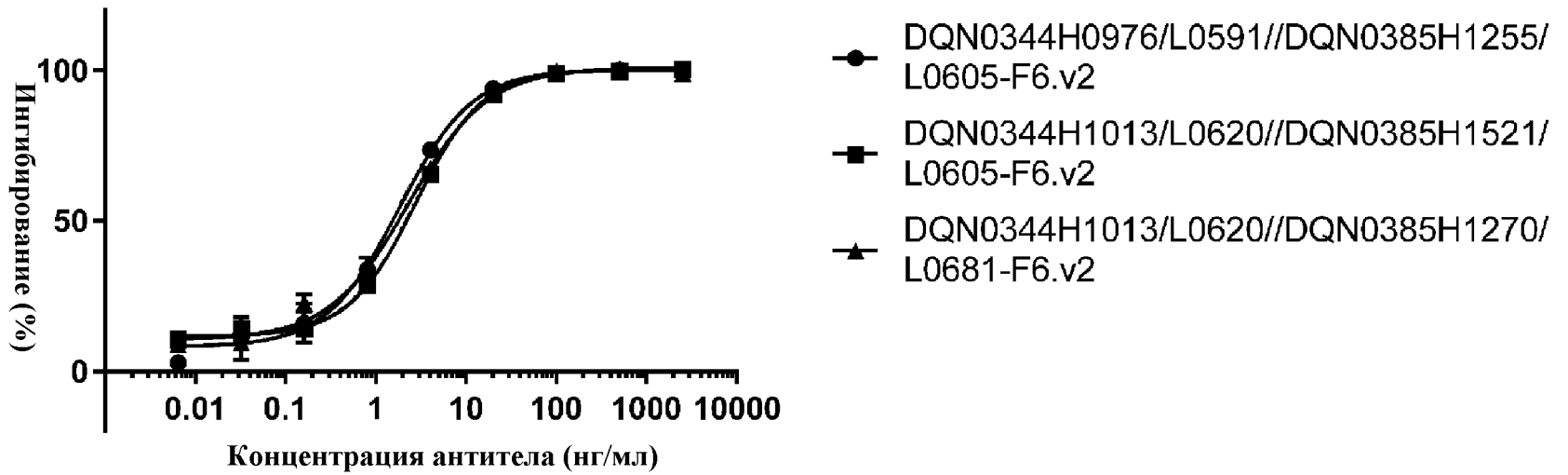
Фиг. 4-1

TCR, распознающий $\alpha 2$ глиадин



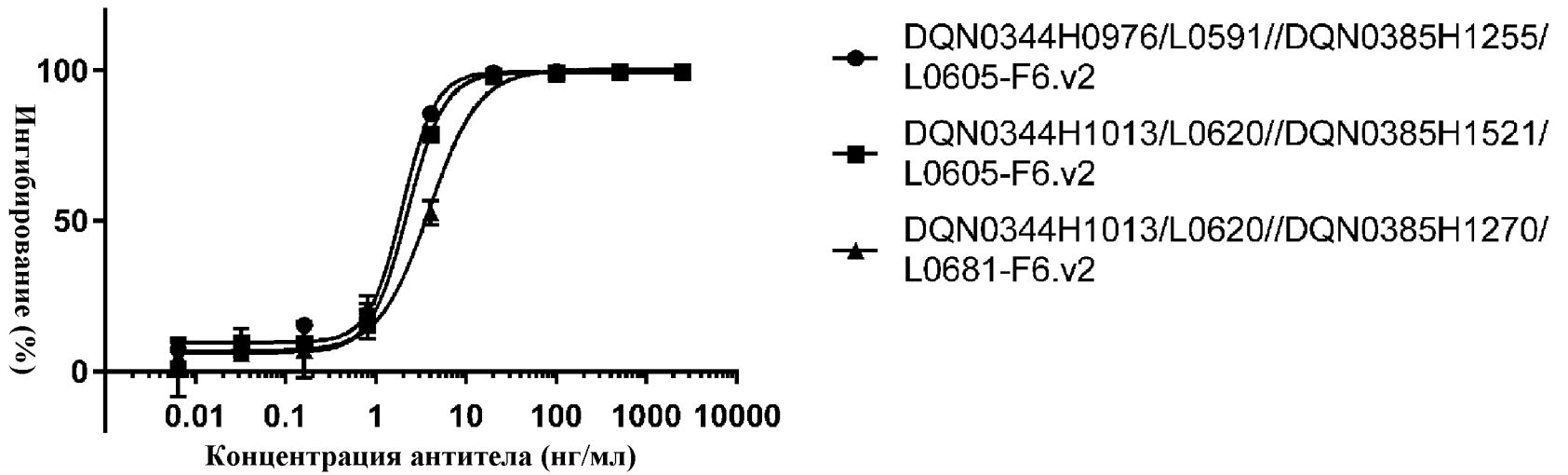
Фиг. 4-2

TCR, распознающий $\alpha 1b$ глиадин



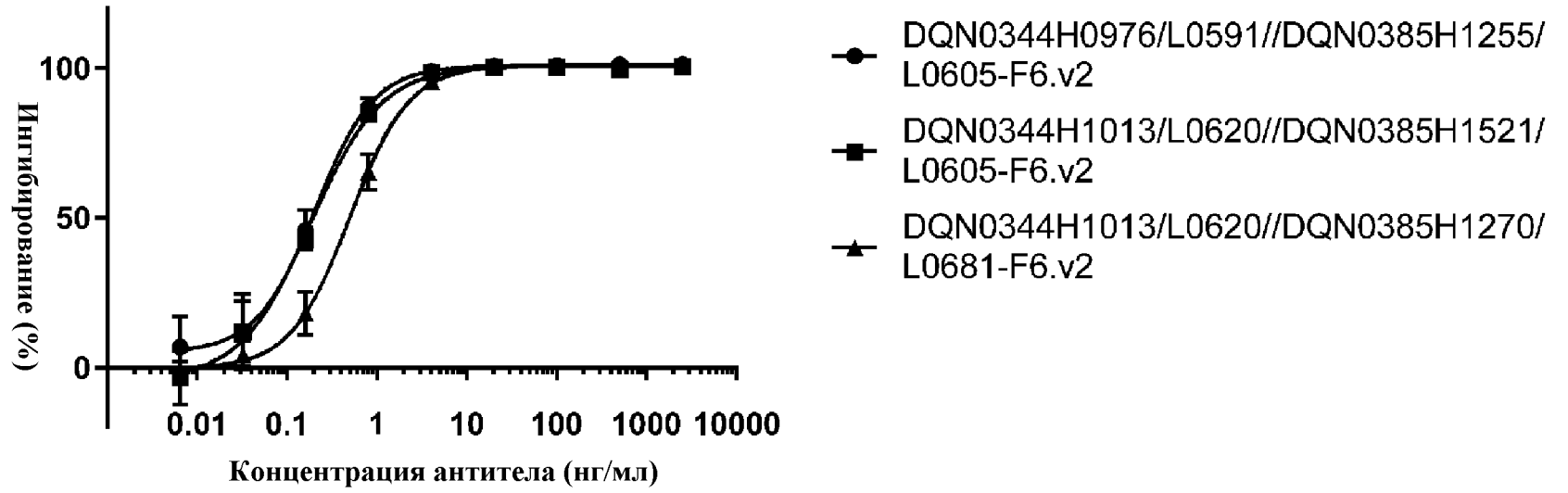
Фиг. 4-3

TCR, распознающий ω 1 глиадин



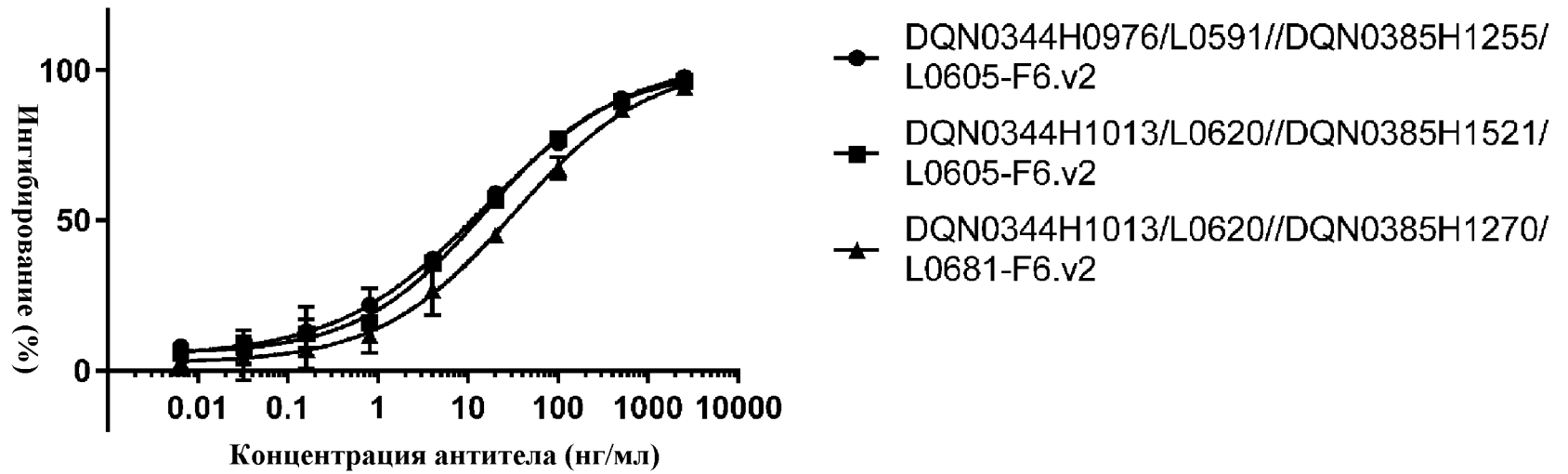
Фиг. 4-4

TCR, распознающий $\omega 2$ глиадин



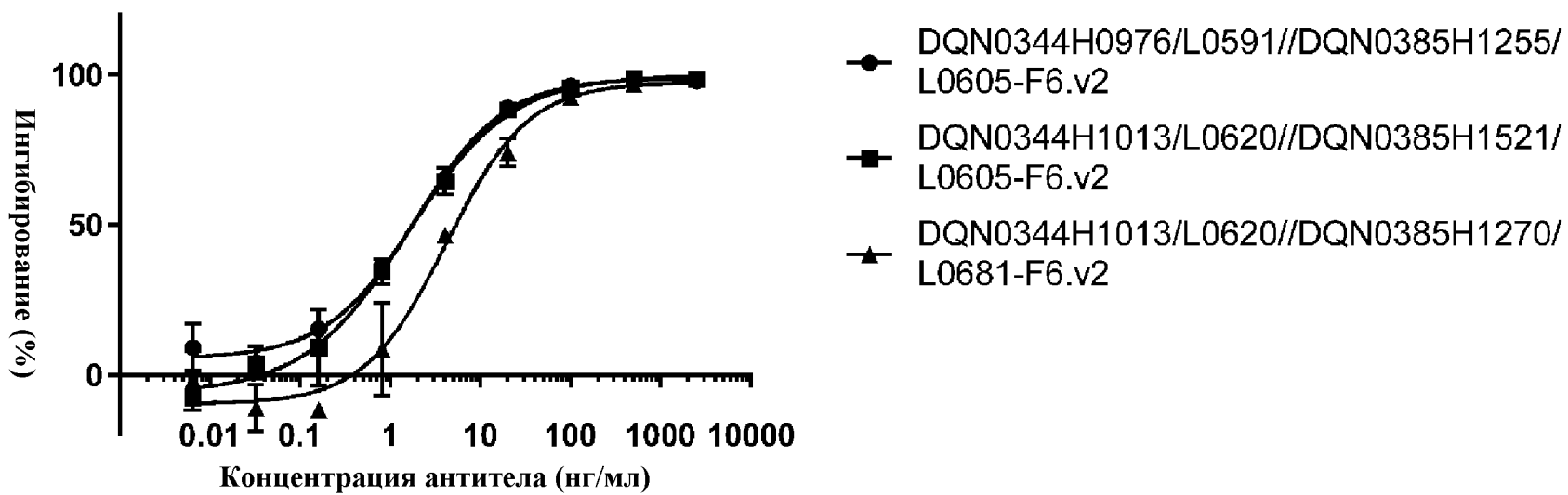
Фиг. 4-5

TCR, распознающий BC-гордеин



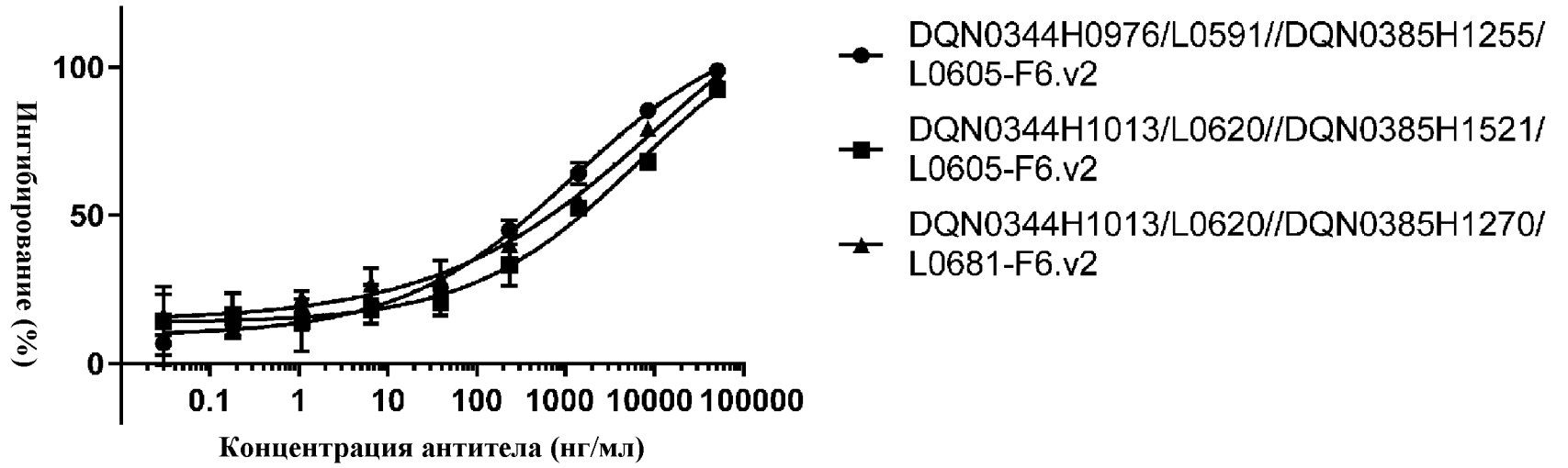
Фиг. 4-6

TCR, распознающий $\gamma 1$ глиадин



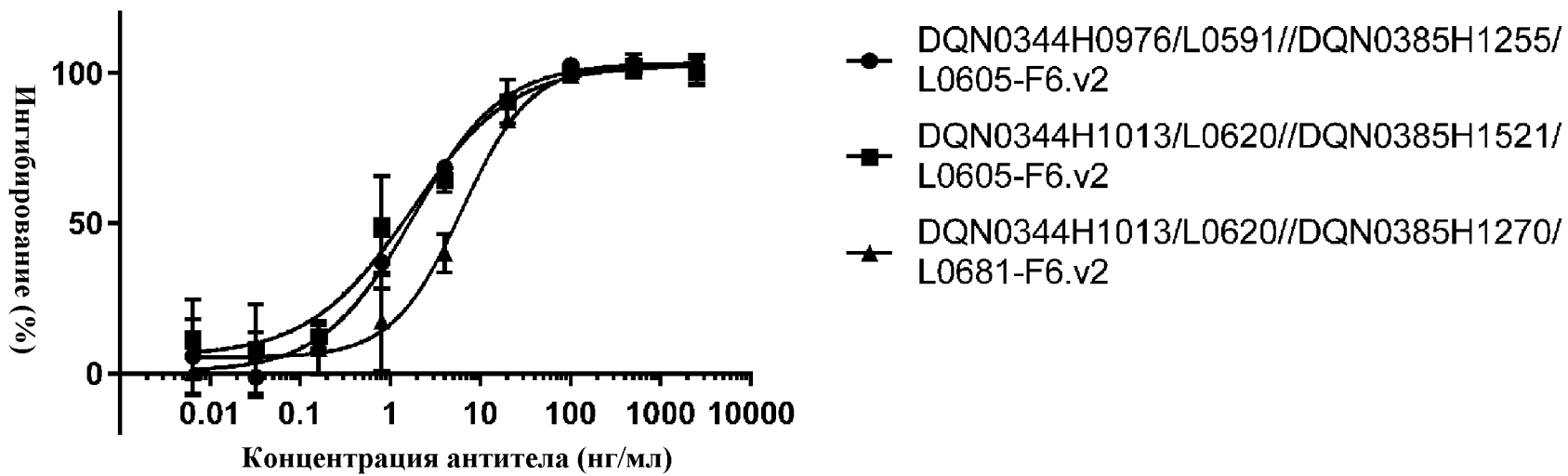
Фиг. 4-7

TCR, распознающий $\gamma 2$ глиадин



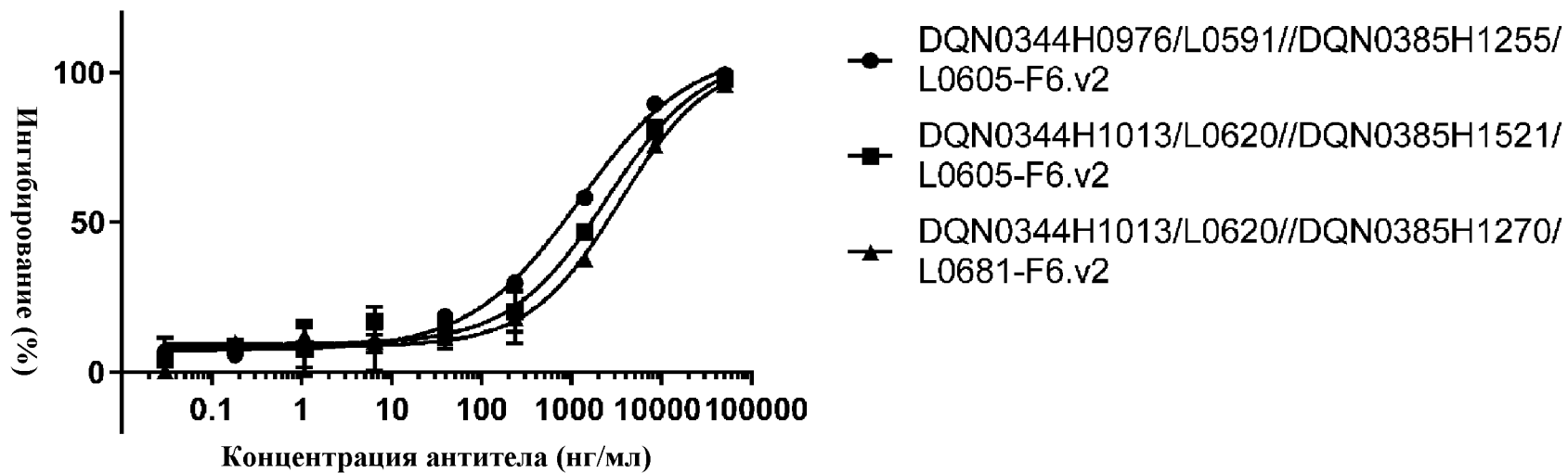
Фиг. 4-8

TCR, распознающий $\gamma 3$ глиадин



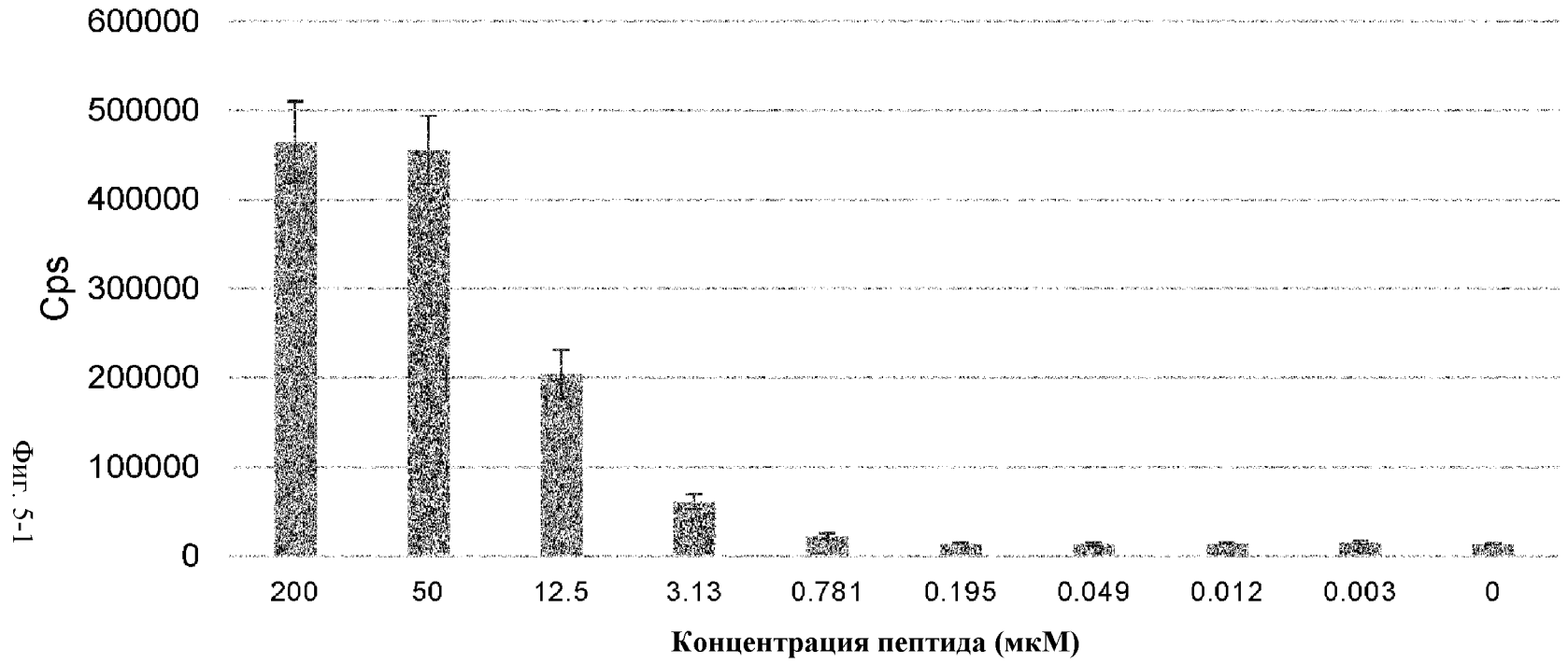
Фиг. 4-9

TCR, распознающий γ 4а глиадин



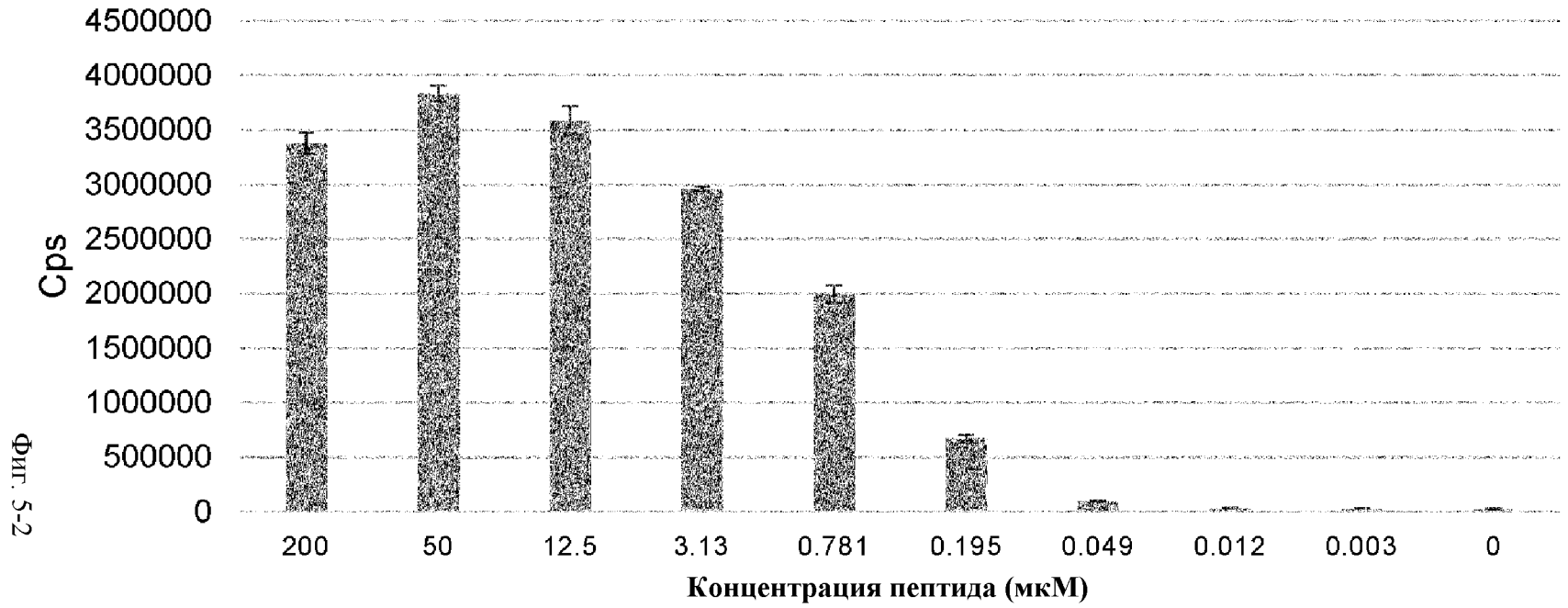
Фиг. 4-10

TCR, распознающий $\alpha 1$ а глиадин



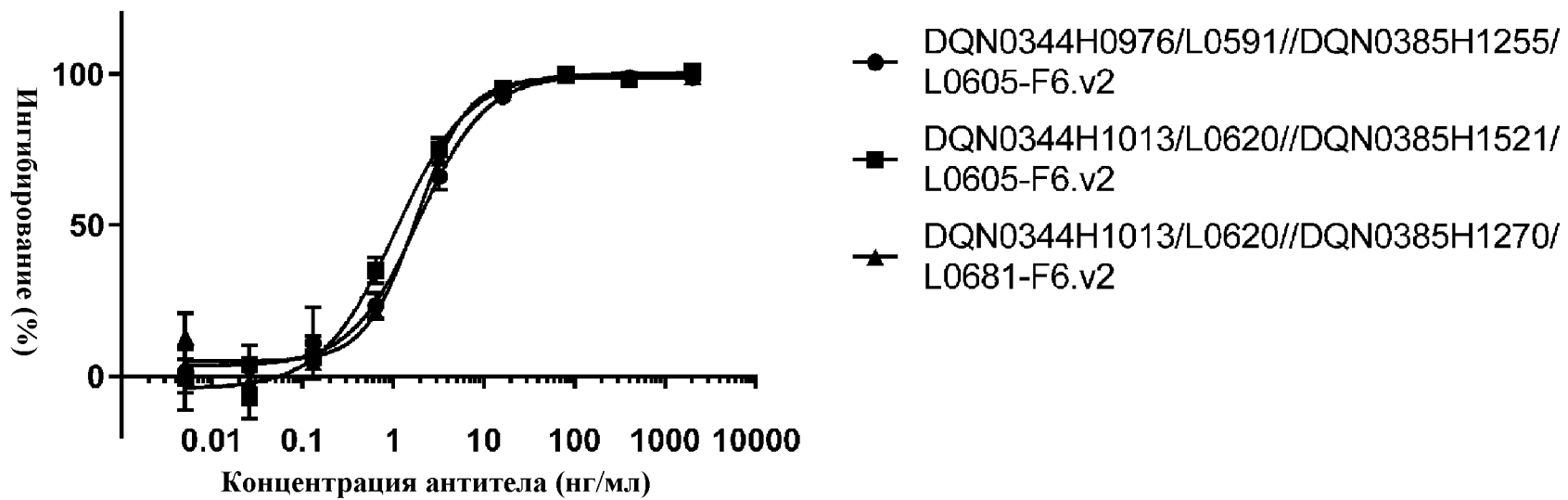
Фиг. 5-1

TCR, распознающий $\alpha 2$ глиадин



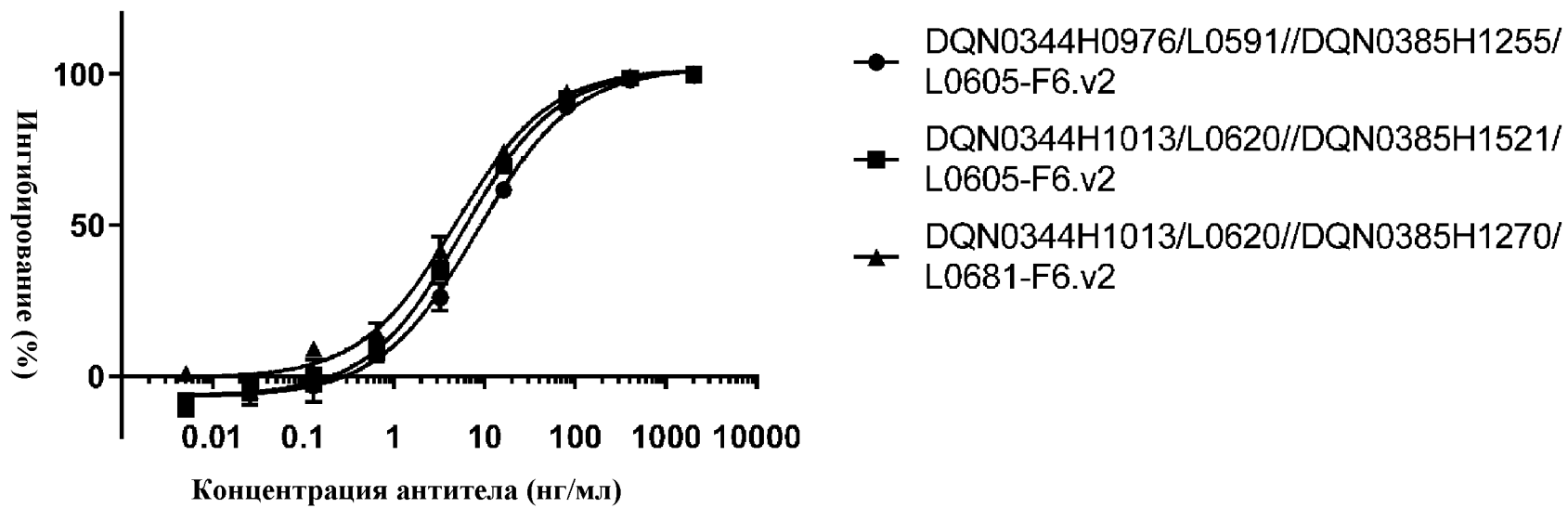
Фиг. 5-2

TCR, распознающий α 1a глиадин (HLA-DQ2.2)



Фиг. 5-3

TCR, распознающий $\alpha 2$ глиадин (HLA-DQ2.2)



Фиг. 5-4