

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391756** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.09.06

(22) Дата подачи заявки
2021.12.23

(51) Int. Cl. *C07K 16/18* (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 17/04 (2006.01)

(54) ПОЛИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА, ОБЛАДАЮЩИЕ СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ В ОТНОШЕНИИ IL-4R И IL-31

(31) **20216957.9**

(32) **2020.12.23**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2021/087561**

(87) **WO 2022/136669 2022.06.30**

(71) Заявитель:
НУМАБ ТЕРАПЬЮТИКС АГ (CH)

(72) Изобретатель:

Титц Джулия, Гунде Теа, Йоханссон Мария, Вармут Штефан (CH), Симонин Александр (FR), Хесс Кристиан (CH), Сиранси Норико, Аракава Йосио, Мияке Йосихиде (JP)

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

(57) Настоящее изобретение относится к полиспецифическим антителам, содержащим один или два связывающих домена, которые специфически связываются с IL-4R (IL4R-BD), и один или два связывающих домена, которые специфически связываются с IL-31 (IL31-BD), где полиспецифическое антитело содержит Fc-область иммуноглобулина. Настоящее изобретение дополнительно относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим указанное полиспецифическое антитело, вектору(векторам), содержащему указанные нуклеиновые кислоты, клетке-хозяину(клеткам-хозяевам), содержащей указанные нуклеиновые кислоты или указанный вектор(векторы), и к способу получения указанного полиспецифического антитела. Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим указанное полиспецифическое антитело, и способам их применения.

A1

202391756

202391756

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-578302EA/022

ПОЛИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА, ОБЛАДАЮЩИЕ СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ В ОТНОШЕНИИ IL-4R И IL-31

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0001] Настоящее изобретение относится к полиспецифическим антителам, содержащим один или два связывающих домена, которые специфически связываются с IL-4R (IL4R-BD), и один или два связывающих домена, которые специфически связываются с IL-31 (IL31-BD), где полиспецифическое антитело содержит Fc-область иммуноглобулина. Настоящее изобретение дополнительно относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим указанное полиспецифическое антитело, вектору(векторам), содержащему указанные нуклеиновые кислоты, клетке-хозяину(клеткам-хозяевам), содержащей указанные нуклеиновые кислоты или указанный вектор(векторы), и к способу получения указанного полиспецифического антитела. Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим указанное полиспецифическое антитело, и способам их применения.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Рецептор интерлейкина-4 IL-4R α , также называемый здесь IL-4R или IL4R, представляет собой рецептор типа I. Он связывает интерлейкин 4 (IL-4) либо при прямом взаимодействии с общей гамма-цепью (γ c) цитокинового рецептора, либо путем образования рецепторных комплексов с рецепторами типа II, такими как, в частности, с рецептором типа II IL-13R α 1. Этот рецепторный комплекс IL-4R/IL-13R α 1 может связывать интерлейкин 4 (IL-4), а также интерлейкин 13 (IL-13), чтобы регулировать выработку антител IgE в В-клетках. Кроме того, известно, что связывание IL-4 с IL-4R активирует макрофаги и способствует дифференцировке хелперных Т-клеток 2 типа (клеток Th2), что приводит к воспалению, вызванному Th2. Связывание IL-4 и/или IL-13 с IL-4R α / γ c и/или IL-4R/IL-13R α 1 приводит к активации янус-киназы (JAK)1, JAK2, преобразователя сигнала и активатора транскрипции (STAT)1, STAT3, STAT6 и димеризации STAT, которая, в свою очередь, индуцирует транскрипцию специфических генов.

[0003] Было показано, что передача сигналов IL-4R связана с рядом заболеваний человека, таких как воспалительные и аутоиммунные заболевания, включая атопический дерматит, узловатое пруриго, полипоз носа, хроническую крапивницу, астму и хроническую обструктивную болезнь легких.

[0004] В предшествующем уровне техники для лечения таких заболеваний было описано несколько моноклональных антител, которые снижают или блокируют опосредованную IL4R передачу сигналов путем связывания цитокинов IL-4 и/или IL-13 с IL-4R. Например, дупилумаб (Dupixent®), разработанный Regeneron Pharmaceuticals и Sanofi Genzyme, который связывается с IL-4R и противодействует ему, был одобрен для лечения атопического дерматита средней и тяжелой степени и для лечения хронического риносинусита с полипозом носа (CRSwNP). Он также оценивается для лечения

персистирующей астмы у взрослых и подростков.

[0005] Атопический дерматит (AD) - хроническое воспалительное заболевание кожи, характеризующееся интенсивным зудом (например, сильным зудом) и шелушащимися и сухими экзематозными поражениями. Тяжелое заболевание может быть чрезвычайно инвалидизирующим из-за серьезных психологических проблем, значительной потери сна и ухудшения качества жизни, что приводит к высоким социально-экономическим издержкам. AD часто начинается в детстве до 5 лет и может сохраняться во взрослом возрасте.

[0006] На патофизиологию AD влияет сложное взаимодействие между опосредованной иммуноглобулином E (IgE) сенсibilизацией, иммунной системой и факторами окружающей среды. Первичный дефект кожи может быть иммунологическим нарушением, вызывающим IgE-опосредованную сенсibilизацию, с дисфункцией эпителиального барьера, которая является следствием как генетических мутаций, так и локального воспаления.

[0007] Типичные методы лечения AD включают местные лосьоны и увлажняющие средства, местные кортикостероидные мази, кремы или инъекции. Однако большинство вариантов лечения предлагают лишь временное, неполное облегчение симптомов. Кроме того, многие пациенты со среднетяжелой и тяжелой формами AD становятся резистентными к лечению местными кортикостероидами или ингибиторами кальциневрина. Поэтому были разработаны более целенаправленные методы лечения и/или профилактики AD, такие как моноклональные антитела против IL4R, которые противодействуют функции IL4R.

[0008] Например, в WO 2014/039461 описаны антагонистические антитела против IL4R для применения при лечении атопического дерматита.

[0009] Кроме того, как уже указывалось выше, моноклональное антитело против IL-4R дупилумаб (Dupixent®) получило одобрение Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США для лечения атопического дерматита средней и тяжелой степени в 2017 году и для лечения астмы в 2018 году.

[0010] Однако анти-IL-4R-терапия имеет существенные ограничения. Например, ее эффективность при интересующих атопических заболеваниях часто ограничена, а частота ответа часто бывает низкой или умеренной. Кроме того, анти-IL-4R-терапия не устраняет зуд напрямую. Зуд, однако, является частым симптомом кожных воспалительных и аутоиммунных заболеваний, таких как атопический дерматит. Связанное с зудом расчесывание обычно способствует воспалению и ухудшению симптомов, связанных с заболеванием. Таким образом, существует острая необходимость в дополнительных вариантах лечения для пациентов с атопическим дерматитом средней и тяжелой степени и другими вызывающими зуд воспалительными и аутоиммунными расстройствами.

[0011] В частности, существует явная потребность в новых и улучшенных терапевтических антителах, способных более эффективно снижать или устранять сигнальную активность, опосредованную IL-4 и/или IL-13, при указанных аллергических,

воспалительных и аутоиммунных заболеваниях, а также устранять симптомы зуда (зуд), связанные с этими заболеваниями.

[0012] Указанные терапевтические антитела должны обладать высокой эффективностью, а также приемлемым профилем безопасности, чтобы поддерживать ограничивающие дозу побочные эффекты на низком уровне. Это особенно важно в случае лечения хронических заболеваний, которые обычно требуют длительного применения указанных терапевтических антител. Кроме того, желательно, чтобы указанные терапевтические антитела обладали превосходными биофизическими свойствами, такими как высокая стабильность, для облегчения разработки и производства с высокими выходами. В частности, они должны иметь хорошую стабильность при хранении при высоких концентрациях, чтобы позволить приготовление высококонцентрированных составов для применения для подкожных инъекций. Подкожная инъекция крайне желательна и является необходимой предпосылкой для того, чтобы пациенты могли сами применять лекарство.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0013] Целью настоящего изобретения является создание лекарственного средства для улучшения лечения аллергических, воспалительных и аутоиммунных заболеваний, в частности, создание нового, превосходного способа лечения воспалительных и аутоиммунных заболеваний, вызывающих зуд, таких как атопический дерматит средней и тяжелой степени. Более конкретно, целью настоящего изобретения является предложение новых и улучшенных терапевтических антител, которые способны эффективно снижать или устранять IL-4- и IL-13-опосредованную активность при указанных заболеваниях, а также способны устранять симптомы зуда, связанные с этими заболеваниями. Еще одной целью настоящего изобретения является то, что указанные новые и улучшенные терапевтические антитела проявляют высокую стабильность при концентрациях белка выше 100 мг/мл, что позволяет применять их путем подкожной инъекции.

[0014] Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что полиспецифические антитела, содержащие один или два антагонистических связывающих домена IL-4R (IL4R-BD) и один или два нейтрализующих связывающих домена IL-31 (IL31-BD), могут одновременно блокировать IL-4-/IL-13-, а также IL-31-индуцированную передачу сигналов высокоэффективным образом, что позволяет одновременно уменьшить симптомы, связанные с IL-4-/IL-13, а также активность IL-31, связанную с зудом.

[0015] Кроме того, авторы изобретения неожиданно обнаружили путем тестирования многих различных форматов антител, что указанные полиспецифические антитела против IL-4RxIL-31, содержащие функциональную Fc-область, в частности, область IgG, содержащую функциональную Fc-область, могут блокировать IL-4- и IL-13-индуцированную передачу сигналов еще лучше и обладают очень выгодными биофизическими свойствами, в частности, выдающейся стабильностью, которая позволяет получать стабильные при хранении составы для концентраций антител намного выше 100 мг/мл. Протестированные форматы, которые не проявляли желаемых комбинированных

свойств, то есть желаемой высокой эффективности ингибирования и в то же время желаемой высокой стабильности при хранении, были, в частности, МАТСНЗ, scМАТСНЗ, (scFv)₂Fc(scFv)₂ и Morrison IgG1 (молчашие). Эти полиспецифические форматы антител интенсивно изучались. Протестированные полиспецифические антитела на основе МАТСНЗ и scМАТСНЗ продемонстрировали хорошую стабильность, но не обладали эффективностью в отношении ингибирования IL-4R- и IL-31-опосредованной передачи сигналов. Протестированные полиспецифические антитела на основе (scFv)₂Fc(scFv)₂ продемонстрировали повышенную эффективность ингибирования, но были лишь умеренно стабильными при хранении в концентрациях выше 100 мг/мл в течение более длительных периодов времени. С другой стороны, протестированные молчашие полиспецифические антитела на основе IgG1 Morrison продемонстрировали превосходную стабильность при хранении при высоких концентрациях, но не полностью достигли желаемой эффективности ингибирования. Был сделан вывод, что функциональная Fc-область, в частности, функциональная область IgG, необходима для желаемой эффективности ингибирования.

[0016] Соответственно, в первом аспекте настоящее изобретение относится к полиспецифическим антителам, содержащим:

а) один или два связывающих домена, которые специфически связываются с IL-4R (IL4R-BD), и

б) один или два связывающих домена, которые специфически связываются с IL-31 (IL31-BD),

где полиспецифическое антитело содержит Fc-область иммуноглобулина, в частности, область IgG.

[0017] Во втором аспекте настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте или двум нуклеиновым кислотам, кодирующим полиспецифическое антитело по настоящему изобретению.

[0018] В третьем аспекте настоящее изобретение относится к вектору или двум векторам, содержащим нуклеиновую кислоту или две нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению.

[0019] В четвертом аспекте настоящее изобретение относится к клетке-хозяину или клеткам-хозяевам, содержащим вектор или два вектора по настоящему изобретению.

[0020] В пятом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения полиспецифического антитела по настоящему изобретению, включающему (i) получение нуклеиновой кислоты или двух нуклеиновых кислот по настоящему изобретению, или вектора, или двух векторов по настоящему изобретению, экспрессию указанной нуклеиновой кислоты или указанных двух нуклеиновых кислот, или указанного вектора или векторов, и сбор указанного полиспецифического антитела из системы экспрессии, или (ii) получение клетки-хозяина или клеток-хозяев по настоящему изобретению, культивирование указанной клетки-хозяина или указанных клеток-хозяев; и сбор указанного полиспецифического антитела из клеточной культуры.

[0021] В шестом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической

композиции, содержащей полиспецифическое антитело по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

[0022] В седьмом аспекте настоящее изобретение относится к полиспецифическим антителам по настоящему изобретению для применения в качестве лекарственного средства.

[0023] В восьмом аспекте настоящее изобретение относится к полиспецифическому антителу по настоящему изобретению для применения при лечении заболевания, в частности, заболевания человека, более конкретно заболевания человека, выбранного из аллергических, воспалительных и аутоиммунных заболеваний, в частности, воспалительных и аутоиммунных заболеваний.

[0024] В девятом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания, в частности, заболевания человека, более конкретно заболевания человека, выбранного из аллергических, воспалительных и аутоиммунных заболеваний, в частности, воспалительных и аутоиммунных заболеваний, включающему стадию введения полиспецифического антитела по настоящему изобретению пациенту.

[0025] Аспекты, полезные признаки и предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, обобщенные в следующих пунктах, соответственно по отдельности или в комбинации, дополнительно способствуют решению задачи изобретения:

1. Полиспецифическое антитело, содержащее:

а) один или два связывающих домена, которые специфически связываются с IL-4R (IL4R-BD), в частности, два идентичных IL4R-BD, и

б) один или два связывающих домена, которые специфически связываются с IL-31 (IL31-BD), в частности, два идентичных IL31-BD,

где полиспецифическое антитело содержит Fc-область иммуноглобулина, в частности, функциональную Fc-область.

2. Полиспецифическое антитело по пункту 1, где

- каждый из указанных IL4R-BD содержит последовательность HCDR1 SEQ ID NO: 1, последовательности HCDR2 SEQ ID NO: 2, последовательность HCDR3 SEQ ID NO: 3, последовательность LCDR1 SEQ ID NO: 7, последовательность LCDR2 SEQ ID NO: 8, и последовательности LCDR3 SEQ ID NO: 9; и

- каждый из указанных IL31-BD содержит последовательность HCDR1 SEQ ID NO: 12, последовательность HCDR2 SEQ ID NO: 13, последовательности HCDR3 SEQ ID NO: 14, последовательность LCDR1 SEQ ID NO: 17 или 18, последовательность LCDR2 SEQ ID NO: 19, и

последовательности LCDR3 SEQ ID NO: 20.

3. Полиспецифическое антитело по пункту 1 или 2, где формат указанного полиспецифического антитела выбран из слияния (scFv)₂-Fc-(scFv)₂ (ADAPTIR); DVD-Ig; DARTTM и TRIDENTTM.

4. Полиспецифическое антитело по пункту 1 или 2, где полиспецифическое антитело содержит область IgG.

5. Полиспецифическое антитело по пункту 4, где формат указанного полиспецифического антитела выбран из форматов двухвалентного биспецифического IgG, форматов трехвалентного биспецифического IgG и форматов четырехвалентного биспецифического IgG;

в частности, формат указанного полиспецифического антитела выбран из IgG на основе KiH; DVD-Ig; Слияния IgG-scFv, такого как CODV-IgG, Morrison (слияние IgG CH3-scFv (Morrison-H) или слияние IgG CL-scFv (Morrison-L)), bsAb (scFv, связанный с C-концом легкой цепи), Bs1Ab (scFv, связанный с N-концом легкой цепи), Bs2Ab (scFv, связанный с N-концом тяжелой цепи), Bs3Ab (scFv, связанный с C-концом тяжелой цепи), Ts1Ab (scFv, связанный с N-концом обеих тяжелых цепей и легкой цепи) и Ts2Ab (dsscFv, связанный с C-концом тяжелой цепи);

более конкретно, формат указанного полиспецифического антитела выбран из IgG на основе KiH; DVD-Ig; CODV-IgG и Morrison (слияние IgG CH3-scFv (Morrison-H) или слияние IgG CL-scFv (Morrison-L)), особенно из DVD-Ig и Morrison (слияние IgG CH3-scFv (Morrison-H) или слияние IgG CL-scFv (Morrison-L)).

6. Полиспецифическое антитело по пункту 5, где формат указанного полиспецифического антитела выбран из форматов Morrison.

7. Полиспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов, где указанное полиспецифическое антитело содержит два IL4R-BD.

8. Полиспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов, где указанное полиспецифическое антитело содержит два IL31-BD.

9. Полиспецифическое антитело по пункту 1, где указанное полиспецифическое антитело содержит:

а) два связывающих домена, которые специфически связываются с IL-4R (IL4R-BD),
и

б) два связывающих домена, которые специфически связываются с IL-31 (IL31-BD), где указанное полиспецифическое антитело содержит область IgG, в частности, формат полиспецифического антитела выбран из формата Morrison;

и где

- каждый из указанных IL4R-BD содержит последовательность HCDR1 SEQ ID NO: 1, последовательности HCDR2 SEQ ID NO: 2, последовательности HCDR3 SEQ ID NO: 3, последовательности LCDR1 SEQ ID NO: 7,

последовательность LCDR2 SEQ ID NO: 8, и последовательности LCDR3 SEQ ID NO: 9; и - каждый из указанных IL31-BD содержит последовательность HCDR1 SEQ ID NO: 12, последовательность HCDR2 SEQ ID NO: 13, последовательности HCDR3 SEQ ID NO: 14, последовательность LCDR1 SEQ ID NO: 17 или 18, последовательность LCDR2 SEQ ID NO: 19, и последовательности LCDR3 SEQ ID NO: 20.

10. Полиспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов, где указанное полиспецифическое антитело действует как антагонист IL4R.

11. Полиспецифическое антитело по пункту 10, где указанное полиспецифическое антитело блокирует связывание IL4 и IL13 с IL4R.

12. Полиспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов, где указанное полиспецифическое антитело блокирует связывание IL-31 с комплексом рецептор интерлейкина 31 альфа (IL-31RA)/рецептор онкостатина М (OSMR) (комплекс IL-31RA/OSMR).

13. Полиспецифическое антитело по любому из пунктов 1-12, где указанное полиспецифическое антитело имеет растворимость по меньшей мере 100 мг/мл, в частности, по меньшей мере 120 мг/мл, при приготовлении в 20 мМ ацетатном буфере при pH 5,5.

14. Полиспецифическое антитело по любому из пунктов 1-12, где указанное полиспецифическое антитело, приготовленное в 20 мМ ацетатном буфере при pH 5,5, можно концентрировать до 100 мг/мл и более, в частности, до 100-200 мг/мл, в частности, до 100-150 мг/мл, с менее чем 2%-, особенно менее чем с 1%-потерей мономерного содержания, как определено SE-хроматографией.

15. Полиспецифическое антитело по любому из пунктов 1-12, где указанное полиспецифическое антитело, приготовленное в 20 мМ ацетатном буфере при pH 5,5, имеет содержание мономеров по меньшей мере 95%, в частности, по меньшей мере 97%, при концентрациях 100 мг/мл и выше, особенно при концентрациях в диапазоне от 100 до 150 мг/мл.

16. Полиспецифическое антитело по пунктам 1-12, где указанное полиспецифическое антитело имеет потерю содержания мономера после хранения при 4°C в течение четырех недель менее 5%, например, менее 4%, менее 3%, менее 2%, предпочтительно менее 1%, когда указанное полиспецифическое антитело имеет начальную концентрацию 100 мг/мл, в частности, когда указанное полиспецифическое антитело готовят в 20 мМ ацетатном буфере при pH 5,5.

17. Полиспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов, где количество секреции CCL2 клеток BEAS-2B, обработанных 1 нг/мл IL-4 и 10 нг/мл IL-31, в присутствии 1 мкг/мл указанных полиспецифических антител уменьшается или

увеличивается только в 1-1,5 раза, в частности, в 1-1,4 раза, в частности, в 1-1,3 раза, в частности, в 1-1,2 раза, по сравнению с количеством секреции CCL2 необработанных клеток BEAS-2B.

18. Полиспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов, где Fc-область иммуноглобулина выбрана из подкласса IgG, в частности, из подклассов IgG IgG1 и IgG4, в частности, из IgG4.

19. Полиспецифическое антитело по пункту 6, где IL4R-BD расположены в плечах Fab, а IL31-BD расположены в части scFv формата Morrison.

20. Полиспецифическое антитело по любому из пунктов 6 и 19, где формат полиспецифического антитела выбран из формата Morrison-L и Morrison-H, в частности, формат представляет собой формат Morrison-H.

21. Полиспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов, где указанные IL4R-BD:

a. связываются с IL-4R человека с константой одновалентной диссоциации (KD) от 0,1 до 200 пМ, в частности, с KD от 0,1 до 100 пМ, в частности от 0,1 до 50 пМ, при измерении с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR), в частности, где указанные IL4R-BD представлены в формате scFv;

b. являются перекрестно-реактивными с IL4R *Macaca fascicularis* (яванский макак), в частности, связываются, в частности, связываются с IL-4R яванского макака с одновалентной KD от 1 пМ до 5 нМ, конкретно от 1 пМ до 3 нМ, конкретно от 1 пМ до 2 нМ, как измерено с помощью SPR, особенно, где указанные IL4R-BD представлены в формате scFv;

c. являются перекрестно-реактивными с IL-4R *Callithrix jacchus* (игрунка), в частности, связываются с IL-4R игрунки с одновалентной KD от 1 пМ до 5 нМ, в частности от 1 пМ до 3 нМ, в частности от 1 пМ до 2 нМ, как измерено SPR, в частности, где указанные IL4R-BD представлены в формате scFv;

d. нейтрализуют индуцированную IL-4 человека передачу сигналов с IC50 от 0,01 до 5 нг/мл, конкретно с IC50 от 0,01 до 3 нг/мл, конкретно с IC50 от 0,01 до 1,5 нг/мл, как измерено в анализе репортерного гена *stat6* в клетках HEK-Blue, где указанные IL4R-BD представлены в формате scFv;

e. нейтрализуют индуцированную IL-13 человека передачу сигналов с IC50 от 0,01 до 10 нг/мл, конкретно с IC50 от 0,01 до 5 нг/мл, конкретно с IC50 от 0,01 до 2,5 нг/мл, как измерено в анализе репортерного гена *stat6* в клетках HEK-Blue, где указанные IL4R-BD находятся в формате scFv;

f. ингибируют связывание IL-4 человека с IL-4R человека с IC50 от 0,01 до 10 нг/мл, конкретно с IC50 от 0,01 до 5 нг/мл, конкретно с IC50 от 0,01 до 2 нг/мл, как измерено в конкурентном ИФА, где указанный IL4R-BD представлен в формате scFv;

g. в формате scFv имеет температуру плавления (Tm), определенную с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF), по меньшей мере 63°C, конкретно, по меньшей мере 65°C, конкретно, по меньшей мере 67°C, конкретно, по меньшей мере

69°C, конкретно по меньшей мере 70°C, конкретно по меньшей мере 71°C, конкретно по меньшей мере 72°C, в частности, где указанные scFv включают в состав в 50 mM фосфатно-цитратном буфере с 150 mM NaCl при pH 6,4;

h. в формате scFv имеет потерю содержания мономера после хранения в течение четырех недель при 4°C менее 5%, когда указанные scFv имеют начальную концентрацию 10 мг/мл, и, в частности, где указанные scFv включают в состав в 50 mM фосфатно-цитратном буфере с 150 mM NaCl при pH 6,4; и/или

i. в формате scFv имеет потерю содержания мономера после 5 циклов замораживания-оттаивания менее 5%, например, менее 4%, менее 3%, предпочтительно менее 2%, когда указанные scFv имеют начальную концентрацию 10 мг/мл и, в частности, когда указанные scFv включают в состав в 50 mM фосфатно-цитратном буфере с 150 mM NaCl при pH 6,4.

22. Полиспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов, где указанные IL4R-BD содержат каркасные последовательности FR1-FR4 доменов VH3 или VH4; в частности, каркасные последовательности FR1-FR4 домена VH3.

23. Полиспецифическое антитело по любому из пунктов 23, где указанные IL4R-BD в формате scFv содержат

(i) домен VL, содержащий каркас VL, содержащий каркасные области FR1, FR2 и FR3, которые выбраны из подтипов V_κ, конкретно, из подтипов V_κ1 и V_κ3, конкретно относятся к подтипу V_κ1, и каркас FR4, который выбран из V_κ FR4 и V_λ FR4, конкретно, представляет собой V_λ FR4, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70, 80, 90 процентов идентичную последовательности V_λ FR4, выбранной из SEQ ID NO: 26 - SEQ ID NO: 33, более конкретно, V_λ FR4, выбранный из SEQ ID NO: 26 - SEQ ID NO: 33, в частности, V_λ FR4 в соответствии с SEQ ID NO: 26 или 33.

24. Полиспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов, где указанные IL4R-BD содержат

a) последовательность VH, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 4, 5 и 6; и

b) последовательность VL, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 10 и 11.

25. Полиспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов, где указанные IL4R-BD содержат

a) последовательность VH, выбранную из SEQ ID NO: 4, 5 и 6,

b) последовательность VL, выбранную из SEQ ID NO: 10 и 11.

26. Полиспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов, где указанные IL4R-BD содержат

a) последовательность VH SEQ ID NO: 4 и последовательность VL SEQ ID NO: 11;

или

b) последовательность VH SEQ ID NO: 5 и последовательность VL SEQ ID NO: 10;
или

c) последовательность VH SEQ ID NO: 6 и последовательность VL SEQ ID NO: 10.

27. Полиспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов, где указанные IL31-BD:

a. связываются с IL-31 человека с одновалентной константой диссоциации (KD) 5 нМ или менее, конкретно, с одновалентной KD от 5 пМ до 5 нМ, конкретно, от 5 пМ до 2 нМ, конкретно, от 5 до 1000 пМ, как измерено с помощью поверхностного плазмона резонанс (SPR), конкретно, где указанные IL31-BD представлены в формате scFv;

b. являются перекрестно реактивными с IL-31 *Macaca fascicularis* (яванского макака), в частности, связываются с IL-31 яванского макака с одновалентной KD 5 нМ или менее, конкретно, с одновалентной KD от 5 пМ до 5 нМ, конкретно, от 5 пМ до 2 нМ, конкретно, от 5 до 1000 пМ, как измерено с помощью SPR, конкретно, где указанные IL31-BD представлены в формате scFv;

c. ингибируют индуцированную IL-31 человека передачу сигналов при IC50 от 0,1 до 30 нг/мл, конкретно при IC50 от 0,1 до 20 нг/мл, конкретно при IC50 от 0,1 до 10 нг/мл, как измерено в Path Hunter анализе димеризации IL-31RA/OSMRb, где указанные IL31-BD представлены в формате scFv;

d. блокируют связывание IL-31 человека с IL-31R человека с IC50 от 0,1 до 20 нг/мл, конкретно с IC50 от 0,1 до 10 нг/мл, конкретно с IC50 от 0,2 до 6 нг/мл, как измерено в конкурентном ИФА, где указанные IL31-BD представлены в формате scFv;

e. в формате scFv имеют температуру плавления (Tm), определенную с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии, по меньшей мере 65°C, предпочтительно по меньшей мере 67°C, более предпочтительно по меньшей мере 69°C, в частности, когда указанные scFv включены в состав в 50 mM фосфатно-цитратном буфере с 150 mM NaCl при pH 6,4;

f. в формате scFv имеют потерю содержания мономера после хранения в течение по меньшей мере четырех недель при 4°C менее 5%, например, менее 4%, менее 3%, менее 2%, предпочтительно менее 1%, когда указанные scFv находятся в начальной концентрации 10 мг/мл, и, в частности, когда указанные scFv включены в состав в 50 mM фосфатно-цитратном буфере с 150 mM NaCl при pH 6,4;

g. в формате scFv имеют потерю содержания мономера после хранения в течение четырех недель при 40°C менее 5%, например, менее 4%, менее 3%, менее 2%, предпочтительно менее 1%, когда указанные scFv находятся в начальной концентрации 10 мг/мл, и, в частности, когда указанные scFv включены в состав в 50 mM фосфатно-цитратном буфере с 150 mM NaCl при pH 6,4;

h. в формате scFv имеют потерю содержания мономера после 3 циклов замораживания-оттаивания менее 5%, например, менее 4%, менее 3%, менее 2%, предпочтительно менее 1%, когда указанные scFv находятся в начальной концентрации 10 мг/мл, и, в частности, когда указанные scFv включены в состав в 50 mM фосфатно-

цитратном буфере с 150 мМ NaCl при pH 6,4; и/или

i. в формате scFv имеют потерю содержания белка после хранения в течение четырех недель при 4°C или 40°C менее 5%, например, менее 4%, менее 3%, менее 2%, предпочтительно менее 1%, когда указанный scFv находится в начальной концентрации 10 мг/мл, и, в частности, когда указанный scFv включен в состав в 50 мМ фосфатно-цитратном буфере с 150 мМ NaCl при pH 6,4.

28. Полиспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов, где указанные IL31-BD содержат каркасные последовательности FR1-FR4 доменов VH3 или VH4; конкретно, каркасные последовательности FR1-FR4 домена VH3 .

29. Полиспецифическое антитело по пункту 28, где указанные IL31-BD в формате scFv содержат

(i) домен VL, содержащий каркас VL, содержащий каркасные области FR1, FR2 и FR3, которые выбраны из подтипов V_κ, конкретно, из подтипов V_κ1 и V_κ3, конкретно относятся к подтипу V_κ1, и каркас FR4, который выбран из V_κ FR4 и V_λ FR4, конкретно, представляет собой V_λ FR4, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70, 80, 90 процентов идентичную последовательности V_λ FR4, выбранной из SEQ ID NO: 26 - SEQ ID NO: 33, более конкретно, V_λ FR4, выбранный из SEQ ID NO: 26 - SEQ ID NO: 33, в частности, V_λ FR4 в соответствии с SEQ ID NO: 26 или 33.

30. Полиспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов, где указанные IL31-BD содержат

a) последовательность VH, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 15 и 16; и

b) последовательность VL, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 21 и 22.

31. Полиспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов, где указанный IL31-BD содержит

a) последовательность VH, выбранную из SEQ ID NO: 15 и 16, конкретно, последовательность VH SEQ ID NO: 16; и

b) последовательность VL, выбранную из SEQ ID NO: 21 и 22, конкретно, последовательность VL SEQ ID NO: 21.

32. Полиспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов, где по меньшей мере один из указанных IL4R-BD и/или по меньшей мере один из указанных IL31-BD содержит области CDR, полученные из родительского кроличьего антитела.

33. Полиспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов, где по меньшей мере один IL4R-BD и по меньшей мере один IL31-BD способны одновременно связываться со своими соответствующими антигенами.

34. Полиспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов, где указанное полиспецифическое антитело:

а. связывается с IL-4R человека с одновалентной константой диссоциации (KD) 1000 пМ или менее, конкретно, с KD от 1 до 1000 пМ, конкретно от 1 до 700 пМ, конкретно от 1 до 500 пМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR);

б. является перекрестно-реактивным с IL4R *Macaca fascicularis* (яванского макака), в частности, связывается с IL-4R яванского макака с одновалентной KD менее 50 нМ, конкретно менее 20 нМ, конкретно с одновалентной KD от 1 пМ до 5 нМ, конкретно от 1 пМ до 2 нМ, конкретно, от 1 до 1000 пМ, конкретно, от 1 до 500 пМ, как измерено с помощью SPR;

с. связывается с IL-31 человека с одновалентной KD менее 5 нМ, в частности, с одновалентной KD от 5 пМ до 5 нМ, в частности, от 5 пМ до 2 нМ, в частности, от 5 пМ до 1000 пМ, как измерено с помощью SPR;

д. является перекрестно-реактивным с IL-31 *Macaca fascicularis* (яванского макака), в частности, связывается с IL-31 яванского макака с одновалентной KD 20 нМ или менее, конкретно, с одновалентной KD от 5 пМ до 20 нМ, конкретно, от 5 пМ до 10 нМ, конкретно от 5 пМ до 5 нМ, как измерено с помощью SPR;

е. нейтрализует индуцированную IL-4 человека передачу сигналов при IC50 от 0,2 пМ до 200 пМ, конкретно при IC50 от 0,2 пМ до 100 пМ, конкретно при IC50 от 0,2 пМ до 50 пМ, как измерено в анализе репортерного гена *stat-6* в клетках HEK-Blue;

ф. нейтрализует индуцированную IL-13 человека передачу сигналов с IC50 от 0,2 пМ до 200 пМ, конкретно с IC50 от 0,2 пМ до 100 пМ, конкретно с IC50 от 0,2 пМ до 50 пМ, как измерено в анализе репортерного гена *stat-6* в клетках HEK-Blue;

г. блокирует индуцированную IL-4 и IL-13 человека секрецию хемокина, регулируемого тимусом и активацией, (TARC), с IC50 от 10 пМ до 2 нМ, конкретно с IC50 от 10 пМ до 1 нМ, как измерено в анализе цельной крови человека ;

h. связывается с клетками HEK293T, экспрессирующими IL-4R человека, с EC50 от 0,01 до 10 нМ, конкретно с EC50 от 0,01 до 7 нМ, конкретно с EC50 от 0,01 до 5 нМ;

i. связывается с клетками HEK293T, экспрессирующими IL-4R человека, с EC50 от 0,01 до 10 нМ, конкретно с EC50 от 0,01 до 7 нМ, конкретно с EC50 от 0,01 до 5 нМ;

j. блокирует индуцированную IL-31 человека передачу сигналов с IC50 от 5 пМ до 2 нМ, конкретно с IC50 от 5 пМ до 1 нМ, конкретно с IC50 от 5 до 700 пМ, как измерено в Path Hunter IL-31RA/OSMRb анализе димеризации;

к. блокирует индуцированную IL-31 яванского макака передачу сигналов с IC50 от 0,05 до 20 нМ, конкретно с IC50 от 0,05 до 10 нМ, конкретно с IC50 от 0,05 до 5 нМ, как измерено в анализе димеризации Path Hunter IL-31RA/OSMRb;

l. имеет температуру плавления (T_m), определенную с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии, по меньшей мере 60°C, предпочтительно по меньшей мере 63°C, более предпочтительно по меньшей мере 66°C, в частности, где указанное полиспецифическое антитело включено в состав в 20 mM MES. буфер с pH 7; и/или

m. имеет потерю содержания мономера после хранения в течение четырех недель менее 5%, например, менее 4%, менее 3%, менее 2%, предпочтительно менее 1%, когда

указанное полиспецифическое антитело имеет начальную концентрацию 100 мг/мл и, в частности, когда указанное полиспецифическое антитело включено в состав в 20 мМ ацетатном буфере при pH 5,5.

35. Полиспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов, выбранное из антител Morrison, имеющих следующие последовательности тяжелой цепи (HC) и легкой цепи (LC):

- последовательность HC SEQ ID NO: 38 и последовательность LC SEQ ID NO: 37;
- последовательность HC SEQ ID NO: 40 и последовательность LC SEQ ID NO: 39;
- последовательность HC SEQ ID NO: 42 и последовательность LC SEQ ID NO: 41;
- последовательность HC SEQ ID NO: 44 и последовательность LC SEQ ID NO: 43;
- последовательность HC SEQ ID NO: 46 и последовательность LC SEQ ID NO: 45;
- последовательность HC SEQ ID NO: 48 и последовательность LC SEQ ID NO: 47;

и

- последовательность HC SEQ ID NO: 50 и последовательность LC SEQ ID NO: 49.

36. Нуклеиновая кислота или две нуклеиновые кислоты, кодирующие полиспецифическое антитело по любому из пунктов 1-35.

37. Вектор или два вектора, содержащие нуклеиновую кислоту или две нуклеиновые кислоты по пункту 36.

38. Клетка-хозяин или клетки-хозяева, содержащие вектор или два вектора по пункту 37.

39. Способ получения полиспецифического антитела по любому из пунктов 1-35, включающий (i) получение нуклеиновой кислоты или двух нуклеиновых кислот по пункту 36, или вектора, или двух векторов по пункту 37, экспрессирующих указанную нуклеиновую кислоту или нуклеиновые кислоты, или указанный вектор или векторы, и сбор указанного полиспецифического антитела из системы экспрессии, или (ii) получение клетки-хозяина или клеток-хозяев по п. 38, культивирование указанной клетки-хозяина или указанных клеток-хозяев; и сбор указанного полиспецифического антитела из культуры клеток.

40. Фармацевтическая композиция, содержащая полиспецифическое антитело по любому из пунктов 1-35 и фармацевтически приемлемый носитель.

41. Полиспецифическое антитело по любому из пунктов 1-35 для применения в качестве лекарственного средства.

42. Полиспецифическое антитело по любому из пунктов 1-35 для применения при лечении заболевания, конкретно заболевания человека, более конкретно заболевания человека, выбранного из аллергических, воспалительных и аутоиммунных заболеваний, конкретно воспалительных и аутоиммунных заболеваний.

43. Полиспецифическое антитело по любому из пунктов 1-35 для применения при лечении заболевания по пункту 42, где указанное заболевание выбрано из вызывающих зуд аллергических заболеваний, вызывающих зуд воспалительных заболеваний и вызывающих зуд аутоиммунных заболеваний, конкретно вызывающих зуд воспалительных заболеваний

и вызывающих зуд аутоиммунных заболеваний.

44. Полиспецифическое антитело по пункту 42 или 43, где указанное заболевание выбрано из атопического дерматита, острого аллергического контактного дерматита, хронической спонтанной крапивницы, буллезного пемфигоида, очаговой алопеции, дерматомиозита, узловатого пруриго, псориаза и атопической астмы; конкретно когда указанное заболевание представляет собой атопический дерматит.

45. Способ лечения заболевания, в частности заболевания человека, более конкретно заболевания человека, выбранного из аллергических, воспалительных и аутоиммунных заболеваний, в частности, воспалительных и аутоиммунных заболеваний, включающий стадию введения пациенту полиспецифического антитела по любому из пунктов 1-35.

46. Способ по пункту 45, где указанное заболевание выбрано из вызывающих зуд аллергических заболеваний, вызывающих зуд воспалительных заболеваний и вызывающих зуд аутоиммунных заболеваний, в частности, из вызывающих зуд воспалительных заболеваний и вызывающих зуд аутоиммунных заболеваний.

47. Способ по пункту 45 или 46, где указанное заболевание выбрано из атопического дерматита, острого аллергического контактного дерматита, хронической спонтанной крапивницы, буллезного пемфигоида, очаговой алопеции, дерматомиозита, узловатого пруриго, псориаза и атопической астмы; конкретно когда указанное заболевание представляет собой атопический дерматит.

48. Способ лечения заболевания, более конкретно заболевания человека, выбранного из аллергических, воспалительных и аутоиммунных заболеваний; конкретно из вызывающих зуд аллергических заболеваний, вызывающих зуд воспалительных заболеваний и вызывающих зуд аутоиммунных заболеваний;

причем указанный способ включает стадии введения пациенту

1. первого антитела, содержащего

а) IL4R-BD, как определено в любом из предыдущих пп. 1-26 и 32-35, и

б) Fc-область, в частности, область IgG, в частности, область IgG4; и

2. второго антитела, содержащего IL31-BD, как определено в любом из предыдущих пп. с 1 по 20 и с 27 по 35.

49. Способ по пункту 48, где введение осуществляется таким образом, что эффективный уровень дозы указанного первого антитела и указанного второго антитела одновременно достигается в плазме крови пациента.

50. Способ по пункту 48 или 49, где указанное заболевание выбрано из атопического дерматита, острого аллергического контактного дерматита, хронической спонтанной крапивницы, буллезного пемфигоида, очаговой алопеции, дерматомиозита, узловатого пруриго, псориаза и атопической астмы; конкретно где указанное заболевание представляет собой атопический дерматит.

51. Набор, содержащий

1. первое антитело, содержащее

а) IL4R-BD, как определено в любом из предыдущих пп. 1-26 и 32-35, и

Fc-область, в частности, область IgG, в частности, область IgG4; и

2. второе антитело, содержащее IL31-BD, как определено в любом из предыдущих пп. 1-20 и 27-35.

52. Фармацевтическая композиция по пункту 40, где указанная фармацевтическая композиция представляет собой терапевтическое средство для лечения заболевания человека, выбранного из аллергических, воспалительных и аутоиммунных заболеваний.

53. Фармацевтическая композиция по пункту 52, где указанное заболевание выбрано из атопического дерматита, острого аллергического контактного дерматита, хронической спонтанной крапивницы, буллезного пемфигоида, очаговой алопеции, дерматомиозита, узловатого пруриго, псориаза и атопической астмы; конкретно когда указанное заболевание представляет собой атопический дерматит.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0026] На ФИГ. 1 показана способность молекул Morrison-H PRO2198 и PRO2199 ингибировать IL4R- и IL-31-индуцированную передачу сигналов в анализе BEAS-2B по сравнению с комбинацией дупилумаба и BMS-981164. PRO2198 и PRO2199 демонстрируют сходную эффективность ингибирования IL4R- и IL-31-индуцированной передачи сигналов по сравнению с комбинацией дупилумаба и BMS-981164 (A). Индивидуальная блокада IL-4R или IL-31 по отдельности путем добавления дупилумаба или BMS-981164 по отдельности менее эффективна, чем комбинированная блокада IL-4R- и IL-31-индуцированной передачи сигналов (B).

[0027] На ФИГ. 2 показано схематическое изображение формата Morrison-H IgG4 (слева) и формата Morrison-L (справа) с меченой номенклатурой субдоменов. Линкерные последовательности, соединяющие домены Fv (светло-серые), состоят из (G4S) модулей с разными повторами (два модуля между константными областями и доменами scFv и 4 модуля между VL2 и VH2).

[0028] На ФИГ. 3 показана эффективность оптимизированных анти-IL-4R-scFv PRO1898 и PRO1899 в отношении блокирования индуцированной IL-4 человека передачи сигналов (A) и индуцированной IL-13 человека передачи сигналов (B) IL-4R в анализе репортерного гена Stat-6 в клетках HEK-Blue. Активность анализируемых молекул сравнивают с дупилумабом.

[0029] На ФИГ. 4 показана способность оптимизированных анти-IL-4R-scFv против PRO1898 (A) и PRO1899 (B) ингибировать взаимодействие между IL-4 человека и IL-4R человека, оцененное с помощью конкурентного ИФА.

[0030] На ФИГ. 5 показано одновременное связывание антитела Morrison PRO2198 с IL-4R человека/IL-31 человека и с IL-4R яванского макака/IL31 яванского макака. Вверху: схематическое изображение плана эксперимента; Внизу: сенсограмма, показывающая одновременное связывание PRO2198 с IL-4R человека/IL31 человека (темно-серый цвет) и IL-4R яванского макака/IL-31 яванского макака (светло-серый).

[0031] На ФИГ. 6 показано связывание молекул Morrison-H (MorrH) и Morrison-L (MorrL) PRO2198, PRO2199, PRO2206 и PRO2207 и молекулы отрицательного контроля

PRO2077 с IL-4R человека (A) и с IL-4R яванского макака (B) на трансфецированных клетках HEK293T. Все молекулы связывались с IL-4R человека (A). Для контрольной молекулы PRO2077(B) не наблюдалось связывания с IL-4R яванского макака. Антитело, нацеленное на V5 Tag (V5 Tag), которое слито с N-концом экспрессирующихся конструкций IL-4R человека и яванского макака, использовали в качестве положительного контроля для связывания с плазматической мембраной.

[0032] На ФИГ. 7 показана способность антител Morrison-H (MorrH) и Morrison-L (MorrL) PRO2198, PRO2199, PRO2206 и PRO2207 нейтрализовать индуцированную IL-4 человека и IL-13 человека передачу сигналов в анализе репортерного гена stat-6. Сила блокирования IL-4R антителами Morrison-H и Morrison-L сравнима с дупилумабом как в отношении индуцированной IL-4 передачи сигналов (A и C), так и в отношении индуцированной IL-13 передачи сигналов (B и D). Значения IC50, изображенные на фигурах 5A-5D, представляют измерения в одной точке.

[0033] На ФИГ. 8 показана способность антител Morrison-H (MorrH) PRO2198 (A) и PRO2199(B) нейтрализовать индуцированную IL-4 человека передачу сигналов в анализе с репортерным геном stat-6 с избытком IL-31 или без него в среде для анализа. В присутствии избытка IL-31 потери эффективности не наблюдается. Значения IC50, изображенные на фигурах 6A и 6B, представляют измерения в одной точке.

[0034] На ФИГ. 9 показана способность антител Morrison-H (MorrH) и Morrison-L (MorrL) PRO2198, PRO2199, PRO2206 и PRO2207 нейтрализовать индуцированную IL-31 человека передачу сигнала в анализе димеризации IL-31RA/OSMR с избытком внеклеточного домена IL-4R в среде для анализа или без него. Антитела Morrison блокировали взаимодействие между IL-31 и IL-31RA с аналогичной активностью по сравнению с BMS981164 (A и B). В присутствии избытка IL-4R потери активности не определяли (C и D).

[0035] На ФИГ. 10 показана способность антител Morrison-H PRO2198 и PRO2199 нейтрализовать индуцированную IL-31 яванского макака передачу сигнала в анализе димеризации IL-31RA/OSMR. Антитела PRO2198 и PRO2199 были способны блокировать взаимодействие между IL-31 и IL-31RA яванского макака.

[0036] На ФИГ. 11 показана способность молекул Morrison-H PRO2198 и PRO2199 и соответствующих молекул PRO2209 и PRO2210 IgG4 против IL-4R, в которых отсутствуют IL-31-связывающие домены scFv, блокировать индуцированную IL-4 и IL-13 экспрессию CD23 в PBMC человека. PRO2198 и PRO2199 ингибируют индуцированную IL-4 и IL-13 активацию CD23 в человеческих моноцитах (A), наивных В-клетках (B) и В-клетках памяти (C) с аналогичной эффективностью по сравнению с дупилумабом. PRO2209 и PRO2210 демонстрируют одинаковое ингибирование по сравнению с дупилумабом.

[0037] ФИГ. 12 показан анализ SDS-Page PRO2198, PRO2199, PRO2206 и PRO2207 в восстанавливающих и не восстанавливающих условиях.

[0038] На ФИГ. 13 показан анализ отсечения с помощью SDS-PAGE. 1-я дорожка: Маркер - 2-я: pH 3,5, t0-3-я: pH 3,5, t10d - 4-я: pH 5, t0-5-я: pH 5, t10d - 6-я: pH 7, t0d - 7-я:

pH 7, t10d - 8-я: pH 8,5, t0-9-й: pH 8,5, t10d. *Предположительно, неполное восстановление димера HC. #Предположительно, неполное восстановление LC.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0039] Известные терапевтические антитела против IL-4R часто страдают недостаточной эффективностью и низкой или умеренной частотой ответа у пациентов. Они также не устраняют непосредственно зуд, который является распространенным симптомом, конкретно при кожных воспалительных и аутоиммунных заболеваниях. Таким образом, в области медицины существует потребность в улучшенных терапевтических средствах на основе антител против IL-4R, которые обладают более высокой эффективностью при аллергических, воспалительных и аутоиммунных заболеваниях, в частности, при воспалительных и аутоиммунных заболеваниях, вызывающих зуд, таких как атопический дерматит средней и тяжелой степени, и в то же время способны значительно уменьшить зуд, связанный с заболеванием.

[0040] Настоящее изобретение относится к полиспецифическим антителам, содержащим один или два связывающих домена, которые специфически связываются с IL-4R (IL4R-BD), и один или два связывающих домена, которые специфически связываются с IL-31 (IL31-BD), где полиспецифическое антитело содержит Fc-область иммуноглобулина. Полиспецифические антитела по настоящему изобретению могут одновременно высокоэффективно блокировать IL-4/IL-13, а также индуцированную IL-31 передачу сигналов.

[0041] Авторы изобретения полагают, что Fc-область иммуноглобулина обеспечивает дополнительные взаимодействия FcγR, которые усиливают связывание полиспецифических антител по изобретению с IL-4R на живых клетках и тем самым повышают их способность блокировать опосредованную IL-4R передачу сигналов. Различные форматы антител в анализе РВМС человека также указывают на то, что взаимодействие Fc-области с Fc-гамма-рецептором типа II (FcγRII), по-видимому, имеет особое значение для наблюдаемого повышения эффективности. Таким образом, в контексте настоящего изобретения термин «функциональная Fc-область» относится к Fc-области, которая способна взаимодействовать с FcγR, в частности с FcγRII, в пределах своей естественной функциональности.

[0042] Насколько известно авторам изобретения, в предшествующем уровне техники еще не сообщалось об одновременной блокаде как сигнального пути IL-4R, так и сигнального пути IL-31, не говоря уже о высокоэффективной одновременной блокаде указанных путей с помощью одной молекулы.

[0043] Интерлейкин 31 (IL-31) представляет собой воспалительный цитокин, который помогает запускать клеточно-опосредованный иммунитет против патогенов. IL-31 предпочтительно продуцируется Th2-клетками. IL-31 посылает сигналы через гетеродимерный рецепторный комплекс (IL-31R или IL31R), включающий рецептор интерлейкина 31 альфа (IL-31RA или IL31RA) и рецептор онкостатина M β (OSMR β), экспрессируемый в иммунных и эпителиальных клетках. Связывание IL-31 с этим

рецепторным комплексом приводит к активации путей передачи сигнала JAK/STAT и PI3K/AKT, а также активирует различные пути MAPK (ERK, p38 и JNK).

[0044] IL-31 вовлечен в различные хронические воспалительные заболевания. Например, было обнаружено, что сверхэкспрессия IL-31 у мышей приводит к симптомам, подобным дерматиту, см. Dillon, et al., *Nature Immunol.* 5:752-760, (2004). Кроме того, при многих хронических воспалительных заболеваниях, таких как, например, AD, IL-31 опосредует активацию нервных волокон в коже пациентов, что приводит к агрессивному фенотипу зуда, который усугубляет симптомы этих заболеваний при расчесывании у пациента, см. например Oetjen et al., *Cell*, 171: 217-228 (2017). Расчесывание может привести к нарушению кожного барьера, проникновению микробных патогенов в кожу и дальнейшему развитию воспаления в этом месте.

[0045] Кроме того, было обнаружено, что IL-31 вовлечен в аллергическую астму, аллергический ринит, воспалительные заболевания кишечника, злокачественные новообразования и остеопороз, см. Bagci et al., *J Allergy Clin Immunol*, 141(3):858-866 (2018).

[0046] Клинически доказано, что блокирование передачи сигналов IL-31/IL-31RA антителами против IL31RA, такими как, например, антитело против IL-31RA, немолизумаб, эффективно уменьшает зуд у пациентов, страдающих AD, см. Ruzicka et al., *N Engl J Med*, 376:2092-2093 (2017).

[0047] Кроме того, IL-31-нейтрализующее антитело BMS-981164 было разработано для обеспечения эффективной таргетной терапии для лечения хронических зудящих состояний кожи, см. Lewis et al., *J Eur Acad of Dermatol Venereol*, 31(1):142-150 (2017).

[0048] Помимо нацеливания на IL-4R (первая специфичность), было решено нацеливаться на IL-31 (вторая специфичность), а не на связанный с клеткой IL-31RA, чтобы избежать любой потенциальной перекрестной связи между клетками, которая вполне может произойти при нацеливании на два разных типа рецепторов на поверхности клетки одновременно (например, IL-4R и IL-31RA).

[0049] Как указано выше, полиспецифические антитела по настоящему изобретению могут одновременно и очень эффективно блокировать IL-4-/IL-13-, а также IL-31-индуцированную передачу сигналов. Например, при концентрации 1 мкг/мл PRO2198 и PRO2199, два репрезентативных примера полиспецифических антител по настоящему изобретению, способны снижать комбинированную IL-4R- и IL-31-опосредованную секрецию CCL2 клеток BEAS-2B, которые были обработаны 1 нг/мл IL-4 и 10 нг/мл IL-31, по меньшей мере, в той же степени по сравнению с эквивалентным количеством смеси 1:1 антитела против IL-4R дупилумаба и антитела против IL-31 BMS-981164 (Фигура. 1B).

[0050] Хемокиновый (мотив CC) лиганд 2 (CCL2), также называемый моноцитарным хемоаттрактантным белком 1 (MCP1) и малым индуцируемым цитокином A2, представляет собой малый цитокин, принадлежащий к семейству CC-хемокинов. CCL2 рекрутирует моноциты, Т-клетки памяти и дендритные клетки в очаги воспаления, вызванные либо повреждением ткани, либо инфекцией. CCL2 участвует в патогенезе ряда заболеваний, характеризующихся моноцитарными инфильтратами, таких как псориаз, ревматоидный

артрит и атеросклероз (Xia et al, Expert Opinion on Therapeutic Patents., 2009, 19 (3): 295-303).

[0051] Некоторые из полиспецифических антител по настоящему изобретению, например, PRO2198, способны снижать комбинированную IL-4R- и IL-31-опосредованную секрецию CCL2 указанными клетками BEAS-2B сильнее, чем эквивалентное количество такой смеси 1:1 дупилумаба и BMS981164, и почти до уровня необработанных клеток BEAS-2B (Фигура 1B).

[0052] Термин «клетки BEAS-2B» или BEAS-2B, используемый в настоящем описании, относится к клеткам иммортализованной неканцерогенной эпителиальной клеточной линии из бронхиального эпителия человека. Эта клеточная линия была создана посредством трансфекции гибридным вирусом аденовируса 12-SV40 и последующей иммортализации посредством последовательного пассирования клеток, см. Reddel et al., Cancer Res., 48(7):1904-1909 (1988). Клетки BEAS-2B широко использовались для изучения клеточных и молекулярных механизмов при заболеваниях, связанных с легкими, а также в качестве клеточной модели *in vitro* для токсикологических исследований, связанных с легкими.

[0053] Кроме того, полиспецифические антитела против e IL-4R \times IL-31 по настоящему изобретению проявляют очень выгодные биофизические свойства, в частности выдающуюся рецептуру и стабильность при хранении при концентрациях антител значительно выше 100 мг/мл. Например, потеря содержания белка, а также содержания мономеров для PRO2198, репрезентативного полиспецифического антитела по настоящему изобретению, составляет менее 1% при хранении в течение четырех месяцев при 4°C в концентрации выше 100 мг/мл в 20 мМ. ацетатный буфер (pH 5,5).

[0054] Таким образом, полиспецифические антитела по настоящему изобретению обеспечивают явные терапевтические преимущества по сравнению с традиционными методами лечения.

[0055] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют то же значение, которое обычно понимают специалисты в области техники, к которой относится настоящее изобретение.

[0056] Термины «содержащий» и «включающий» используются здесь в их открытом и неограничивающем смысле, если не указано иное. Таким образом, в отношении таких последних вариантов осуществления термин «содержащий» включает более узкий термин «состоящий из».

[0057] Ссылки на единственное число и аналогичные ссылки в контексте описания изобретения (особенно в контексте следующей формулы изобретения) должны толковаться как охватывающие как единственное, так и множественное число, если иное не указано в настоящем документе или явно не противоречит контексту. Например, термин «клетка» включает множество клеток, включая их смеси. Если форма множественного числа используется для соединений, солей и т. п., это подразумевает также отдельное соединение, соль и т. п.

[0058] В одном аспекте настоящее изобретение относится к полиспецифическим

антителам, содержащим:

а) один или два связывающих домена, которые специфически связываются с IL-4R (IL4R-BD), и

б) один или два связывающих домена, которые специфически связываются с IL-31 (IL31-BD),

где полиспецифическое антитело содержит Fc-область иммуноглобулина.

[0059] Термин «антитело» и т. п., используемый в настоящем описании, включает цельные антитела или их отдельные цепи; и любой антигенсвязывающий фрагмент (т. е., «антигенсвязывающая часть») или их отдельные цепи; и молекулы, содержащие CDR антитела, области VH или области VL (включая, без ограничения, полиспецифические антитела). Встречающееся в природе «цельное антитело» представляет собой гликопротеин, содержащий по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (сокращенно обозначенной в настоящем описании как VH) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (сокращенно обозначенной в настоящем описании как VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен, CL. Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), фланкированные более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Переменные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

[0060] Термин «Fc-область иммуноглобулина» или «Fc-область», используемый в настоящем описании, используется для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, т. е. домены CH2 и CH3 константных областей тяжелой цепи. Термин «Fc-область» включает Fc-области с нативной последовательностью и варианты Fc-области, т. е. Fc-области, которые сконструированы для проявления определенных желаемых свойств, таких как, например, измененная функция связывания рецептора Fc и/или уменьшенный или подавленный обмен Fab-плечей. Примером такой сконструированной Fc-области является технология «выступ-во-впадину» (K1H) (см., например, Ridgway et al., Protein Eng. 9:617-21 (1996) и Spiess et al., J Biol Chem. 288(37):26583-93 (2013)). Fc-области с нативной последовательностью включают человеческие IgG1, IgG2 (IgG2A, IgG2B), IgG3 и IgG4. «Fc-рецептор» или «FcR» описывает рецептор, который связывается с Fc-областью антитела. Конкретно, FcR представляет

собой человеческий FcR с нативной последовательностью, который связывает антитело IgG (гамма-рецептор) и включает рецепторы подклассов FcγRI, FcγRII и FcγRIII, включая аллельные варианты и формы альтернативного сплайсинга этих рецепторов, рецепторы FcγRII, включая FcγRIIA («активирующий рецептор») и FcγRI IB («ингибирующий рецептор»), которые имеют сходные аминокислотные последовательности, которые различаются, прежде всего, их цитоплазматическими доменами. Активирующий рецептор FcγRIIA содержит иммунорецепторный мотив активации на основе тирозина (ITAM) в своем цитоплазматическом домене. Ингибирующий рецептор FcγRIIB содержит иммунорецепторный мотив ингибирования на основе тирозина (ITIM) в своем цитоплазматическом домене (см. M. Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 5:203-234 (1997). FcR рассмотрены в Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991); Capet et al., *Immunmethods* 4: 25-34 (1994); и de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995). Другие FcR, в том числе те, которые будут идентифицированы в будущем, охватываются здесь термином «FcR». Термин «Fc-рецептор» или «FcR» также включает неонатальный рецептор FcRn, который отвечает за перенос материнских IgG к плоду. Guyer et al., *J. Immunol.* 117: 587 (1976) и Kim et al., *J. Immunol.* 24: 249 (1994). Известны способы измерения связывания с FcRn (см., например, g., Ghetie and Ward, *Immunol. Today* 18: (12): 592-8 (1997); Ghetie et al., *Nature Biotechnology* 15 (7): 637-40 (1997); Hinton et al., *J. Biol. Chem.* TII (8): 6213-6 (2004); WO 2004/92219 (Hinton et al). Связывание с FcRn *in vivo* и время полужизни в сыворотке высокоаффинно связывающих полипептидов FcRn человека можно анализировать, например, в трансгенных мышцах или трансфицированных клеточных линиях человека, экспрессирующих FcRn человека, или в приматах, которым вводят полипептиды, имеющие вариант Fc-области. WO 2004/42072 (Presta) описывает варианты антител, которые улучшают или уменьшают связывание с FcR. См. также, например, Shields et al., *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001).

[0061] В конкретных вариантах осуществления Fc-область иммуноглобулина, содержащаяся в полиспецифических антителах по изобретению, выбрана из Fc-области подкласса IgG, конкретно, из Fc-области подклассов IgG1 и IgG4, конкретно, из Fc-области IgG4.

[0062] В конкретных вариантах осуществления полиспецифические антитела по изобретению содержат область IgG.

[0063] Термин «область IgG», используемый в настоящем описании, относится к тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина G, то есть к Fc-области, как определено выше, и области Fab, состоящей из доменов VL, VH, CL и CH1. Термин «область IgG» включает области IgG с нативной последовательностью, такие как человеческие IgG1, IgG2 (IgG2A, IgG2B), IgG3 и IgG4, а также сконструированные области IgG, которые проявляют определенные желаемые свойства, такие как, например, свойства, определенные выше для Fc-области. Термин «функциональная область IgG», используемый в настоящем описании, относится к области IgG, содержащей функциональную Fc-область.

[0064] В конкретных вариантах осуществления полиспецифические антитела по

изобретению содержат область IgG, где область IgG выбрана из подклассов IgG IgG1 и IgG4, в частности, из IgG4.

[0065] Термины «связывающий домен», «его антигенсвязывающий фрагмент», «антигенсвязывающая часть» антитела и т. п. в данном контексте относятся к одному или более фрагментам интактного антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с данным антигеном (например, IL4R, IL-31). Антигенсвязывающие функции антитела могут выполнять фрагменты интактного антитела. В частности, в случае полиспецифических антител по настоящему изобретению термины «связывающий домен», «его антигенсвязывающий фрагмент», «антигенсвязывающая часть» и т. п. в настоящем описании относятся к Fab-фрагменту, т. е. моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; фрагмент F(ab)2, т. е. бивалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; фрагмент Fv, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела; стабилизированный дисульфидом фрагмент Fv (dsFv) и одноцепочечный фрагмент Fv (scFv). Предпочтительно связывающие домены антител по настоящему изобретению независимо друг от друга выбирают из Fab-фрагмента, Fv-фрагмента, dsFv-фрагмента и одноцепочечного Fv-фрагмента (scFv). В конкретных вариантах осуществления связывающие домены антител по настоящему изобретению независимо друг от друга выбирают из Fab-фрагмента и одноцепочечного Fv-фрагмента (scFv). В других конкретных вариантах осуществления домены VL и VH фрагмента scFv стабилизированы междоменной дисульфидной связью, в частности, указанный домен VH содержит один остаток цистеина в положении 51 (нумерация АНо), а указанный домен VL содержит один остаток цистеина в положении 141 (нумерация АНо).

[0066] Термин «области, определяющие комплементарность», («CDR»), относится к аминокислотным последовательностям с границами, определенными с использованием любой из ряда хорошо известных схем, включая схемы, описанные Kabat et al. (1991), «Sequences of Proteins of Immunological Interest», 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (схема нумерации «Kabat»); Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273, 927-948 (схема нумерации «Chothia»); ImMunoGenTics (IMGT) нумерация (Lefranc, M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999); Lefranc, M.-P. et al., Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)) (схема нумерации «IMGT»); и схема нумерации, описанная в Honegger & Plückthun, J. Mol. Biol., 309 (2001) 657-670 (нумерация «АНо»). Например, для классических форматов по Kabat аминокислотные остатки CDR в переменном домене тяжелой цепи (VH) имеют номера 31-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3); и аминокислотные остатки CDR в переменном домене легкой цепи (VL) имеют номера 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3). По Chothia аминокислоты CDR в VH имеют номера 26-32 (HCDR1), 52-56 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3); а аминокислотные остатки в VL имеют номера 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3). Комбинируя определения CDR как по Kabat, так и по Chothia, CDR состоят из аминокислотных остатков 26-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3) в VH человека и аминокислотных остатков 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3) в VL человека. По IMGT аминокислотные остатки CDR в VH имеют номера

приблизительно 26-35 (HCDR1), 51-57 (HCDR2) и 93-102 (HCDR3), а аминокислотные остатки CDR в VL имеют номера приблизительно 27-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3) (нумерация по «Kabat»). По IMGT CDR антитела можно определить с помощью программы IMGT/DomainGap Align.

[0067] В контексте настоящего изобретения используется система нумерации, предложенная Honegger & Plückthun («АНО») (Honegger & Plückthun, *J. Mol. Biol.*, 309 (2001) 657-670), если специально не указано иное. В частности, следующие остатки определены как CDR в соответствии со схемой нумерации АНО: LCDR1 (также называемый CDR-L1): L24-L42; LCDR2 (также называемый CDR-L2): L58-L72; LCDR3 (также называемый CDR-L3): L107-L138; HCDR1 (также называемый CDR-H1): H27-H42; HCDR2 (также называемый CDR-H2): H57-H76; HCDR3 (также называемый CDR-H3): H108-H138. Для ясности система нумерации по Honegger & Plückthun учитывает разнообразие длин, которое обнаруживается во встречающихся в природе антителах, как в различных подсемействах VH и VL, так и, в частности, в CDR, и предусматривает пробелы в последовательностях. Таким образом, в данном переменном домене антитела обычно не все положения с 1 по 149 будут заняты аминокислотным остатком.

[0068] Термин «специфичность связывания», используемый в настоящем описании, относится к способности отдельного антитела реагировать с одной антигенной детерминантой, а не с другой антигенной детерминантой. Используемый в настоящем описании термин «специфически связывается с» или «специфичен для» относится к измеримым и воспроизводимым взаимодействиям, таким как связывание между мишенью и антителом, которое определяет присутствие мишени в присутствии гетерогенной популяции молекулы, включая биологические молекулы. Например, антитело, которое специфически связывается с мишенью (которая может быть эпитопом) представляет собой антитело, которое связывается с этой мишенью с большей аффинностью, авидностью, более легко и/или с большей продолжительностью, чем оно связывается с другими мишенями. В своей наиболее общей форме (и когда не упоминается определенная ссылка) «специфическое связывание» относится к способности антитела различать интересующую мишень и неродственную молекулу, как определено, например, в соответствии со способами анализа специфичности, известными в данной области. Такие способы включают, но не ограничиваются ими, вестерн-блот-анализ, ИФА, RIA, ECL, IRMA, тесты SPR (поверхностный плазмонный резонанс) и сканирование пептидов. Например, можно провести стандартный анализ ИФА. Балльная оценка может быть выполнена с помощью стандартного проявления цвета (например, вторичное антитело с пероксидазой хрена и тетраметилбензидин с перекисью водорода). Реакцию в определенных лунках оценивают по оптической плотности, например, при 450 нм. Типичный фон (= отрицательная реакция) может составлять примерно 0,1 OD; типичная положительная реакция может составлять примерно 1 OD. Это означает, что соотношение между положительной и отрицательной оценкой может быть 10-кратным или выше. В другом примере может быть проведен SPR-анализ, в котором по меньшей мере 10-кратное, конкретно, по меньшей мере 100-кратное

различие между фоном и сигналом указывает на специфическое связывание. Как правило, определение специфичности связывания проводят с использованием не одной эталонной молекулы, а набора примерно из трех-пяти несвязанных молекул, таких как сухое молоко, трансферрин и т. п.

[0069] Соответственно, антитела по изобретению представляют собой выделенные антитела. Термин «выделенное антитело», используемый в настоящем описании, относится к антителу, которое практически не содержит других антител, обладающих другой антигенной специфичностью (например, выделенное антитело, которое специфически связывает IL-4R и IL-31, по существу не содержит антител, которые специфически связывают антигены, отличные от IL-4R и IL-31. Кроме того, выделенное антитело может быть по существу свободным от другого клеточного материала и/или химических веществ.

[0070] Соответственно, антитела по изобретению представляют собой моноклональные антитела. Термин «моноклональное антитело», используемый в настоящем описании, относится к антителам, которые имеют по существу идентичные аминокислотные последовательности или получены из одного и того же генетического источника. Моноклональное антитело проявляет специфичность связывания и аффинность к конкретному эпитопу или специфичность связывания и аффинность к конкретным эпитопам.

[0071] Антитела по изобретению включают, но не ограничиваются ими, химерные, человеческие и гуманизированные антитела.

[0072] Термин «химерное антитело» (или его антигенсвязывающий фрагмент), используемый в настоящем описании, относится к молекуле антитела (или его антигенсвязывающему фрагменту), в которой (a) константная область или ее часть изменены, заменены или заменены так, что антигенсвязывающий сайт (вариабельная область) связан с константной областью другого или измененного класса, эффекторной функции и/или вида; или (b) вариабельная область или ее часть изменена, заменена или заменена вариабельной областью, имеющей другую или измененную антигенную специфичность. Например, мышинное антитело можно модифицировать, заменив его константную область константной областью иммуноглобулина человека. Благодаря замене константной областью человека химерное антитело может сохранять свою специфичность в распознавании антигена, при этом обладая сниженной антигенностью у человека по сравнению с исходным мышинным антителом.

[0073] Термин «гуманизированное» антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент), используемый в настоящем описании, относится к антителу (или его антигенсвязывающему фрагменту), которое сохраняет реактивность антитела, не относящегося к человеку, будучи при этом менее иммуногенным для человека. Этого можно достичь, например, путем сохранения областей CDR, не относящихся к человеку, и замены оставшихся частей антитела человеческими аналогами (т. е., константной области, а также каркасных частей вариабельной области). Дополнительные модификации каркасной области могут быть выполнены в каркасных последовательностях человека, а

также в последовательностях CDR, полученных из зародышевой линии другого вида млекопитающих. Гуманизированные антитела по изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые человеческими последовательностями (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*, или консервативную замену для обеспечения стабильности или производства). См., например, Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855, 1984; Morrison and Oi, Adv. Immunol., 44:65-92, 1988; Verhoeyen et al., Science, 239: 1534-1536, 1988; Padlan, Molec. Immun., 28:489-498, 1991; и Padlan, Molec. Immun., 31: 169-217, 1994. Другие примеры технологии инженерии гуманизации включают, но не ограничиваются ими, технологию Хома, раскрытую в патенте США № 5766886.

[0074] Термин «рекомбинантное гуманизированное антитело», используемый в настоящем описании, включает все человеческие антитела, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными способами, такие как антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии гуманизированного антитела, например, из трансфектомы, и антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими способами, которые включают сплайсинг всех или части последовательностей гена иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК.

[0075] Предпочтительно полиспецифические антитела по изобретению являются гуманизированными. Более предпочтительно полиспецифические антитела по изобретению являются гуманизированными и содержат CDR, полученные из кролика.

[0076] Используемый в настоящем описании термин «полиспецифическое антитело» относится к антителу, которое связывается с двумя или более различными эпитопами по меньшей мере на двух или более различных мишенях (например, IL-4R и IL-31). Предпочтительно полиспецифические антитела по изобретению являются биспецифическими. Термин «биспецифическое антитело», используемый в настоящем описании, относится к антителу, которое связывается по меньшей мере с двумя разными эпитопами на двух разных мишенях (например, IL-4R и IL-31).

[0077] Термин «эпитоп» означает белковую детерминанту, способную специфически связываться с антителом. Эпитопы обычно состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи сахаров, и обычно имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда. «Конформационные» и «линейные» эпитопы различаются тем, что связывание с первыми, но не со вторыми, теряется в присутствии денатурирующих растворителей.

[0078] Термин «конформационный эпитоп», используемый в настоящем описании, относится к аминокислотным остаткам антигена, которые объединяются на поверхности, когда полипептидная цепь складывается с образованием нативного белка.

[0079] Термин «линейный эпитоп» относится к эпитопу, в котором все точки взаимодействия между белком и взаимодействующей молекулой (такой как антитело)

расположены линейно вдоль первичной аминокислотной последовательности белка (непрерывно).

[0080] Используемый в настоящем описании термин «распознавать» относится к его антигенсвязывающему фрагменту антитела, который находит и взаимодействует (например, связывается) со своим конформационным эпитопом.

[0081] Термин «авидность», используемый в настоящем описании, относится к информативному показателю общей стабильности или силы комплекса антитело-антиген. Это контролируется тремя основными факторами: аффинностью эпитопа антитела; валентностью антигена и антитела и структурным расположением взаимодействующих частей. В конечном итоге эти факторы определяют специфичность антитела, то есть вероятность того, что конкретное антитело связывается с конкретным антигенным эпитопом.

[0082] Соответственно, полиспецифические антитела по изобретению содержат один или два IL4R-BD. В частности, полиспецифические антитела по изобретению содержат два IL4R-BD.

[0083] Термин «IL-4R» относится, в частности, к IL-4R человека с идентификационным номером UniProt P24394. Соответственно, IL4R-BD по настоящему изобретению нацелен на IL-4R, в частности, на IL-4R человека. В частности, полиспецифические антитела по изобретению содержат один или два IL4R-BD, нацеленных на IL-4R человека и яванского макака (*Macaca fascicularis*). Более конкретно, полиспецифическое антитело по изобретению содержит один или два IL4R-BD, которые нацелены на IL-4R человека, яванского макака (*Macaca fascicularis*) и игрунки (*Callithrix jacchus*).

[0084] Соответственно, IL4R-BD характеризуются одним или более из следующих параметров:

а. связываются с IL-4R человека с одновалентной константой диссоциации (KD) от 0,1 до 200 пМ, конкретно, с KD от 0,1 до 100 пМ, в частности от 0,1 до 50 пМ, при измерении с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR), конкретно, где указанный IL4R-BD представлены в формате scFv;

б. являются перекрестно-реактивными с IL4R *Macaca fascicularis* (*Cynomolgus*), в частности, связываются, в частности, связываются с IL-4R яванского макака с одновалентной KD от 1 пМ до 5 нМ, конкретно от 1 пМ до 3 нМ, конкретно от 1 пМ до 2 нМ, как измерено с помощью SPR, конкретно, где указанные IL4R-BD представлены в формате scFv;

с. являются перекрестно-реактивными с IL-4R *Callithrix jacchus* (игрунка), в частности, связываются с IL-4R игрунки с одновалентной KD от 1 пМ до 5 нМ, конкретно, от 1 пМ до 3 нМ, конкретно от 1 пМ до 2 нМ, как измерено SPR, конкретно, где указанные IL4R-BD представлены в формате scFv;

д. нейтрализуют индуцированную IL-4 человека передачу сигналов с IC50 от 0,01 до 5 нг/мл, конкретно с IC50 от 0,01 до 3 нг/мл, конкретно с IC50 от 0,01 до 1,5 нг/мл, как

измерено в анализе репортерного гена *stat6* в клетках HEK-Blue, где указанные IL4R-BD представлены в формате scFv;

e. нейтрализуют индуцированную IL-13 человека передачу сигналов с IC50 от 0,01 до 10 нг/мл, конкретно с IC50 от 0,01 до 5 нг/мл, конкретно с IC50 от 0,01 до 2,5 нг/мл, как измерено в анализе репортерного гена *stat6* в клетках HEK-Blue, где указанные IL4R-BD представлены в формате scFv; и/или

f. ингибируют связывание IL-4 человека с IL-4R человека с IC50 от 0,01 до 10 нг/мл, конкретно, с IC50 от 0,01 до 5 нг/мл, конкретно с IC50 от 0,01 до 2 нг/мл, как измерено в конкурентном ИФА, где указанные IL4R-BD представлены в формате scFv.

[0085] Термин «клетки HEK-Blue» или «HEK-Blue», используемый в настоящем описании, относится к коммерчески доступным эмбриональным клеткам почек человека, которые трансфицированы и стабильно экспрессируют репортерный ген оптимизированной секретрируемой эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP) под контролем промотора, индуцируемого фактором транскрипции NF-κB. Уровень белка SEAP, высвобождаемого в культуральную среду, обычно используется в качестве меры активации NF-κB.

[0086] Используемый в настоящем описании термин «аффинность» относится к силе взаимодействия между антителом и антигеном в отдельных антигенных сайтах. Внутри каждого антигенного сайта варибельная область «плеча» антитела взаимодействует посредством слабых нековалентных сил с антигеном в многочисленных сайтах; чем больше взаимодействий, тем сильнее аффинность.

[0087] «Аффинность связывания» обычно относится к силе общей суммы нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антитела) и его партнера по связыванию (например, антигена или более конкретно, эпитопа на антигене). Если не указано иное, используемые в настоящем описании термины «аффинность связывания», «связывать с», «связывается с» или «связывание с» относятся к внутренней аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами связывающей пары (например, фрагмент антитела и антиген). Аффинность молекулы X к ее партнеру Y обычно можно представить константой диссоциации (KD). Аффинность можно измерить обычными способами, известными в данной области, включая описанные в настоящем документе. Антитела с низкой аффинностью обычно медленно связываются с антигенами и склонны легко диссоциировать, тогда как антитела с высокой аффинностью обычно связывают антигены быстрее и имеют тенденцию оставаться связанными дольше. В данной области известны различные способы измерения аффинности связывания, любой из которых можно использовать для целей настоящего изобретения. Конкретные иллюстративные и примерные варианты осуществления для измерения аффинности связывания, т. е. силы связывания описаны ниже.

[0088] Термин «Kassoc», «Ka» или «Kon», используемый в настоящем описании, предназначен для обозначения скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген, тогда как термин «Kdis», «Kd» или «Koff», используемый в настоящем описании, предназначен для обозначения скорости диссоциации конкретного

взаимодействия антитело-антиген. В одном варианте осуществления термин «KD», используемый в настоящем описании, предназначен для обозначения константы диссоциации, которая получается из отношения K_d к K_a (т. е. K_d/K_a) и выражается в виде молярной концентрации (M). « K_D » или «значение K_D » или «KD» или «значение KD» согласно настоящему изобретению в одном варианте осуществления измеряют с использованием анализов поверхностного плазмонного резонанса.

[0089] Аффинность к рекомбинантному IL-4R человека, рекомбинантному IL-4R яванского макака и рекомбинантному IL-4R игрушки определяют измерениями поверхностного плазмонного резонанса (SPR), как описано в параграфах [0187] и [0188] (scFv) и [0265] (полиспецифические молекулы). Аффинность к рекомбинантному IL-31 человека, рекомбинантному IL-31 яванского макака и рекомбинантному IL-31 игрушки определяют измерениями поверхностного плазмонного резонанса (SPR), как описано в параграфах [0209] (scFv) и [0267] (полиспецифические молекулы).

[0090] Соответственно, полиспецифическое антитело по изобретению действует как антагонист IL-4R. Другими словами, IL4R-BD полиспецифического антитела по изобретению является ингибитором передачи сигналов IL-4R. Термин «блокатор», «ингибитор» или «антагонист» в данном контексте относится к антителу или его связывающему домену, которое ингибирует или снижает биологическую активность антигена, с которым оно связывается. IL4R-BD полиспецифического антитела по изобретению связываются с IL-4R, тем самым блокируя связывание IL-4 с IL-4R, в частности связывание как IL-4, так и IL-13 с IL-4R, что приводит к снижению функции IL-4R.

[0091] Соответственно, IL4R-BD полиспецифического антитела по настоящему изобретению дополнительно характеризуются одним или более из следующих параметров:

g. в формате scFv имеет температуру плавления (T_m), определенную с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF), по меньшей мере 63°C , конкретно, по меньшей мере 65°C , конкретно, по меньшей мере 67°C , конкретно, по меньшей мере 69°C , конкретно по меньшей мере 70°C , конкретно по меньшей мере 71°C , конкретно по меньшей мере 72°C , в частности, где указанные scFv включают в состав в 50 mM фосфатно-цитратном буфере с 150 mM NaCl при pH 6,4;

h. в формате scFv имеет потерю содержания мономера после хранения в течение четырех недель при 4°C менее 5%, когда указанные scFv имеют начальную концентрацию 10 мг/мл, и, в частности, где указанные scFv включают в состав в 50 mM фосфатно-цитратном буфере с 150 mM NaCl при pH 6,4; и/или

i. в формате scFv имеет потерю содержания мономера после 5 циклов замораживания-оттаивания менее 5%, например, менее 4%, менее 3%, предпочтительно менее 2%, когда указанные scFv имеют начальную концентрацию 10 мг/мл и, в частности, когда указанные scFv включают в состав в 50 mM фосфатно-цитратном буфере с 150 mM NaCl при pH 6,4.

[0092] DSF описан ранее (Egan, et al., MAbs, 9(1) (2017), 68-84; Niesen, et al., Nature

Protocols, 2(9) (2007) 2212-2221). Середину перехода для термического развертывания конструкций scFv определяют с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии с использованием флуоресцентного красителя SYPRO® Orange (см. Wong & Raleigh, Protein Science 25 (2016) 1834-1840). Образцы в фосфатно-цитратном буфере с pH 6,4 готовят при конечной концентрации белка 50 мкг/мл и содержат конечную концентрацию 5x SYPRO® Orange в общем объеме 100 мкл. Двадцать пять микролитров подготовленных образцов добавляют в трех экземплярах в планшеты для ПЦР AB gene с белыми стенками. Анализ проводится на аппарате количественной ПЦР, используемом в виде термоциклера, а эмиссия флуоресценции обнаруживается с использованием специальной программы калибровки красителя. Планшет для ПЦР, содержащий испытуемые образцы, подвергают линейному изменению температуры от 25°C до 96°C с шагом 1°C с 30-секундными паузами после каждого повышения температуры. Общее время анализа примерно 2 часа. Tm рассчитывают с помощью программного обеспечения GraphPad Prism с использованием математического метода второй производной для расчета точки перегиба кривой. Сообщаемая Tm представляет собой среднее значение трех измерений.

[0093] Потерю содержания мономера определяют по площади под расчетной кривой хроматограмм SE-HPLC. SE-HPLC представляет собой метод разделения на основе твердой неподвижной фазы и жидкой подвижной фазы, как указано в USP Pharmacopeia (USP), глава 621. Этот метод разделяет молекулы в зависимости от их размера и формы с использованием гидрофобной неподвижной фазы и водной подвижной фазы. Разделение молекул происходит между свободным объемом (V₀) и общим объемом проницаемости (V_T) конкретной колонки. Измерения методом SE-HPLC проводят на системе Chromaster HPLC (Hitachi High-Technologies Corporation), оснащенной автоматическим вводом пробы и УФ-детектором, настроенным на длину волны детектирования 280 нм. Оборудование управляется программным обеспечением EZChrom Elite (Agilent Technologies, версия 3.3.2 SP2), которое также поддерживает анализ полученных хроматограмм. Пробы белка очищают центрифугированием и перед введением выдерживают при температуре 4-6°C в автосэмплере. Для анализа образцов scFv используют колонку Shodex KW403-4F (Showa Denko Inc., № F6989202) с подвижной фазой стандартизированного забуференного солевого раствора (50 мМ фосфата натрия, pH 6,5, 300 мМ хлорида натрия) при рекомендуемой скорости потока 0,35 мл/мин. Целевая загрузка образца на инъекцию составляет 5 мкг. Образцы детектируют УФ-детектором при длине волны 280 нм, а данные регистрируют с помощью подходящего набора программ. Полученные хроматограммы анализируют в диапазоне от V₀ до V_T, исключая, таким образом, пики, связанные с матрицей, с временем элюирования >10 мин.

[0094] Соответственно, IL4R-BD полиспецифических антител по изобретению представляют собой связывающие домены, представленные в настоящем описании. IL4R-BD полиспецифических антител по изобретению включают, но не ограничиваются ими, гуманизированные IL4R-BD, последовательности которых перечислены в Таблице 1.

[0095] Соответственно, полиспецифические антитела по изобретению содержат

один или два IL31-BD. Конкретно, полиспецифические антитела по изобретению содержат два IL4R-BD.

[0096] Термин «IL-31» или «IL31» относится, в частности, к IL-31 человека с идентификационным номером UniProt Q6EBC2. Соответственно, IL31-BD полиспецифических антител по изобретению нацелен на IL-31, в частности, на IL31 человека, соответствующего UniProt ID Q6EBC2. Конкретно, полиспецифические антитела по изобретению содержат один или два IL31-BD, нацеленных на IL-31 человека и яванского макака (*Macaca fascicularis*).

[0097] Соответственно, IL31-BD, используемые в настоящем изобретении, характеризуются одним или более из следующих параметров:

a. связываются с IL-31 человека с одновалентной константой диссоциации (KD) 5 нМ или менее, конкретно, с одновалентной KD от 5 пМ до 5 нМ, конкретно, от 5 пМ до 2 нМ, конкретно, от 5 до 1000 пМ, как измерено с помощью поверхностного плазмона резонанс (SPR), конкретно, где указанные IL31-BD представлены в формате scFv;

b. являются перекрестно реактивными с IL-31 *Macaca fascicularis* (яванского макака), в частности, связываются с IL-31 яванского макака с одновалентной KD 5 нМ или менее, конкретно, с одновалентной KD от 5 пМ до 5 нМ, конкретно, от 5 пМ до 2 нМ, конкретно, от 5 до 1000 пМ, как измерено с помощью SPR, конкретно, где указанные IL31-BD представлены в формате scFv;

c. ингибируют индуцированную IL-31 человека передачу сигналов при IC50 от 0,1 до 30 нг/мл, конкретно при IC50 от 0,1 до 20 нг/мл, конкретно при IC50 от 0,1 до 10 нг/мл, как измерено в Path Hunter анализе димеризации IL-31RA/OSMRb, где указанный IL31-BD представлен в формате scFv; и/или

d. блокируют связывание IL-31 человека с IL-31R человека с IC50 от 0,1 до 20 нг/мл, конкретно с IC50 от 0,1 до 10 нг/мл, конкретно с IC50 от 0,1 до 6 нг/мл, как измерено в конкурентном ИФА, где указанный IL31-BD представлен в формате scFv.

[0098] Соответственно, IL31-BD полиспецифических антител по настоящему изобретению дополнительно характеризуются одним или более из следующих параметров:

e. в формате scFv имеют температуру плавления (Tm), определенную с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии, по меньшей мере 65°C, предпочтительно по меньшей мере 67°C, более предпочтительно по меньшей мере 69°C, в частности, когда указанные scFv включены в состав в 50 мМ фосфатно-цитратном буфере с 150 мМ NaCl при pH 6,4;

f. в формате scFv имеют потерю содержания мономера после хранения в течение четырех недель при 4°C менее 5%, например, менее 4%, менее 3%, менее 2%, предпочтительно менее 1%, когда указанные scFv находятся в начальной концентрации 10 мг/мл, и, в частности, когда указанные scFv включены в состав в 50 мМ фосфатно-цитратном буфере с 150 мМ NaCl при pH 6,4;

g. в формате scFv имеют потерю содержания мономера после хранения в течение четырех недель при 40°C менее 5%, например, менее 4%, менее 3%, менее 2%,

предпочтительно менее 1%, когда указанные scFv находятся в начальной концентрации 10 мг/мл, и, в частности, когда указанные scFv включены в состав в 50 мМ фосфатно-цитратном буфере с 150 мМ NaCl при pH 6,4;

h. в формате scFv имеют потерю содержания мономера после 3 циклов замораживания-оттаивания менее 5%, например, менее 4%, менее 3%, менее 2%, предпочтительно менее 1%, когда указанные scFv находятся в начальной концентрации 10 мг/мл, и, в частности, когда указанные scFv включены в состав в 50 мМ фосфатно-цитратном буфере с 150 мМ NaCl при pH 6,4; и/или

i. в формате scFv имеют потерю содержания белка после хранения в течение четырех недель при 4°C или 40°C менее 5%, например, менее 4%, менее 3%, менее 2%, предпочтительно менее 1%, когда указанный scFv находится в начальной концентрации 10 мг/мл, и, в частности, когда указанный scFv включен в состав в 50 мМ фосфатно-цитратном буфере с 150 мМ NaCl при pH 6,4.

[0099] Соответственно, IL31-BD полиспецифических антител по изобретению представляют собой связывающие домены, предложенные в настоящем описании. IL31-BD полиспецифических антител по изобретению включают, но не ограничиваются ими, гуманизированные IL31-BD, последовательности которых перечислены в Таблице 2.

[0100] Термин «поливалентное антитело» относится к одной связывающей молекуле с более чем одной валентностью, где «валентность» описывается как количество антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с эпитопами на молекулах-мишенях. Таким образом, одна связывающая молекула может связываться с более чем одним сайтом связывания на молекуле-мишени и/или с более чем одной молекулой-мишенью из-за присутствия более чем одной копии соответствующих антигенсвязывающих фрагментов. Примеры поливалентных антител включают, но не ограничиваются ими, двухвалентные антитела, трехвалентные антитела, четырехвалентные антитела, пятивалентные антитела, шестивалентные антитела и т. п.

[0101] Термин «одновалентное антитело», используемый в настоящем описании, относится к антителу, которое связывается с одной молекулой-мишенью и, более конкретно, с одним эпитопом на молекуле-мишени. Кроме того, термин «связывающий домен» или «одновалентный связывающий домен», используемый в настоящем описании, относится к связывающему домену, который связывается с одним эпитопом на молекуле-мишени.

[0102] В конкретных вариантах осуществления полиспецифические антитела по изобретению содержат один IL4R-BD и один IL-31-BD, т. е. полиспецифические антитела по изобретению являются моновалентными по специфичности как к IL-4R, так и к IL-31.

[0103] В дополнительных конкретных вариантах осуществления полиспецифические антитела по изобретению содержат один IL4R-BD и два IL-31-BD, т. е. полиспецифические антитела по изобретению являются одновалентными в отношении специфичности к IL-4R и двухвалентными в отношении специфичности к IL-31.

[0104] В дополнительных конкретных вариантах осуществления

полиспецифические антитела по изобретению содержат два IL4R-BD и один IL-31-BD, т. е. полиспецифические антитела по изобретению являются двухвалентными в отношении специфичности к IL-4R и одновалентными в отношении специфичности к IL-31.

[0105] В предпочтительных вариантах осуществления полиспецифические антитела по изобретению содержат два IL4R-BD и два IL-31-BD, т. е. полиспецифические антитела по изобретению являются двухвалентными в отношении специфичности к IL-4R и двухвалентными в отношении специфичности к IL-31.

[0106] В случае, если полиспецифические антитела по изобретению содержат два IL4R-BD, указанные два IL4R-BD либо связывают один и тот же эпитоп, либо разные эпитопы на молекуле-мишени IL-4R. Предпочтительно два IL4R-BD связываются с одним и тем же эпитопом на молекуле-мишени IL-4R. Соответственно, полиспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит два идентичных IL4R-BD.

[0107] В случае, когда полиспецифические антитела по изобретению содержат два IL31-BD, указанные два IL31-BD либо связывают один и тот же эпитоп, либо разные эпитопы на молекуле-мишени IL-31. Предпочтительно два IL31-BD связывают один и тот же эпитоп на молекуле-мишени IL-31. Подходящим образом полиспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит два идентичных IL31-BD.

[0108] Термин «один и тот же эпитоп», используемый в настоящем описании, относится к отдельной белковой детерминанте на белке, способной специфически связываться с более чем одним антителом, где эта индивидуальная белковая детерминанта идентична, т. е. состоит из идентичных химически активных поверхностных группировок молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи сахара, имеющие идентичные трехмерные структурные характеристики, а также идентичные характеристики заряда для каждого из указанных антител. Термин «другой эпитоп», используемый в настоящем описании в связи с конкретным белком-мишенью, относится к отдельным белковым детерминантам на белке, каждая из которых способна специфически связываться с другим антителом, где эти отдельные белковые детерминанты не идентичны для разных антител, т. е. состоят из неидентичных химически активных поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи сахаров, имеющих разные трехмерные структурные характеристики, а также разные характеристики заряда. Эти разные эпитопы могут быть перекрывающимися или не перекрывающимися.

[0109] В конкретных вариантах осуществления полиспецифические антитела по изобретению являются биспецифическими и двухвалентными.

[0110] В дополнительных конкретных вариантах осуществления полиспецифические антитела по изобретению являются биспецифическими и трехвалентными.

[0111] Предпочтительно полиспецифические антитела по изобретению являются биспецифическими и четырехвалентными, т. е. двухвалентными в отношении специфичности к IL-4R и двухвалентными в отношении специфичности к IL-31.

[0112] В конкретном аспекте настоящее изобретение относится к

полиспецифическим антителам, содержащим:

а) два связывающих домена, которые специфически связываются с IL-4R (IL4R-BD),
и

б) два связывающих домена, которые специфически связываются с IL-31 (IL31-BD),
где

- указанное полиспецифическое антитело содержит область IgG;

- каждый из указанных IL4R-BD содержит
последовательность HCDR1 SEQ ID NO: 1,
последовательности HCDR2 SEQ ID NO: 2,
последовательность HCDR3 SEQ ID NO: 3,
последовательность LCDR1 SEQ ID NO: 7,
последовательность LCDR2 SEQ ID NO: 8, и
последовательности LCDR3 SEQ ID NO: 9; и

- каждый из указанных IL31-BD содержит
последовательность HCDR1 SEQ ID NO: 12,
последовательности HCDR2 SEQ ID NO: 13,
последовательности HCDR3 SEQ ID NO: 14,
последовательность LCDR1 SEQ ID NO: 17 или 18,
последовательность LCDR2 SEQ ID NO: 19, и
последовательности LCDR3 SEQ ID NO: 20.

[0113] Другие переменные домены, используемые в изобретении, включают аминокислотные последовательности, которые были подвергнуты мутации, но имеют по меньшей мере 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичности в областях CDR с областями CDR, изображенными в последовательностях, описанных в Таблицах 1 и 2. Другие переменные домены, используемые в изобретении, включают мутантные аминокислотные последовательности, в которых не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот были подвергнуты мутации в областях CDR по сравнению с областями CDR, изображенными в последовательности, описанной в Таблицах 1 и 2.

[0114] Соответственно, домены VH связывающих доменов полиспецифических антител по изобретению принадлежат к семейству VH3 или VH4. В одном варианте осуществления связывающий домен, используемый в изобретении, содержит домен VH, принадлежащий к семейству VH3. В контексте настоящего изобретения термин «принадлежащий к семейству VHx (или семейству VLx)» означает, что каркасные последовательности FR1-FR3 проявляют наивысшую степень гомологии с указанным семейством VHx (или семейством VLx, соответственно). Примеры семейств VH и VL приведены в Knappik et al., J. Mol. Biol., 296 (2000) 57-86 или в WO 2019/057787. Конкретный пример домена VH, принадлежащего семейству VH3, представлен SEQ ID NO: 23, а конкретный пример домена VH, принадлежащего семейству VH4, представлен SEQ ID NO: 24. В частности, каркасные области FR1-FR3, взятые из SEQ ID NO: 23, принадлежат семейству VH3 (Таблица 3, области, выделенные жирным шрифтом).

Соответственно, VH, принадлежащая семейству VH3, как используется в настоящем описании, представляет собой VH, содержащую FR1-FR3, имеющие по меньшей мере 85%, конкретно, по меньшей мере 90%, более конкретно, по меньшей мере 95% идентичности последовательности FR1-FR3 SEQ ID NO: 23. Альтернативные примеры последовательностей VH3 и VH4, а также примеры других последовательностей VHx можно найти в Knappik et al., J. Mol. Biol., 296 (2000) 57-86 или в WO 2019/057787.

[0115] Соответственно, домены VL связывающих доменов, используемых в изобретении, включают: каркасы V_k FR1, FR2 и FR3, конкретно каркасы V_{k1} или V_{k3}, конкретно каркасы V_{k1} FR1-FR3, и каркас FR4, выбранный из FR4 V_k. В случае, когда указанные связывающие домены имеют формат scFv, указанные связывающие домены включают: каркасы V_k FR1, FR2 и FR3, конкретно каркасы V_{k1} или V_{k3}, конкретно каркасы V_{k1} FR1-FR3, и каркас FR4, выбранный из V_k FR4 и V_λ FR4, конкретно V_λ FR4.

[0116] Подходящие каркасы V_{k1} FR1-FR3, а также пример V_λ FR4 представлены в SEQ ID NO: 25 (Таблица 3, области FR выделены нежирным шрифтом). Альтернативные примеры последовательностей V_{k1} и примеры последовательностей V_{k2}, V_{k3} или V_{k4} можно найти в Knappik et al., J. Mol. Biol., 296 (2000) 57-86. Подходящие каркасы V_{k1} FR1-FR3 содержат аминокислотные последовательности, имеющие по меньшей мере 70, 80, 90 процентов идентичности с аминокислотными последовательностями, соответствующими FR1-FR3 и взятыми из SEQ ID NO: 25 (Таблица 3, области FR выделены нежирным шрифтом). Подходящими V_λ FR4 представлены в SEQ ID NO: 26 - SEQ ID NO: 32 и в SEQ ID NO: 33, содержащие один остаток цистеина, конкретно, в случае, когда второй одиночный цистеин присутствует в соответствующей цепи VH, в частности? в положении 51 (нумерация АНо) VH для образования междоменной дисульфидной связи. В одном варианте осуществления домены VL связывающих доменов полиспецифических антител по изобретению, будучи в формате scFv, содержат V_λ FR4, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70, 80, 90 процентов идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из любой из SEQ ID NO: 26 - SEQ ID NO: 33, конкретно с SEQ ID NO: 26 или 33.

[0117] Связывающие домены полиспецифических антител по изобретению содержат домен VH, указанный в Таблицах 1 и 2. Соответственно, связывающие домены, используемые в изобретении, содержат аминокислотную последовательность VH, указанную в одной из Таблиц 1 и 2, где не более 20 аминокислот в каркасных последовательностях (т. е., последовательностях, которые не являются последовательностями CDR), были подвергнуты мутации (где мутация представляет собой, в качестве различных неограничивающих примеров, добавление, замену или делецию). Соответственно, связывающие домены полиспецифических антител по изобретению содержат аминокислотную последовательность VH, указанную в одной из Таблиц 1 и 2, где не более 15 аминокислот, конкретно, не более 10 аминокислот, конкретно, не более 5 аминокислот в каркасных последовательностях (т. е., последовательностях, которые не являются последовательностями CDR), были подвергнуты мутации (где мутация

представляет собой, в качестве различных неограничивающих примеров, добавление, замену или делецию). Другие связывающие домены, используемые в изобретении, включают аминокислоты, которые были подвергнуты мутации, но имеют по меньшей мере 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичности в областях VH с областями VH, изображенными в соответствующих последовательностях, описанных в одной из Таблиц 1 и 2, включая домены VH, содержащие по меньшей мере положения 5-140 (нумерация АНо), в частности, по меньшей мере положения 3-145 одной из последовательностей, показанных в Таблицах 1 и 2.

[0118] В частности, связывающие домены полиспецифических антител по изобретению содержат домен VL, указанный в одной из Таблиц 1 и 2. Соответственно, связывающие домены полиспецифических антител по изобретению содержат аминокислотную последовательность VL, указанную в одной из Таблиц 1 и 2, где не более чем примерно 20 аминокислот в каркасных последовательностях (т. е., последовательностях, которые не являются последовательностями CDR), были подвергнуты мутации (где мутация представляет собой, в качестве различных неограничивающих примеров, добавление, замену или делецию). Соответственно, связывающие домены полиспецифических антител по изобретению содержат аминокислотную последовательность VL, указанную в одной из Таблиц 1 и 2, где не более чем примерно 15 аминокислот, конкретно, не более 10 аминокислот, конкретно, не более 5 аминокислот в каркасных последовательностях (т. е., последовательностях, которые не являются последовательностями CDR), были подвергнуты мутации (где мутация представляет собой, в качестве различных неограничивающих примеров, добавление, замену или делецию). Другие связывающие домены, используемые в изобретении, включают аминокислоты, которые были подвергнуты мутации, но имеют по меньшей мере 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичности в областях VL с областью VL, изображенной в последовательностях, описанных в Таблицах 1 и 2, включая домены VL, содержащие по меньшей мере положения 5-140 (нумерация АНо), конкретно, по меньшей мере положения 3-145 одной из последовательностей, показанных в Таблицах 1 и 2.

[0119] В контексте настоящего изобретения термин «связывающий домен, используемый в настоящем изобретении» относится к связывающему домену как таковому, т. е. независимо от полиспецифического контекста и, в частности, к связывающему домену, содержащемуся в полиспецифической конструкции, например, один из связывающих доменов, включенных в биспецифическую, триспецифическую или тетраспецифическую конструкцию.

[0120] Соответственно, связывающие домены полиспецифических антител по изобретению выбирают из группы, состоящей из: Fab, Fv, dsFv и scFv.

[0121] Соответственно, связывающие домены полиспецифических антител по изобретению функционально связаны. Связывающие домены полиспецифических антител по изобретению способны одновременно связываться с соответствующими антигенами или

рецепторами. Термин «одновременно», используемый в данном контексте, относится к одновременному связыванию по меньшей мере одного из IL4R-BD и по меньшей мере одного из IL31-BD.

[0122] Полиспецифические антитела по настоящему изобретению, содержащие один или два IL4R-BD и один или два IL31-BD, где указанные один или два IL4R-BD и указанные один или два IL31-BD функционально связаны друг с другом.

[0123] Используемый в настоящем описании термин «функционально связанный» означает, что две молекулы (например, полипептиды, домены, связывающие домены) присоединяются таким образом, что каждая молекула сохраняет функциональную активность. Две молекулы могут быть «функционально связаны» вне зависимости от того, связаны они прямо или косвенно (например, через линкер, через фрагмент, через линкер с фрагментом). Термин «линкер» относится к пептиду или другому фрагменту, который необязательно расположен между связывающими доменами или фрагментами антител, используемыми в изобретении. Для ковалентного связывания молекул друг с другом можно использовать ряд стратегий. Они включают, но не ограничиваются этим, полипептидные связи между N- и C-концами белков или белковых доменов, связи через дисульфидные связи и связи через химические сшивающие реагенты. В одном аспекте этого варианта осуществления линкер представляет собой пептидную связь, полученную с помощью рекомбинантных методов или пептидного синтеза. Выбор подходящего линкера для конкретного случая, когда необходимо соединить две полипептидные цепи, зависит от различных параметров, включая, но не ограничиваясь этим, природу двух полипептидных цепей (например, олигомеризуются ли они естественным образом), расстояние между N- и C-концами, которые должны быть соединены, если известно, и/или устойчивость линкера к протеолизу и окислению. Кроме того, линкер может содержать аминокислотные остатки, обеспечивающие гибкость.

[0124] В контексте настоящего изобретения термин «полипептидный линкер» относится к линкеру, состоящему из цепи аминокислотных остатков, соединенных пептидными связями, который соединяет два домена, каждый из которых присоединен к одному концу линкера. Полипептидный линкер должен иметь длину, достаточную для связывания двух молекул таким образом, чтобы они принимали правильную конформацию по отношению друг к другу, чтобы они сохраняли желаемую активность. В конкретных вариантах осуществления полипептидный линкер имеет непрерывную цепь из 2-30 аминокислотных остатков (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 аминокислотных остатков). Кроме того, аминокислотные остатки, выбранные для включения в полипептидный линкер, должны проявлять свойства, которые существенно не влияют на активность полипептида. Таким образом, линкерный пептид в целом не должен нести заряд, который несовместим с активностью полипептида, или мешать внутренней укладке, или образовывать связи или другие взаимодействия с аминокислотными остатками в одном или более мономерах, которые серьезно препятствуют связыванию мономерных доменов рецептора. В

конкретных вариантах осуществления полипептидный линкер представляет собой неструктурированный полипептид. Полезные линкеры включают глицин-сериновые или GS линкеры. Под линкерами «Gly-Ser» или «GS» подразумеваются последовательно соединенные полимеры глицинов и серинов (включая, например, (Gly-Ser)_n, (GSGGS)_n, (GGGGS)_n и (GGGS)_n, где n представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере один), глицин-аланиновые полимеры, аланин-сериновые полимеры и другие гибкие линкеры, такие как трос (tether) для калиевого канала shaker, и большое разнообразие других гибких линкеров, которые будут оценены специалистами в данной области. Предпочтительны глицин-сериновые полимеры, поскольку олигопептиды, содержащие эти аминокислоты, относительно неструктурированы и, следовательно, могут служить нейтральным связующим звеном между компонентами. Во-вторых, серин является гидрофильным и, следовательно, способен растворять то, что может быть глобулярной цепью глицина. В-третьих, было показано, что подобные цепи эффективны для соединения субъединиц рекомбинантных белков, таких как одноцепочечные антитела.

[0125] В одной группе вариантов осуществления полиспецифическое антитело по изобретению находится в формате, выбранном из слияния (scFv)₂-Fc-(scFv)₂ (ADAPTIR); DVD-Ig; DARTTM и TRIDENTTM. Термин «DARTTM» относится к формату антител, разработанному MacroGenics, который содержит полипептид Fc-области иммуноглобулина и один или два биспецифических Fv-связывающих домена, слитых с N-концом одной тяжелой цепи Fc-области или с обоими N-концами тяжелых цепей Fc-области. Термин «TRIDENTTM» относится к формату антител, разработанному MacroGenics, который содержит полипептид Fc-области иммуноглобулина, один биспецифический Fv-связывающий домен и один Fab-фрагмент. Как биспецифический Fv-связывающий домен, так и Fab-фрагмент сливаются с соответствующими N-концами двух тяжелых цепей полипептида Fc-области.

[0126] В другой группе вариантов осуществления формат полиспецифических антител по настоящему изобретению выбран из двухвалентных биспецифических форматов IgG, трехвалентных биспецифических форматов IgG и четырехвалентных биспецифических форматов IgG. В частности, формат указанных полиспецифических антител выбран из IgG на основе KiH, таких как DuoBodies (биспецифические IgG, полученные по технологии Duobody) (MAbs. 2017 Feb/Mar;9(2):182-212. doi: 10.1080/19420862.2016.1268307); DVD-Ig; Слияния IgG-scFv, такие как CODV-IgG, Morrison (слияние IgG CH3-scFv (Morrison-H) или слияние IgG CL-scFv (Morrison-L)), bsAb (scFv, связанный с C-концом легкой цепи), Bs1Ab (scFv, связанный с N-концом легкой цепи), Bs2Ab (scFv, связанный с N-концом тяжелой цепи), Bs3Ab (scFv, связанный с C-концом тяжелой цепи), Ts1Ab (scFv, связанный с N-концом обеих тяжелой цепи и легкой цепи) и Ts2Ab (dsScFv, связанный с C-концом тяжелой цепи). Более конкретно формат указанного полиспецифического антитела выбран из IgG на основе KiH, таких как DuoBodies; DVD-Ig; CODV-IgG и Morrison (слияние IgG CH3-scFv (Morrison-H) или слияние IgG CL-scFv (Morrison-L)), конкретно от DVD-Ig и Morrison (слияние IgG CH3-scFv

(Morrison-H) или слияние IgG CL-scFv (Morrison-L)).

[0127] В конкретных вариантах осуществления изобретения формат указанных полиспецифических антител выбран из форматов Morrison, то есть формата Morrison-L и формата Morrison-H. Форматы Morrison-L и Morrison-H, используемые в настоящем изобретении, представляют собой четырехвалентные и биспецифические молекулярные форматы, несущие Fc-область IgG, в частности Fc-область IgG4. Два высокостабильных связывающих домена scFv, в которых легкая цепь содержит от V_k FR1-FR3 в комбинации с V_λ FR4 (λ-сеп), также называемые в настоящем документе λ-сеп scFv, сливаются через линкер L1 с C-концами тяжелой цепи (Morrison-H) или легкой цепи (Morrison-L) C-концы (см. Фигуру 2).

[0128] Линкер L1 представляет собой пептид из 2-30 аминокислот, более конкретно из 5-25 аминокислот и наиболее предпочтительно из 10-20 аминокислот. В конкретных вариантах осуществления указанный линкер L1 содержит одну или более единиц из четырех (4) аминокислотных остатков глицина и одного (1) аминокислотного остатка серина (GGGS)_n, где n=1, 2, 3, 4 или 5, конкретно, n=2.

[0129] В конкретном варианте осуществления изобретения полиспецифические антитела имеют формат Morrison-L, как определено выше. В другом конкретном варианте осуществления изобретения полиспецифические антитела имеют формат Morrison-H, как определено выше.

[0130] Домены scFv полиспецифических антител по изобретению содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), соединенные линкером L2.

[0131] Линкер L2 представляет собой пептид из 10-40 аминокислот, более конкретно 15-30 аминокислот и наиболее конкретно 20-25 аминокислот. В конкретных вариантах осуществления указанный линкер L2 содержит одну или более единиц из четырех (4) аминокислотных остатков глицина и одного (1) аминокислотного остатка серина (GGGS)_n, где n=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8, конкретно n=4.

[0132] Конкретными, но не ограничивающими примерами полиспецифических антител по изобретению являются антитела Morrison-L PRO2206, PRO2207, PRO2208 и антитела Morrison-H PRO2198, PRO2199, PRO2200, PRO2201, последовательности которых перечислены в Таблице 4.

[0133] Полиспецифические антитела по изобретению могут быть получены с использованием любого подходящего способа получения антител, известного в данной области (см., например, Fischer, N. & Leger, O., *Pathobiology* 74 (2007) 3-14 в отношении производства биспецифических конструкций; Hornig, N. & Färber-Schwarz, A., *Methods Mol. Biol.*, 907 (2012) 713-727 и WO 99/57150 в отношении биспецифических диантител и тандемных scFv). Конкретные примеры подходящих способов получения биспецифической конструкции дополнительно включают, среди прочего, технологии Genmab (см. Labrijn et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110 (2013) 5145-5150) и Merus (см. de Kruif et al., *Biotechnol. Bioeng.* 106 (2010) 741-750). Способы получения биспецифических антител, содержащих

функциональную часть Fc антитела, также известны в данной области (см., например, Zhu et al., *Cancer Lett.* 86 (1994) 127-134); и Suresh et al., *Methods Enzymol.* 121 (1986) 210-228).

[0134] Эти способы обычно включают получение моноклональных антител, например, путем слияния клеток миеломы с клетками селезенки мыши, которая была иммунизирована желаемым антигеном с использованием гибридной технологии (см., например, Yokoyama et al., *Curr. Protoc. Immunol. Chapter 2, Unit 2.5*, 2006) или с помощью конструирования рекомбинантных антител (клонирование репертуара или фаговый дисплей/дрожжевой дисплей) (см., например, Chames & Baty, *FEMS Microbiol. Letters* 189 (2000) 1-8), а также комбинацию антигенсвязывающих доменов или их фрагментов или частей двух или более различных моноклональных антител для получения биспецифической или полиспецифической конструкции с использованием известных методов молекулярного клонирования.

[0135] Полиспецифические антитела по изобретению могут быть получены путем конъюгации составляющих специфичностей связывания с использованием способов, известных в данной области. Например, каждая специфичность связывания биспецифической молекулы может быть получена отдельно, а затем конъюгирована друг с другом. Когда специфичностью связывания являются белки или пептиды, для ковалентной конъюгации можно использовать различные связывающие или сшивающие агенты. Примеры сшивающих агентов включают протеин А, карбодиимид, N-сукцинимидил-5-ацетилтиоацетат (SATA), 5,5'-дитиобис(2-нитробензойную кислоту) (DTNB), о-фенилендималеимид (oPDM), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) и сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилат (сульфо-SMCC) (см. например Karpovsky et al., 1984 *J. Exp. Med.* 160: 1686; Liu, M A et al., 1985 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8648). Другие методы включают методы, описанные в Paulus, 1985 *Behring Ins. Mitt.* № 78, 118-132; Brennan et al., 1985 *Science* 229:81-83, и Glennie et al., 1987 *J. Immunol.* 139: 2367-2375. Конъюгирующие агенты представляют собой SATA и сульфо-SMCC, оба доступны от Pierce Chemical Co. (Рокфорд, Иллинойс, США).

[0136] Когда специфичностью связывания являются антитела, они могут быть конъюгированы за счет сульфгидрильной связи С-концевых шарнирных областей двух тяжелых цепей. В конкретном варианте осуществления перед конъюгацией шарнирную область модифицируют, чтобы она содержала нечетное количество сульфгидрильных остатков, например один.

[0137] Альтернативно, две или более специфичностей связывания могут быть закодированы в одном и том же векторе и экспрессированы и собраны в одной и той же клетке-хозяине. Этот метод конкретно полезен, когда биспецифическая молекула представляет собой слитый белок mAbxFab, mAbxscFv, mAbxdsFv или mAbxFv. Способы получения полиспецифических антител и молекул описаны, например, в US 5260203; US 5455030; US 4881175; US 5132405; US 5091513; US 5476786; US 5013653; US 5258498; и US 5482858.

[0138] Связывание полиспецифических антител с их специфическими мишенями

можно подтвердить, например, с помощью твердофазного иммуоферментного анализа (ИФА), радиоиммуноанализа (REA), FACS-анализа, биоанализа (например, ингибирование роста) или вестерн-блот-анализа. Каждый из этих анализов обычно выявляет наличие комплексов белок-антитело, представляющих особый интерес, с использованием меченого реагента (например, антитела), специфичного в отношении интересующего комплекса.

[0139] Еще в одном аспекте изобретение относится к нуклеиновой кислоте или двум нуклеиновым кислотам, кодирующим полиспецифическое антитело по изобретению. Такие нуклеиновые кислоты можно оптимизировать для экспрессии в клетках млекопитающих.

[0140] Термин «нуклеиновая кислота» используется здесь взаимозаменяемо с термином «полинуклеотид(ы)» и относится к одному или более дезоксирибонуклеотидам или рибонуклеотидам и их полимерам либо в одноцепочечной, либо в двухцепочечной форме. Термин включает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги нуклеотидов или модифицированные остатки или связи остова, которые являются синтетическими, встречающимися в природе и не встречающимися в природе, которые обладают сходными связывающими свойствами по сравнению с эталонной нуклеиновой кислотой и которые метаболизируются сходным образом. к эталонным нуклеотидам. Примеры таких аналогов включают без ограничения фосфоротиоаты, фосфорамидаты, метилфосфонаты, хиральные метилфосфонаты, 2-О-метилрибонуклеотиды, пептидно-нуклеиновые кислоты (ПНК). Если не указано иное, конкретная нуклеиновая кислота также подразумевает ее консервативно модифицированные варианты (например, замены вырожденных кодонов) и нуклеиновые кислоты с комплементарными последовательностями, а также нуклеиновые кислоты с явно указанной последовательностью. В частности, как подробно описано ниже, замена вырожденных кодонов может быть достигнута путем создания нуклеиновых кислот, в которых третье положение одного или более выбранных (или всех) кодонов заменено остатками смешанного основания и/или дезоксиинозина (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* . 19: 5081, 1991; Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608, 1985; и Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98, 1994).

[0141] Изобретение относится к по существу очищенным молекулам нуклеиновых кислот, которые кодируют полипептиды, включающие сегменты или домены полиспецифического антитела, описанного выше. При экспрессии из подходящих экспрессирующих векторов полипептиды, кодируемые этими молекулами нуклеиновых кислот, способны проявлять антигенсвязывающие способности полиспецифического антитела по настоящему изобретению.

[0142] Полинуклеотидные последовательности могут быть получены с помощью твердофазного синтеза ДНК *de novo* или с помощью ПЦР-мутагенеза существующей последовательности (например, последовательности, как описано в приведенных ниже примерах), кодирующие полиспецифическое антитело по изобретению или его фрагменты или его связывающие домены. Прямой химический синтез нуклеиновых кислот может быть осуществлен способами, известными в данной области техники, такими как

фосфотриэфирный метод Narang et al., 1979, Meth. Enzymol. 68:90; фосфодиэфирный метод Brown et al., Meth. Enzymol. 68: 109, 1979; диэтилфосфорамидитный метод Beaucage et al., Tetra. Lett., 22: 1859, 1981; и способ с твердой подложкой из US 4458066. Введение мутаций в полинуклеотидную последовательность с помощью ПЦР можно осуществить, как описано, например, в PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H. A. Erlich (Ed.), Freeman Press, NY, N.Y., 1992; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al. (Ed.), Academic Press, San Diego, Calif, 1990; Mattila et al., Nucleic Acids Res. 19:967, 1991; и Eckert et al., PCR Methods and Applications 1:17, 1991.

[0143] В изобретении также предложены экспрессирующие векторы и клетки-хозяева для продукции полиспецифического антитела по изобретению или его фрагментов или их связывающих доменов.

[0144] Термин «вектор» предназначен для обозначения молекулы полинуклеотида, способной транспортировать другой полинуклеотид, с которым она связана. Одним типом вектора является «плаزمид», которая относится к кольцевой двухцепочечной петле ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, в котором дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную последовательность точки начала репликации, и эписомные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина после введения в клетку-хозяин и, таким образом, реплицируются вместе с геномом хозяина.

[0145] Более того, некоторые векторы способны управлять экспрессией генов, с которыми они функционально связаны. В настоящем описании такие векторы называются «рекомбинантными экспрессирующими векторами» (или просто «экспрессирующими векторами»). В общем, экспрессирующие векторы, используемые в методах рекомбинантной ДНК часто представлены в виде плазмид. В настоящем описании термины «плаزمид» и «вектор» могут использоваться взаимозаменяемо, поскольку плазмид является наиболее часто используемой формой вектора. Однако предполагается, что изобретение включает такие другие формы экспрессирующих векторов, как вирусные векторы (например, дефектные по репликации ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые выполняют эквивалентные функции. В этом конкретном контексте термин «функционально связанный» относится к функциональной взаимосвязи между двумя или более полинуклеотидными (например, ДНК) сегментами. Как правило, он относится к функциональному взаимодействию транскрипционной регуляторной последовательности с транскрибируемой последовательностью. Например, промоторная или энхансерная последовательность функционально связывается с кодирующей последовательностью если она стимулирует или модулирует транскрипцию кодирующей последовательности в подходящей клетке-хозяине или другой экспрессирующей системе. Как правило, регуляторные последовательности промотора

транскрипции, которые функционально связаны с транскрибируемой последовательностью, физически примыкают к транскрибируемой последовательности, т. е. они цис-действующие. Однако для некоторых транскрипционных регуляторных последовательностей, таких как энхансеры, нет необходимости физически примыкать или находится в непосредственной близости от кодирующих последовательностей, чью транскрипцию они усиливают.

[0146] Для экспрессии полинуклеотидов, кодирующих цепи полиспецифических антител, можно использовать различные экспрессирующие векторы. Для получения антител в клетке-хозяине млекопитающего можно использовать как вирусные, так и невирусные экспрессирующие векторы. Невирусные векторы и системы включают плазмиды, эписомные векторы, обычно с экспрессирующей кассетой для экспрессии белка или РНК, и искусственные хромосомы человека (см., например, Harrington et al., *Nat Genet.* 15:345, 1997). Например, невирусные векторы, применимые для экспрессии полинуклеотидов, кодирующих цепи полиспецифических антител в клетках млекопитающих (например, человека) включают pThioHis A, B и C, pcDNA3.1/His, pEBVHis A, B и C (Invitrogen, Сан-Диего, Калифорния, США), векторы MPS V и множество других векторов, известных в данной области для экспрессии других белков. Подходящие вирусные векторы включают векторы на основе ретровирусов, аденовирусов, аденоассоциированных вирусов, вирусов герпеса, векторы на основе SV40, вируса папилломы, вируса Эпштейна-Барр НВР, вектора на основе вируса коровьей оспы и вируса леса Семлики (SFV). См. Brent et al., см. выше; Smith, *Annu. Rev. Microbiol.* 49:807, 1995; и Rosenfeld et al., *Cell* 68: 143, 1992.

[0147] Выбор экспрессирующего вектора зависит от предполагаемых клеток-хозяев, в которых должен быть экспрессирован вектор. Как правило, экспрессирующие векторы содержат промотор и другие регуляторные последовательности (например, энхансеры), которые функционально связаны с полинуклеотидами, кодирующими полиспецифическую цепь антитела или ее фрагмент. В одном варианте осуществления индуцируемый промотор используется для предотвращения экспрессии вставленных последовательностей, кроме как в индуцирующих условиях. Индуцируемые промоторы включают, например, промотор арабинозы, *lacZ*, металлотионеина или промотор белка теплового шока. Культуры трансформированных организмов могут быть размножены в неиндуцирующих условиях без искажения популяции в отношении кодирующих последовательностей, продукты экспрессии которых лучше переносятся клетками-хозяевами. Помимо промоторов, для эффективной экспрессии цепи полиспецифического антитела или ее фрагмента также могут потребоваться или желательны другие регуляторные элементы. Эти элементы обычно включают кодон инициации ATG и соседний сайт связывания рибосомы или другие последовательности. Кроме того, эффективность экспрессии можно повысить за счет включения энхансеров, подходящих для используемой клеточной системы (см., например, Scharf et al., *Results Probl. Cell Differ.* 20: 125, 1994; и Bittner et al., *Meth. Enzymol.*, 153:516, 1987). Например, энхансер SV40 или энхансер CMV можно использовать для увеличения

экспрессии в клетках-хозяевах млекопитающих.

[0148] Используемые векторы обычно кодируют легкую и тяжелую цепи полиспецифического антитела, включая константные области или их части. Такие векторы обеспечивают экспрессию переменных областей в виде слитых белков с константными областями, что приводит к продукции интактных антител и их антигенсвязывающих фрагментов. Как правило, такие константные области являются человеческими.

[0149] Термин «рекомбинантная клетка-хозяин» (или просто «клетка-хозяин») относится к клетке, в которую был введен рекомбинантный экспрессирующий вектор. Следует понимать, что такие термины предназначены для обозначения не только определенной клетки, но также потомства такой клетки. Поскольку определенные модификации могут возникать в последующих поколениях либо из-за мутации, либо из-за влияния окружающей среды, такое потомство может фактически не быть идентичным родительской клетке, но все же включено в объем термина «клетка-хозяин», как он используется в настоящем описании.

[0150] Клетки-хозяева для содержания и экспрессии полиспецифического антитела по изобретению могут быть либо прокариотическими, либо эукариотическими. *E. coli* является одним из прокариотических хозяев, пригодных для клонирования и экспрессии полинуклеотидов по настоящему изобретению. Другие микробы-хозяева, подходящие для использования, включают бациллы, такие как *Bacillus subtilis*, и другие энтеробактерии, такие как *Salmonella*, *Serratia* и различные виды *Pseudomonas*. В этих прокариотических хозяевах также можно создавать экспрессирующие векторы, которые обычно содержат последовательности контроля экспрессии, совместимые с клеткой-хозяином (например, точка начала репликации). Кроме того, будет присутствовать любое количество различных хорошо известных промоторов, таких как промоторная система лактозы, промоторная система триптофана (*trp*), промоторная система бета-лактамазы или промоторная система фага лямбда. Промоторы обычно контролируют экспрессию, необязательно с операторной последовательностью, и имеют последовательности сайта связывания рибосомы и т. п. для инициации и завершения транскрипции и трансляции. Другие микробы, такие как дрожжи, также могут быть использованы для экспрессии полиспецифических антител по изобретению. Также можно использовать клетки насекомых в комбинации с бакуловирусными векторами.

[0151] В одном варианте осуществления клетки-хозяева млекопитающих используют для экспрессии и продукции полиспецифического антитела по изобретению. Например, они могут представлять собой либо клеточную линию гибридомы, экспрессирующую эндогенные гены иммуноглобулина, либо клеточную линию млекопитающего, содержащую экзогенный экспрессирующий вектор. Они включают любую нормальную, мортальную или нормальную или аномальную иммортализованную клетку животного или человека. Например, был разработан ряд подходящих линий клеток-хозяев, способных секретировать интактные иммуноглобулины, включая линии клеток СНО, различные линии клеток COS, клетки HeLa, линии клеток миеломы,

трансформированные В-клетки и гибридомы. Использование культуры клеток ткани млекопитающих для экспрессии полипептидов обсуждается в целом, например, в Winnacker, FROM GENES TO CLONES, VCH Publishers, NY, NY, 1987. Экспрессирующие векторы для клеток-хозяев млекопитающих могут включать последовательности, регулирующие экспрессию, такие как начало репликации, промотор и энхансер (см., например, Queen, et al., Immunol. Rev. 89:49-68, 1986) и необходимые сайты процессирования информации, такие как сайты связывания рибосом, сайты сплайсинга РНК, сайты полиаденилирования и последовательности терминаторов транскрипции. Эти экспрессирующие векторы обычно содержат промоторы, полученные из генов млекопитающих или из вирусов млекопитающих. Подходящие промоторы могут быть конститутивными, специфичными для типа клеток, специфичными для стадии и/или модулируемыми или регулируемыми. Пригодные промоторы включают, но не ограничиваются ими, металлотионеиновый промотор, конститутивный главный поздний промотор аденовируса, индуцируемый дексаметазоном промотор MMTV, промотор SV40, промотор MRP polIII, конститутивный промотор MPS V, тетрациклин-индуцируемый промотор CMV (такие как человеческий ранний промотор CMV), конститутивный промотор CMV и комбинации промотор-энхансер, известные в данной области.

[0152] Способы введения экспрессирующих векторов, содержащих интересующие полинуклеотидные последовательности, различаются в зависимости от типа клетки-хозяина. Например, трансфекцию хлоридом кальция обычно используют для прокариотических клеток, тогда как обработку фосфатом кальция или электропорацию можно использовать для других клеток-хозяев. (См. в целом Green, M. R., and Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press (2012)). Другие методы включают, например, электропорацию, обработку фосфатом кальция, липосомную трансформацию, инъекцию и микроинъекцию, баллистические методы, виросомы, иммунолипосомы, конъюгаты поликатион-нуклеиновая кислота, депротеинизированная ДНК, искусственные вирионы, слияние со структурным белком вируса герпеса VP22 (Elliot and O' Hare, Cell 88:223, 1997), усиленное агентом поглощение ДНК и трансдукцию *ex vivo*. Для долгосрочной высокопродуктивной продукции рекомбинантных белков часто требуется стабильная экспрессия. Например, клеточные линии, которые стабильно экспрессируют полиспецифическое антитело по изобретению, могут быть получены с использованием экспрессирующих векторов по изобретению, которые содержат вирусные точки начала репликации или эндогенные элементы экспрессии и ген маркера селекции. После введения вектора клеткам может быть позволено расти в течение 1-2 дней в обогащенной среде, прежде чем они будут переведены в селективную среду. Цель маркера селекции состоит в том, чтобы придать устойчивость к отбору, и его присутствие позволяет выращивать клетки, которые успешно экспрессируют введенные последовательности в селективных средах. Резистентные, стабильно трансфецированные клетки можно размножить с использованием методов тканевых клеточных культур, соответствующих типу клеток. Таким образом, настоящее изобретение

относится к способу получения антитела по изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента, причем указанный способ включает стадию культивирования клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту или вектор, кодирующий антитело по изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент, где экспрессируется указанное антитело по настоящему изобретению или его фрагмент.

[0153] В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу получения полиспецифического антитела по изобретению, включающему стадию культивирования клетки-хозяина, экспрессирующей нуклеиновую кислоту, кодирующую полиспецифическое антитело по изобретению. В частности, настоящее изобретение относится к способу получения полиспецифического антитела по изобретению, способу, включающему (i) получение нуклеиновой кислоты или двух нуклеиновых кислот, кодирующих полиспецифическое антитело по изобретению, или вектора, или двух векторов, кодирующих полиспецифическое антитело по изобретению, экспрессию указанной нуклеиновой кислоты или указанных двух нуклеиновых кислот, или указанного вектора или векторов, и сбор указанного полиспецифического антитела или указанного связывающего домена из системы экспрессии, или (ii) получение клетки-хозяина или клеток-хозяев, экспрессирующих нуклеиновую кислоту или две нуклеиновые кислоты, кодирующие полиспецифическое антитело по изобретению, культивирование указанной клетки-хозяина или указанных клеток-хозяев; и сбор указанного полиспецифического антитела или указанного связывающего домена из клеточной культуры.

[0154] Еще в одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей полиспецифическое антитело по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. «Фармацевтически приемлемый носитель» означает среду или разбавитель, который не влияет на структуру антител. Фармацевтически приемлемые носители улучшают или стабилизируют композицию или облегчают приготовление композиции. Фармацевтически приемлемые носители включает растворители, дисперсные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие абсорбцию агенты и т. п., которые являются физиологически совместимыми.

[0155] Некоторые из таких носителей позволяют приготовить фармацевтические композиции, например, в виде таблеток, пилюль, драже, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, взвесей, суспензий и леденцов для перорального приема пациентом. Некоторые из таких носителей позволяют приготовить фармацевтические композиции для инъекции, инфузии или местного применения. Например, фармацевтически приемлемый носитель может представлять собой стерильный водный раствор.

[0156] Фармацевтическую композицию по изобретению можно вводить различными способами, известными в данной области. Путь и/или способ введения варьируется в зависимости от целевых результатов. Введение может быть внутривенным, внутримышечным, внутрибрюшинным или подкожным или проксимально к участку-мишени. В конкретных вариантах осуществления введение осуществляется

внутримышечно или подкожно, конкретно подкожно. Фармацевтически приемлемый носитель должен подходить для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, путем инъекции или инфузии), конкретно для внутримышечного или подкожного введения. В зависимости от пути введения активное соединение, т. е. полиспецифическое антитело по изобретению может быть покрыто материалом для защиты соединения от действия кислот и других природных условий, которые могут инактивировать соединение.

[0157] Фармацевтические композиции по изобретению могут быть получены согласно хорошо известным методам и обычной практике в данной области. См., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Co., 20th ed., 2000; и Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978. Фармацевтические композиции предпочтительно получают при условиях GMP. Как правило, в фармацевтических композициях по изобретению используют терапевтически эффективную дозу или эффективную дозу полиспецифического антитела по изобретению. Полиспецифические антитела по изобретению готовят в виде фармацевтически приемлемых лекарственных форм обычными способами, известными специалистам в данной области. Режимы дозирования корректируются для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, может быть введен одиночный болюс, могут быть введены несколько разделенных доз в течение периода времени или дозы могут быть пропорционально уменьшены или увеличены в зависимости от потребностей терапевтической ситуации. Особенно предпочтительно готовить парентеральные композиции в стандартной лекарственной форме для простоты введения и однородности дозировки. Стандартная лекарственная форма, используемая в настоящем описании, относится к физически дискретным единицам, пригодным в качестве унитарных доз для объекта, подвергаемого лечению; каждая единица содержит заданное количество активного соединения, которое рассчитано для привнесения требуемого терапевтического эффекта, в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем.

[0158] Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических композициях по изобретению могут варьироваться таким образом, чтобы получить количество активного ингредиента, эффективное для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, не будучи токсичными для пациента. Выбранный уровень дозировки зависит от множества фармакокинетических факторов, включая активность конкретных используемых композиций по настоящему изобретению, способ введения, время введения, скорость выведения конкретного используемого соединения, продолжительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, используемые в комбинации с конкретными применяемыми композициями, возраст, пол, вес, состояние, общее состояние здоровья и предшествующая история болезни пациента, проходящего лечение, и подобные факторы.

[0159] Полиспецифическое антитело по изобретению обычно вводят многократно. Интервалы между однократными дозами могут составлять неделю, месяц или год. Интервалы также могут быть нерегулярными, на что указывает измерение уровня полиспецифического антитела по изобретению в крови пациента. Альтернативно, полиспецифическое антитело по изобретению можно вводить в виде состава с замедленным высвобождением, и в этом случае требуется менее частое введение. Дозировка и частота варьируются в зависимости от периода полужизни антитела в организме пациента. Как правило, гуманизированные антитела имеют более длительный период полужизни, чем химерные антитела и антитела, не относящиеся к человеку. Дозировка и частота введения может варьировать в зависимости от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. В профилактических применениях, относительно низкая дозировка вводится с относительно нечастыми интервалами в течение длительного периода времени. Некоторые пациенты продолжают получать лечение до конца своей жизни. В терапевтических применениях, относительно высокая дозировка при относительно коротких интервалах иногда требуется до уменьшения или прекращения прогрессии заболевания, и предпочтительно до того, как пациент продемонстрирует частичное или полное улучшение симптомов заболевания. После этого введение пациенту может осуществляться в профилактическом режиме.

[0160] В одном аспекте настоящее изобретение относится к полиспецифическим антителам по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению для применения в качестве лекарственного средства. В подходящем варианте осуществления настоящее изобретение относится к полиспецифическому антителу или фармацевтической композиции для применения при лечении заболевания, выбранного из аллергических, воспалительных и аутоиммунных заболеваний, конкретно, воспалительных и аутоиммунных заболеваний.

[0161] В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для применения в производстве лекарственного средства для лечения аллергического, воспалительного или аутоиммунного заболевания, конкретно, воспалительного или аутоиммунного заболевания.

[0162] В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению полиспецифического антитела или фармацевтической композиции для лечения аллергического, воспалительного или аутоиммунного заболевания, конкретно, для лечения воспалительного или аутоиммунного заболевания у пациента.

[0163] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, включающему введение пациенту терапевтически эффективного количества полиспецифического антитела по настоящему изобретению. В подходящем варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения аллергического, воспалительного или аутоиммунного заболевания, конкретно к лечению воспалительного или аутоиммунного заболевания, у пациента, включающему введение пациенту терапевтически эффективного количества полиспецифического антитела по настоящему

изобретению.

[0164] Термин «пациент» включает человека и животных, отличных от человека.

[0165] Термин «животные» включает всех позвоночных, например, отличных от человека млекопитающих и не млекопитающих, таких как отличные от человека приматы, овцы, собаки, коровы, куры, амфибии и рептилии. Если не указано иное, термины «пациент» или «объект» используются в настоящем описании взаимозаменяемо.

[0166] Термины «лечение», «лечить», «подвергнутый лечению» и т. п. в настоящем описании относятся к получению желаемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Эффект может быть терапевтическим с точки зрения частичного или полного излечения заболевания и/или неблагоприятного эффекта, связанного с заболеванием, или замедления прогрессирования заболевания. Термин «лечение», используемый в настоящем описании, охватывает любое лечение заболевания у млекопитающего, например, у человека, и включает: (а) ингибирование заболевания, т. е. задерживая его развитие; и (b) облегчение заболевания, т. е. вызывая регресс заболевания.

[0167] Термин «терапевтически эффективное количество» или «эффективное количество» относится к количеству агента, которого при введении млекопитающему или другому объекту для лечения заболевания достаточно для влияния на такое лечение заболевания. «Терапевтически эффективное количество» будет варьироваться в зависимости от агента, заболевания и его тяжести, а также возраста, веса и т. д. пациента, подлежащего лечению.

[0168] В одном варианте осуществления аллергические, воспалительные и аутоиммунные заболевания выбраны из вызывающих зуд аллергических заболеваний, вызывающих зуд воспалительных заболеваний и вызывающих зуд аутоиммунных заболеваний, конкретно, из вызывающих зуд воспалительных заболеваний и вызывающих зуд аутоиммунных заболеваний. Термины «зуд (pruritus)» и «зуд (itch)», используемые здесь как синонимы, относятся к ощущению, которое вызывает желание или рефлекс почесаться. Расчесывание может быть проблематичным, конкретно в случае хронических кожных заболеваний, вызывающих зуд, таких как атопический дерматит, дерматомикозы, псориаз или крапивница, так как постоянный зуд побуждает пациентов постоянно и/или чрезмерно расчесывать пораженные участки кожи, что часто приводит к травмам кожи и дальнейшему ухудшению состояния кожного покрова.

[0169] Используемый в настоящем описании термин «аллергические заболевания» или «аллергия» относится к большому количеству состояний, вызванных повышенной чувствительностью иммунной системы к обычно безвредным веществам в окружающей среде.

[0170] Используемый в настоящем описании термин «воспалительные заболевания» относится к огромному количеству воспалительных заболеваний, т. е. воспалительных аномалий, которые часто характеризуются длительным воспалением, известным как хроническое воспаление. Термин «воспаление» относится к сложной биологической реакции тканей организма на вредные раздражители, такие как патогены, поврежденные

клетки или раздражители. Это защитная реакция с участием иммунных клеток, кровеносных сосудов и молекулярных медиаторов. В то время как регулярные воспалительные реакции необходимы организму для устранения первоначальной причины повреждения клеток, удаления некротических клеток и тканей, поврежденных в результате первоначального повреждения и воспалительного процесса, а также для инициации восстановления тканей, воспалительные расстройства обычно характеризуются стойким воспалением при отсутствии вредных раздражителей.

[0171] Термин «аутоиммунные заболевания», используемый в настоящем описании, относится к состоянию, возникающему в результате аномального иммунного ответа на функционирующую часть тела. Это результат аутоиммунитета, то есть наличия аутореактивного иммунного ответа (например, аутоантител, аутореактивных Т-клеток), с повреждением или патологией или без таковых, которые обычно ограничены определенными органами или вовлекают определенную ткань в разных местах.

[0172] В конкретных вариантах осуществления вызывающее зуд воспалительное или аутоиммунное заболевание выбрано из атопического дерматита, острого аллергического контактного дерматита, хронической спонтанной крапивницы, буллезного пемфигоида, очаговой алопеции, дерматомиозита, узловатого пруриго, псориаза и атопической астмы, в частности, из атопического дерматита.

[0173] В другом аспекте аллергические, воспалительные и аутоиммунные заболевания выбраны из атопического дерматита, острого аллергического контактного дерматита, хронической спонтанной крапивницы, буллезного пемфигоида, очаговой алопеции, дерматомиозита, узловатого пруриго, псориаза и атопической астмы, в частности, из атопического дерматита.

[0174] В другом варианте осуществления аллергические, воспалительные и аутоиммунные заболевания выбраны из аллергической астмы, аллергического ринита, воспалительного заболевания дыхательных путей, рецидивирующей обструкции дыхательных путей, гиперреактивности дыхательных путей, хронической обструктивной болезни легких, болезни Крона, хронической крапивницы, не связанной с гистамином, антигистамин-резистентного мастоцитоза, простого хронического лишая, себорейного дерматита, ксеродермии, герпетиформного дерматита, красного плоского лишая и язвенного колита.

[0175] В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к полиспецифическому антителу или фармацевтической композиции, как определено в настоящем описании, для применения при лечении заболевания, которое представляет собой неврогенный зуд, выбранный из постгерпетической невралгии, постгерпетического зуда, парестетической ноталгии, рассеянного склероза и плечелучевого зуда.

[0176] В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к полиспецифическому антителу или фармацевтической композиции для применения в противозудном агенте для лечения системного заболевания с зудом, которое выбрано из холестаза, хронического заболевания почек, болезни Ходжкина, кожной Т-клеточной

лимфомы и других лимфом или лейкозов, связанных с хроническим зудом, истинной полицитемии, гипертиреоза, хронического антропонозного зуда (реакция Id), хронического зуда, вызванного беременностью (например, PUPPP), эозинофильного пустулезного фолликулита, реакции гиперчувствительности к лекарственным средствам, хронического зуда пожилых людей или зуда сухой кожи (местного, генерализованного), зуда в области рубца после ожога (послеожоговый зуд), генетического или невоидного хронического зуда (например, Синдрома Нетертона, болезни Дарье (Morbus Darier), болезни Хейли-Хейли, воспалительного линейного бородавчатого эпидермального невуса (ILVEN), семейного первичного кожного амилоидоза, синдрома Олмстеда), аквагенного зуда, дерматита, связанного со стекловолокном, хронического зуда слизистых, зуда, вызванного химиотерапией, и ВИЧ.

Список последовательностей (мутации, обозначенные в соответствии со схемой нумерации АНо; CDR, определенные в соответствии с определением CDR Numab, если не указано иное)

Таблица 1 Примеры доменов связывания IL-4R, используемых в настоящем изобретении (остатки CDR выделены жирным шрифтом и курсивом).

Номер SEQ ID	Область Ab	Последовательность
44-34-C10		
SEQ ID NO: 1	HCDR1 (H27-H42; Нумерация АНо)	<i>GFSSSSAHYMC</i>
SEQ ID NO: 2	HCDR2 (H57-H76; Нумерация АНо)	<i>CIYAGSRGSTYYASWAKG</i>
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (H108-H138; Нумерация АНо)	<i>RAAFVNRGVSWIWPYYFSL</i>
SEQ ID NO: 4	VH (44-34-C10-sc07/44-34-C10-sc08)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFSSSSAHYMC WVRQAPGKGLEW IG CIYAGSRGSTYYASWAKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYC ARAAAFVNRGVSWIWPYYFSLWGQGT LVTVSS
SEQ ID NO: 5	VH (44-34-C10-sc09)	EVQLVESGGGRVQPGGSLRLSCAAS GFSSSSAHYMC WVRQAPGKGLEW IG CIYAGSRGSTYYASWAKGRFTISKASSTTVYLQMNSLRAEDTATYYCA RAAFVNRGVSWIWPYYFSLWGQGTQ VTVSS
SEQ ID NO: 6	VH (44-34-C10-sc09) мутации R12L, T103V, Q144L	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFSSSSAHYMC WVRQAPGKGLEW IG CIYAGSRGSTYYASWAKGRFTISKASSTTVYLQMNSLRAEDTAVYYCA RAAFVNRGVSWIWPYYFSLWGQGT LVTVSS
SEQ ID NO: 7	LCDR1 (L24-L42; Нумерация АНо)	<i>QASEDIESYLA</i>
SEQ ID NO: 8	LCDR2 (L58-L72; Нумерация АНо) (представлена в 44-34-C10-sc06, 44-34- C10-sc08 и 44-34-C10-sc09)	<i>RASTLAY</i>
SEQ ID NO: 9	LCDR3 (L107-L138; Нумерация АНо)	<i>LGSSYSTGSNI</i>
SEQ ID NO: 10	VL (44-34-C10-sc06/44-34-C10-sc09)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC QASEDIESYLAWYQQKPGKAPKLLIYR ASTLAYGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLGSSYSTGSNI
SEQ ID NO: 11	VL (44-34-C10-sc08)	DIQMTQSPSSLSARVGDRTITC QASEDIESYLAWYQQKPGKAPKLLIYR ASTLAYGVPSRFSGSGSGRDFTLTISSLQPEDFATYYCLGSSYSTGSNI

Таблица 2. Примеры доменов связывания II-31, используемых в настоящем изобретении (остатки CDR выделены жирным шрифтом и курсивом).

Номер SEQ ID	Область Ab	Последовательность
50-09-D07		
SEQ ID NO: 12	HCDR1 (H27-H42; Нумерация АНо)	<i>GFSFSANYWIC</i>
SEQ ID NO: 13	HCDR2 (H57-H76; Нумерация АНо) (представлена в 50-09-D07-sc04, 50-09-D07-sc05 и 50-09-D07-sc07)	<i>CIYIGSRADTYYPWAKG</i>
SEQ ID NO: 14	HCDR3 (H108-H138; Нумерация АНо)	<i>RFSSGIYDLDRFFL</i>
SEQ ID NO: 15	VH (50-09-D07-sc03/50-09-D07-sc07)	<i>QSQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSANYWICWVRQAPGKGLEWIVCI YIGSRADTYYPWAKGRFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYFCARFSSG IYDLDRFFLWGQGTQTVSS</i>
SEQ ID NO: 16	VH (50-09-D07-sc04)	<i>QSQLVESGGGRVQPGGSLRLSCAASGFSFSANYWICWVRQAPGKGLEWIVCI YIGSRADTYYPWAKGRFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTATYFCARFSSGI YDLDRFFLWGQGTQTVSS</i>
SEQ ID NO: 17	LCDR1 (L24-L42; Нумерация АНо)	<i>QASQSIDSWLA</i>
SEQ ID NO: 18	LCDR1 (L24-L42; Нумерация АНо)	<i>QASQSIESWLA</i>
SEQ ID NO: 19	LCDR2 (L58-L72; Нумерация АНо)	<i>QASKLAS</i>
SEQ ID NO: 20	LCDR3 (L107-L138; Нумерация АНо)	<i>QTYYGGGHIGWG</i>
SEQ ID NO: 21	VL (50-09-D07-sc03 - sc06)	<i>AFQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSIDSWLAWYQQKPGKPPKLLIYQASK LASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYYCQTYYGGGHIGWG</i>
SEQ ID NO: 22	VL (50-09-D07-sc07)	<i>AFQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSIESWLAWYQQKPGKPPKLLIYQASK LASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYYCQTYYGGGHIGWG</i>

Таблица 3 Другие последовательности, относящиеся к настоящему изобретению.

Номер SEQ ID	Область Ab	Последовательность
SEQ ID NO: 23	VH3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSANYYPWCWVRQAPGKGLEWIGCI YGGSSDITYDANWTKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARSAWY SGWGGDLWGQGLVTVSS
SEQ ID NO: 24	VH4	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCKVSGFSFSNSYWICWIRQPPGKGLEWIGCTF VGSSDSTYYANWAKGRVTISVDSSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARHPSDAV YGYANNLWGQGLVTVSS
SEQ ID NO: 25	Vкаппа1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQSINNVLAWYQQKPGKAPKLLIYRASTL ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSSYGNYGDFGTGTKVTVLG
SEQ ID NO: 26	Vλ FR4 на основе зародышевой последовательности (Sk17)	FGTGTKVTVLG
SEQ ID NO: 27	Vλ FR4 на основе зародышевой последовательности (Sk12)	FGGGTKLTVLG
SEQ ID NO: 28	Vλ FR4 на основе зародышевой последовательности	FGGGTQLIILG
SEQ ID NO: 29	Vλ FR4 на основе зародышевой последовательности	FGEGTELTVLG
SEQ ID NO: 30	Vλ FR4 на основе зародышевой последовательности	FGSGTKVTVLG
SEQ ID NO: 31	Vλ FR4 на основе зародышевой последовательности	FGGGTQLTVLG
SEQ ID NO: 32	Vλ FR4 на основе зародышевой последовательности	FGGGTQLTALG
SEQ ID NO: 33	Vλ FR4 на основе зародышевой последовательности G141C	FGCGTKVTVLG
SEQ ID NO: 34	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
SEQ ID NO: 35	Линкер	GGGGS
SEQ ID NO: 36	Линкер	GGGGSGGGGS

Таблица 4 Примеры полиспецифических антител, используемых в настоящем изобретении (линкеры выделены жирным шрифтом).

Номер SEQ ID	Область Ab	Последовательность
--------------	------------	--------------------

PRO2198		
SEQ ID NO: 37	Morrison-H, LC	DIQMTQSPSSLSARVGDRVITITCQASEDIESYLAWYQQKPGKAPKLLIYRASTLAYGVP SRFSGSGSGRDFTLTISLQPEDFATYYCLGSSYSTGNSIFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 38	Morrison-H, HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSSSSAHYMCWVRQAPGKGLEWIGCIYAGSR GSTYYASWAKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARAAFVNRGVSWIWP YYFSLWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVES KYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTP PVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLGGGGGSG GGGSAFQLTQSPSSLASVGDRTITCQASQSIDSWLAWYQQKPGKPPKLLIYQASKL ASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCQTYGGGHIGWFGFTGTKVTVLGG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSQSQLVESGGGRVQPGGSLRLSCAASGFSSSANYWIC WVRQAPGKGLEWIVCIYIGSRADTYAPWAKGRFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDT ATYFCARFSSGIYDLDRFFLWGQGTQVTVSS
PRO2199		
SEQ ID NO:39	Morrison-H, LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASEDIESYLAWYQQKPGKAPKLLIYRASTLAYGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLGSSYSTGNSIFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 40	Morrison-H, HC	EVQLVESGGGRVQPGGSLRLSCAASGFSSSSAHYMCWVRQAPGKGLEWIGCIYAGSR GSTYYASWAKGRFTISKASSTTVYLMNSLRAEDTATYYCARAAFVNRGVSWIWPY YFSLWGQGTQVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESK YGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTP VLDSDGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLGGGGGSG GGGSAFQLTQSPSSLASVGDRTITCQASQSIDSWLAWYQQKPGKPPKLLIYQASKL ASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCQTYGGGHIGWFGFTGTKVTVLGG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSQSQLVESGGGRVQPGGSLRLSCAASGFSSSANYWIC

		WVRQAPGKGLEWIVCIYIGSRADTTYAPWAKGRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDT ATYFCARFSSGIYDLDRFFLWGQGTQVTVSS
PRO2200		
SEQ ID NO: 41	Morrison-H, LC	AFQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSIDSWLAWYQQKPGKPPKLLIYQASKLASGVP SRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQTYGGGHIGWGFQGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSDKDST YLSSTLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 42	Morrison-H, HC	QSQLVESGGGRVQPGGSLRLSCAASGFSFSANYWICWVRQAPGKGLEWIVCIYIGSRA DTYYAPWAKGRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCARFSSGIYDLDRFFLWG QGTQVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPC PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKLSLSLGGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSARVGDRVTITCQASEDIESYLAWYQQKPGKAPKLLIYRASTLAYGVPSRF SGSGSGRDFTLTISSLQPEDFATYYCLGSSYSTGNSIFGTGKVTVLGGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSSSSAHYMCWVRQAPGKGL EWIGCIYAGSRGSTYYASWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARAAF VNRGVSWIWPYYFSLWGQGTLVTVSS
PRO2201		
SEQ ID NO: 43	Morrison-H, LC	AFQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSIDSWLAWYQQKPGKPPKLLIYQASKLASGVP SRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQTYGGGHIGWGFQGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSDKDST YLSSTLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 44	Morrison-H, HC	QSQLVESGGGRVQPGGSLRLSCAASGFSFSANYWICWVRQAPGKGLEWIVCIYIGSRA DTYYAPWAKGRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCARFSSGIYDLDRFFLWG QGTQVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPC PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKLSLSLGGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDIESYLAWYQQKPGKAPKLLIYRASTLAYGVPSRF

		SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLGSSYSTGSNIFGTGKVTVLGGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSEVQLVESGGGRVQPGGSLRLSCAASGFSSSSAHYMCWVRQAPGKGL EWIGCIYAGSRGSTYYASWAKGRFTISKASSTTVYLQMNSLRAEDTATYYCARAAAFV NRGVSWIWPYYFSLWGQGTQVTVSS
PRO2206		
SEQ ID NO: 45	Morrison-L, LC	DIQMTQSPSSLSARVGDRVITITCQASEDIESYLAWYQQKPGKAPKLLIYRASTLAYGVP SRFSGSGSRDFTLTISSLQPEDFATYYCLGSSYSTGSNIFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSFAFLTQSP SSLSASVGDRVITITCQASQSIDSWLAWYQQKPGKPPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGS GTDYTLTISSLQPEDFATYYCQTYGGGHIGWGFGTGKVTVLGGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSQSQLVESGGGRVQPGGSLRLSCAASGFSFSANYWICWVRQAPGKGLEW IVCIYIGSRADTYAPWAKGRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCARFSSGIYD LDRFFLWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 46	Morrison-L, HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSSSSAHYMCWVRQAPGKGLEWIGCIYAGSR GSTYYASWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARAAAFVNRGVSWIWP YYFSLWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTYTCNVDHKPSNTKVDKRVES KYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDGSFFLYSRLLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGL
PRO2207		
SEQ ID NO: 47	Morrison-L, LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCQASEDIESYLAWYQQKPGKAPKLLIYRASTLAYGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLGSSYSTGSNIFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSFAFLTQSP SSLSASVGDRVITITCQASQSIDSWLAWYQQKPGKPPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGS GTDYTLTISSLQPEDFATYYCQTYGGGHIGWGFGTGKVTVLGGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSQSQLVESGGGRVQPGGSLRLSCAASGFSFSANYWICWVRQAPGKGLEW IVCIYIGSRADTYAPWAKGRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCARFSSGIYD LDRFFLWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 48	Morrison-L, HC	EVQLVESGGGRVQPGGSLRLSCAASGFSSSSAHYMCWVRQAPGKGLEWIGCIYAGSR GSTYYASWAKGRFTISKASSTTVYLQMNSLRAEDTATYYCARAAAFVNRGVSWIWPY

		YFSLWGQGTQVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESK YGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
PRO2208		
SEQ ID NO:49	Morrison-L, LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDIESYLAWEYQKPKGKAPKLLIYRASTLAYGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLGSSYSTGNSIFGQGTKVEIKRTVAAPSIFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSAFQLTQSP SSLASVGDRVTITCQASQSIDSWLAWEYQKPKGKPPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGS GTDYTLTISSLQPEDFATYYCQTYGGGHIGWGFGTGTKVTVLGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSQSQLVESGGGRVQPGGSLRLSCAASGFSSFSANYWICWVRQAPGKGLEW IVCIYIGSRADTYAPWAKGRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCARFSSGIYD LDRFLLWGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 50	Morrison-L, HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSSSSAHYMCWVRQAPGKGLEWIGCIYAGSR GSTYYASWAKGRFTISKASSTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARAAVNRGVSWIWVY YFSLWGQGTQVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESK YGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG

[0177] По всему тексту настоящей заявки, если есть несоответствие между текстом описания (например, Таблицы 1-4) и списком последовательностей, текст описания имеет преимущественную силу.

[0178] Понятно, что некоторые признаки изобретения, которые для ясности описаны в контексте отдельных вариантов осуществления, также могут быть представлены в комбинации в одном варианте осуществления. И наоборот, различные признаки изобретения, которые для краткости описаны в контексте одного варианта осуществления, также могут быть предоставлены по отдельности или в любой подходящей комбинации. Все комбинации вариантов осуществления, относящихся к изобретению, охвачены настоящим изобретением и раскрыты здесь точно так же, как если бы каждая комбинация была раскрыта отдельно и явно. Кроме того, все подкомбинации различных вариантов осуществления и их элементы также конкретно охвачены настоящим изобретением и раскрыты здесь точно так же, как если бы каждая такая подкомбинация была отдельно и явно раскрыта здесь.

[0179] Настоящее изобретение не должно быть ограничено в объеме конкретными вариантами осуществления, описанными здесь. Фактически на основании приведенного выше описания специалисту в данной области будут очевидны различные модификации изобретения дополнительно к тем, что описаны в настоящем документе. Подразумевается, что такие модификации попадают в объем прилагаемой формулы изобретения.

[0180] Насколько это возможно согласно соответствующему патентному законодательству, все патенты, заявки, публикации, методы испытаний, литература и другие материалы, цитируемые в настоящем описании, настоящим включены в качестве ссылки.

[0181] Следующие примеры иллюстрируют изобретение, описанное выше, но никоим образом не предназначены для ограничения объема изобретения. Другие испытательные модели, известные специалистам в соответствующей области техники, также могут определять полезные эффекты заявленного изобретения.

Примеры

Пример 1: Создание и тестирование анти-IL-4R-молекул:

Цель проекта

[0182] Цель проекта заключалась в создании гуманизованных фрагментов моноклональных антител, которые специфически связываются с IL-4R человека и нейтрализуют его биологический эффект. Еще одной целью была идентификация фрагментов антител против IL-4R, обладающих активностью и достаточной стабильностью для включения в полиспецифические форматы антител.

Создание, селекция, гуманизация и продукция анти-IL-4R-связывающих доменов, включенных в полиспецифические антитела по настоящему изобретению.

[0183] Генерацию кроличьих антител против IL-4R, скрининг и отбор подходящих клонов, а также гуманизацию и получение гуманизованных анти-IL-4R-связывающих доменов проводили, как описано в параллельной заявке на патент EP20216928.0, которая

включена в настоящее описание ссылкой. Были идентифицированы и отобраны анти-IL-4R-связывающие домены, которые обладают достаточной активностью и стабильностью для включения в форматы полиспецифических антител, на основании их биофизических и функциональных свойств.

Характеристика подходящих анти-IL-4R-связывающих доменов

[0184] Для дальнейшей характеристики подходящих анти-IL-4R-связывающих доменов были проведены следующие анализы.

Производство подходящих анти-IL-4R-связывающих доменов для характеристики (формат scFv)

[0185] Экспрессию конструкций млекопитающих проводили в клетках CHO-S с использованием набора для транзитной трансфекции CHOgro (Mirus). Культуры собирали через 5-7 дней (при достижении жизнеспособности клеток <70%) экспрессии при 37°C центрифугированием с последующей фильтрацией. Белки очищали из осветленных культуральных супернатантов с помощью аффинной хроматографии с Протеином L. Ни одна из молекул не нуждалась в полировке с помощью эксклюзионной хроматографии, поскольку все молекулы демонстрировали по меньшей мере одну фракцию аффинной хроматографии с содержанием мономеров >95% после захвата, что оценивали с помощью анализа SE-HPLC. Образцы повторно забуферивали до конечного буфера (50 mM фосфатно-цитратного буфера с 150 mM NaCl при pH 6,4) путем диализа. Для контроля качества изготовленного материала применяли стандартные аналитические методы, такие как SE-HPLC, UV280 и SDS-PAGE. Производственные характеристики восьми молекул scFv, происходящих из четырех клонов, которые считаются подходящими для включения в форматы полиспецифических антител, обобщены в Таблице 6. Производственные характеристики трансплантата CDR (sc01) и полного трансплантата (sc04) клона 4418C11 (PRO1510) и его вариантов (PRO1549-PRO1554) приведены в Таблице 7.

Таблица 6: производство scFv из 8 отобранных клонов. Sc01: трансплантат CDR, sc04: полный трансплантат

ID белка	Описание	Объем экспрессии [мл]	Выход после очистки с помощью аффинной хроматографии [мг]	Конечный выход [мг]	Титр [мг/л]	Чистота SE-HPLC [% мономера]	Чистота SDS-PAGE	T _m [°C]	T _{onset} [°C]
PRO1506	44-03-A03-sc01	200	14,6	11,7	58	99,0	подтвержденная идентичность	62,8	56,7
PRO1524	44-03-A03-sc04	100	6,5	5,0	50	99,0	подтвержденная идентичность	59,6	54,0
PRO1510	44-18-C11-sc01	200	12,5	10,0	50	98,0	подтвержденная идентичность	71,5	64,0
PRO1528	44-18-C11-sc04	100	5,7	4,7	47	99,0	подтвержденная идентичность	59,1	52,3
PRO1517	44-34-C10-sc01	50	1,5	0,3	7	97,6	подтвержденная идентичность	63,7	57,0
PRO1535	44-34-C10-sc04	100	7,3	4,6	46	99,1	подтвержденная идентичность	67,9	62,7
PRO1520	44-39-B07-sc01	100	9,5	3,1	31	98,2	подтвержденная идентичность	70,2	64,0
PRO1538	44-39-B07-sc04	100	8,4	2,2	22	95,0	подтвержденная идентичность	68,3	63,7

Таблица 7: производство scFv всех вариантов трансплантата клона 44-18-C11. Sc01: трансплантат CDR, sc04: полный трансплантат

ID белка	Описание	Объем экспрессии [мл]	Выход после захвата [мг]	Конечный выход [мг]	Титр [мг/л]	Чистота SE-HPLC [% мономера]	Чистота SDS-PAGE	T_m [°C]	T_{onset} [°C]
PRO1510	44-18-C11-sc01	200	12,5	10,0	50	98,0	подтвержденная идентичность	71.5	64.0
PRO1528	44-18-C11-sc04	100	5,7	4,7	47	99,0	подтвержденная идентичность	59.1	52.3
PRO1549	44-18-C11-sc05	100	8,1	6,8	68	99,0	подтвержденная идентичность	66.9	61.0
PRO1550	44-18-C11-sc06	100	8,0	9,0	90	99,0	подтвержденная идентичность	69.8	62.0
PRO1551	44-18-C11-sc07	100	8,1	6,8	68	98,0	подтвержденная идентичность	68.1	62.7
PRO1552	44-18-C11-sc08	100	6,8	5,5	55	98,0	подтвержденная идентичность	55.6	47.0
PRO1553	44-18-C11-sc09	100	7,5	6,7	67	99,0	подтвержденная идентичность	62.8	56.0
PRO1554	44-18-C11-sc10	100	8,8	6,9	69	99,0	подтвержденная идентичность	69.5	61.3

Фармакодинамическая характеристика подходящих анти-IL-4R-связывающих доменов (формат scFv)

[0186] Антитела scFv, которые были оценены как подходящие, характеризовались первичными фармакодинамическими свойствами.

Аффинность к IL-4R человека

[0187] Аффинность 14 гуманизированных scFv (полученных из 4 кроличьих моноклональных антител) против IL-4R человека определяли анализом SPR на устройстве T200 (Biacore, GE Healthcare). IL-4R человека-Fc был захвачен с помощью антитела против человеческого IgG-Fc, связанного с поверхностью карбоксиметилированного декстрана, и scFv были инъецированы в качестве аналита. После каждого цикла введения аналита сенсорный чип регенерировали и происходил захват нового антигена. scFv измеряли с использованием многоциклового кинетического анализа доза-ответ с семью концентрациями аналита в диапазоне от 0,12 до 90 нМ, разведенными в рабочем буфере. Полученные сенсограммы аппроксимировали с использованием модели связывания 1:1. Результаты представлены в Таблице 8. Как видно из Таблицы 8, вариабельные домены антител scFv на основе клона 4434-C10 демонстрируют наилучшую общую аффинность связывания с IL-4R человека.

Таблица 8: Аффинность scFv к IL-4R человека. sc01: трансплантат CDR; sc04: Полный трансплантат.

ID белка	scFv ID клона	Аффинность к IL-4R человека		
		k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (M)
PRO1506	44-03-A03 -sc01	2,17E+06	1,49E-04	6,89E-11
PRO1524	44-03-A03-sc04	1,13E+06	3,40E-05	3,00E-11
PRO1510	44-18-C11 -sc01	1,67E+06	9,58E-04	5,75E-10
PRO1528	44-18-C11-sc04	3,83E+06	2,07E-04	5,39E-11
PRO1549	44-18-C11-sc05	1,63E+06	1,11E-03	6,77E-10
PRO1550	44-18-C11-sc06	1,55E+06	1,32E-03	8,52E-10
PRO1551	44-18-C11-sc07	1,84E+06	1,05E-03	5,70E-10
PRO1552	44-18-C11-sc08	8,41E+06	3,54E-04	4,21E-11
PRO1553	44-18-C11-sc09	4,24E+06	2,24E-04	5,27E-11
PRO1554	44-18-C11-sc10	2,03E+06	1,09E-03	5,37E-10
PRO1517	44-34-C10 -sc01	3,55E+06	1,95E-05	5,50E-12
PRO1535	44-34-C10-sc04	2,72E+06	5,42E-05	1,99E-11
PRO1520	44-39-B07 -sc01	6,18E+05	1,18E-02	1,91E-08
PRO1538	44-39-B07-sc04	1,67E+06	2,29E-04	1,37E-10

Аффинность к IL-4R яванского макака, игрунки и мыши

[0188] Перекрестную реактивность с IL-4R яванского макака измеряли с

использованием тех же условий, что и для анализа аффинности к IL-4R человека, с тем отличием, что происходил захват IL-4R-Fc яванского макака вместо IL-4R-Fc человека. Для определения аффинности к IL-4R игрушки использовали прямые условия, поскольку был доступен только внеклеточный домен (ECD) IL-4R игрушки. ECD игрушки иммобилизовали непосредственно на сенсорном чипе, и в качестве аналита вводили серию титрования scFv. Чтобы можно было сравнить значения KD, полученные для IL-4R яванского макака и игрушки, аффинность к ECD IL-4R яванского макака также определяли с использованием прямой настройки.

[0189] Только несколько scFv связывались с ECD IL-4R яванского макака. Три scFv показали перекрестную реактивность в условиях захвата по сравнению с одним scFv в прямых условиях, а это означает, что связывание двух scFv больше нельзя было измерить в прямых условиях. Это, скорее всего, является следствием более низких значений KD, определенных в прямых условиях. Разница была из-за скорости включения, которая была медленнее, возможно, из-за более низкой доступности. Скорости диссоциации были сопоставимы для всех scFv.

[0190] Кроме того, была определена перекрестная реактивность с IL-4-R ECD игрушки. Результаты обобщены в Таблице 9.

[0191] Связывание с IL-4R мыши также оценивали для scFv PRO1517, PRO1535 и PRO1538, но ни один из них не показал перекрестной реактивности.

Анализ репортерного гена Stat-6 в клетках HEK-Blue (блокировка индуцированной IL-4 человека и IL-13 человека передачи сигналов)

[0192] В анализе HEK-Blue тестировали способность гуманизированных scFv ингибировать индуцированную IL-4 и IL-13 передачу сигналов через IL-4R. 50000 клеток на лунку высевали в 96-луночный планшет. В планшеты добавляли серийные разведения scFv и контрольного антитела дупилумаба в присутствии либо 0,02 нг/мл IL-4, либо 0,3 нг/мл IL-13. После 24-часовой инкубации при 37°C и 5% CO₂ супернатанты переносили на новый планшет и определяли количество секретируемой эмбриональной щелочной фосфатазы с использованием субстрата Quanti-Blue.

[0193] В этом анализе HEK-Blue scFv анализировали на их способность блокировать опосредованную IL-4R передачу сигналов. Активность анализируемых молекул сравнивали с дупилумабом. Все данные об эффективности приведены в Таблице 10. Относительные значения IC₅₀ рассчитывали в единицах массы (нг/мл) дупилумаба и scFv. Восемь scFv блокировали индуцированную IL-4 и IL-13 передачу сигналов с высокой эффективностью. scFv на основе клона 44-34-C10, а также PRO1552, продемонстрировали наилучшую общую блокирующую активность. PRO1517, PRO1524, PRO1535, PRO1538 и PRO1552 могут блокировать индуцированную IL-4 и IL-13 передачу сигналов с эффективностью, аналогичной дупилумабу.

Конкурентный ИФА (ингибирование связывания hIL-4 с hIL-4R)

[0194] Активность гуманизированных scFv далее определяли с помощью конкурентного ИФА. Способность каждого scFv ингибировать взаимодействие между IL-4

человека и IL-4R человека оценивали с помощью ИФА с использованием той же процедуры, которая описана в EP 20216928.0. Аналогично анализу репортерного гена stat-6, индивидуальные значения IC50 на каждом планшете калибровали относительно IC50 эталонной молекулы дупилумаба.

[0195] Семь scFv ингибировали взаимодействие между IL-4 человека и IL-4R человека с эффективностью от хорошей до высокой. scFv на основе клона 44-34-C10, а также PRO1552, продемонстрировали наилучшую общую блокирующую активность. Блокирующая активность PRO1517 и PRO1552 была аналогична дупилумабу. С другой стороны, PRO1538 показал лишь умеренное ингибирование. Пять молекул scFv не проявляли ингибирования.

Краткое изложение фармакологической характеристики scFv и отбор молекул для оценки возможности разработки

[0196] Фармакологическая характеристика 14 scFv, полученных из четырех различных клонов В-клеток, послужила основой для отбора молекул для расширенной биофизической характеристики. Пять молекул, а именно PRO1517, PRO1535, PRO1524, PRO1506 и PRO1538, были отобраны для дальнейшей расширенной характеристики на основании их общей лучшей эффективности с точки зрения нейтрализации индуцированной IL-4 и IL-13 передачи сигналов в анализе репортерного гена stat-6 и в IL-4/IL-4R-блокирующем ИФА. Все семь молекул показали аффинности лучше, чем 500 пМ. Аффинность к IL4R яванского макака была ниже в 4-20 раз по сравнению с IL-4R человека, за исключением трех молекул, которые показали очень низкую аффинность к IL-4R яванского макака или отсутствие связывания. В частности, scFv на основе клона 44-18-C11, т. е. PRO1510, PRO1528 и PRO1549-PRO1554 не продемонстрировали связывания с IL-4R яванского макака. Как правило, аффинность этих scFv к IL-4R игрушки была ниже по сравнению с IL-4R человека. В результате этих исследований аффинности scFv на основе клона 44-18-C11, т. е. PRO1510, PRO1528 и PRO1549-PRO1554 были исключены из дальнейшей оценки из-за отсутствия у них перекрестной реактивности с IL-4R яванского макака, даже несмотря на то, что PRO1552 показал очень хорошую ингибирующую способность. По тем же причинам был исключен PRO1520. Однако PRO1538 на основе того же клона 44-39-B07, не был исключен, несмотря на его слабую аффинность связывания с IL-4R яванского макака.

Биофизическая характеристика подходящих анти-IL-4R-связывающих доменов (формат scFv)

Производство материалов для измерения стабильности

[0197] PRO1517 и PRO1538 снова получали с использованием того же производственного процесса, который описан выше, в несколько большем масштабе (объем экспрессии 0,25 мкл), чтобы получить достаточное количество материала для оценки стабильности. Для других белков, которые были отобраны для оценки стабильности, количества ранее полученного материала было достаточно для проведения оценки стабильности. Образцы готовили в 50 mM фосфатно-цитратном буфере с 150 mM NaCl при

pH 6,4 (50 mM NaClP, pH 6,4) после очистки. После очистки и диализа образцы белка концентрировали до ≥ 10 мг/мл с использованием центрифужных концентрационных пробирок с 5MWCO, так как это желаемая концентрация для проведения оценки стабильности при хранении.

[0198] Потеря мономера при концентрации до 10 мг/мл составляла от 0 до 12% в зависимости от молекулы, как показано в Таблице 11. Мономерное содержание PRO1506 и PRO1524 упало ниже 95%, что является критическим значением для молекул, которые оценивают на стабильность при хранении, и, следовательно, причиной их исключения из исследования. Тем не менее, поскольку материал уже был подготовлен и все было подготовлено для исследования, стабильность этих молекул оценивали наряду с остальными молекулами, которые демонстрировали содержание мономеров $>95\%$ после концентрирования. scFv на основе клона 44-34-C10, т. е. PRO1517 и PRO1535, а также PRO1538 практически не показали потери содержания мономеров при концентрировании.

Исследование стабильности при хранении

[0199] Гуманизированные scFv были подвергнуты исследованиям стабильности, таким как четырехнедельное исследование стабильности, в котором scFv были приготовлены в буфере на водной основе (50 mM NaClP, 150 mM NaCl, pH 6,4) при 10 мг/мл и хранились при температуре $< -80^{\circ}\text{C}$, 4°C и 40°C в течение четырех недель. Как минимум, фракции мономеров и олигомеров в составе оценивали путем интегрирования площадей пиков SE-HPLC через одну неделю, две недели и в конце каждого исследования. Дополнительные моменты времени были зарегистрированы для большинства молекул. В Таблице 12 сравниваются измерения на 14-й день (d14) и конечные точки, полученные на 28-й день (d28) исследования.

Таблица 9: Аффинность scFv к IL-4R яванского макака и игрунки. sc01: трансплантат CDR; sc04: полный трансплантат; sc05-sc10: Другой вариант трансплантата

ID белка	scFv	Аффинность к IL-4R яванского макака Условия захвата			Аффинность к IL-4R яванского макака прямые условия			Аффинность к IL-4R игрунки прямые условия		
		ID клона	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (M)	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (M)	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})
PRO1506	44-03-A03 -sc01	NB	NB	NB	NB	NB	NB	3,78E+06	7,45E-04	1,97E-10
PRO1524	44-03-A03 -sc04	1,37E+09	8,07E+01	5,89E-08	NB	NB	NB	2,27E+06	2,06E-04	9,09E-11
PRO1510	44-18-C11 -sc01	NB	NB	NB	H.A.	H.A.	H.A.	H.A.	H.A.	H.A.
PRO1528	44-18-C11 -sc04	NB	NB	NB	NB	NB	NB	6,43E+06	4,39E-03	6,83E-10
PRO1549	44-18-C11 -sc05	NB	NB	NB	H.A.	H.A.	H.A.	H.A.	H.A.	H.A.
PRO1550	44-18-C11 -sc06	NB	NB	NB	H.A.	H.A.	H.A.	H.A.	H.A.	H.A.
PRO1551	44-18-C11 -sc07	NB	NB	NB	H.A.	H.A.	H.A.	H.A.	H.A.	H.A.
PRO1552	44-18-C11 -sc08	NB	NB	NB	NB	NB	NB	1,57E+07	1,28E-03	8,16E-11
PRO1553	44-18-C11 -sc09	NB	NB	NB	NB	NB	NB	6,64E+06	5,38E-03	8,09E-10
PRO1554	44-18-C11 -sc10	NB	NB	NB	H.A.	H.A.	H.A.	H.A.	H.A.	H.A.
PRO1517	44-34-C10 -sc01	1,92E+06	1,82E-04	9,46E-11	5,94E+05	4,04E-04	6,81E-10	2,67E+06	1,05E-03	3,92E-10
PRO1535	44-34-C10 -sc04	1,60E+06	2,64E-04	1,65E-10	6,34E+05	2,38E-04	3,76E-10	3,23E+06	2,54E-03	7,87E-10
PRO1520	44-39-B07 -sc01	NB	NB	NB	H.A.	H.A.	H.A.	H.A.	H.A.	H.A.
PRO1538	44-39-B07 -sc04	5,29E+04	8,06E-04	1,52E-08	NB	NB	NB	1,02E+06	1,83E-04	1,80E-10

H.A.: не анализировали; NB: нет связывания

Таблица 10. Способность scFv нейтрализовать индуцированную IL-4 и IL-13 передачу сигналов в анализе репортерного гена stat-6. sc01: трансплантат CDR; sc04: полный трансплантат; sc05-sc10: Другой вариант трансплантата.

ID белка	scFv	Нейтрализация индуцированной hIL-4 передачи сигналов в анализе репортерного гена		Нейтрализация индуцированной hIL-13 передачи сигналов в анализе репортерного гена	
		IC ₅₀ [нг/мл]	отн. IC ₅₀ *	IC ₅₀ [нг/мл]	отн. IC ₅₀ *
PRO1506	44-03-A03-sc01	0,93	0,78	2,06	0,98
PRO1524	44-03-A03-sc04	0,95	0,80	1,81	1,05
PRO1510	44-18-C11-sc01	нет ингибирования	n/a	нет ингибирования	n/a
PRO1528	44-18-C11-sc04	1,49	0,28	2,29	0,59
PRO1549	44-18-C11-sc05	нет ингибирования	n/a	нет ингибирования	n/a
PRO1550	44-18-C11-sc06	нет ингибирования	n/a	нет ингибирования	n/a
PRO1551	44-18-C11-sc07	нет ингибирования	n/a	нет ингибирования	n/a
PRO1552	44-18-C11-sc08	0,43	1,30	1,02	1,41
PRO1553	44-18-C11-sc09	1,19	0,47	6,05	0,24
PRO1554	44-18-C11-sc10	нет ингибирования	n/a	нет ингибирования	n/a
PRO1517	44-34-C10-sc01	1,44	0,39	1,83	0,57
PRO1535	44-34-C10-sc04	1,15	1,02	2,30	0,99
PRO1520	44-39-B07-sc01	Н.А.	Н.А.	Н.А.	Н.А.
PRO1538	44-39-B07-sc04	0,64	1,83	1,69	1,35

Н.А.: не анализировали

* IC₅₀, дупилумаб/IC₅₀, тестируемый образец

n/a: отн. IC₅₀ не рассчитывали (нет ингибирования или IC₅₀ не определяли)

Таблица 11: % потери мономера (SE-HPLC) при концентрации до 10 мг/мл. Sc01: трансплантат CDR, sc04: полный трансплантат

ID белка	ID клона (scFv)	Исходное содержание мономера [%]	Содержание мономера	
			после концентрирования до 10 мг/мл [%]	% потери после концентрирования до 10 мг/мл
PRO1506	44-03-A03 -sc01	99,0	92,5	6,6
PRO1517	44-34-C10 -sc01	97,6	97,4	0,2
PRO1524	44-03-A03-sc04	99,0	87,3	11,8
PRO1535	44-34-C10-sc04	99,1	99,0	0,1
PRO1538	44-39-B07-sc04	95,0	98,2	-3,4

[0200] Как видно из Таблицы 12, scFv на основе клона 44-34-C10, т. е. PRO1517 и PRO1535 показали хорошую стабильность при хранении при 4°C. Потеря содержания мономеров после хранения при 4°C в течение 28 дней составила менее 5%. Также PRO1538 показал хорошую стабильность при хранении по меньшей мере в течение 14 дней. Однако ни одна из стабильных молекул не показала значительной потери содержания белка при любой температуре.

Стабильность при замораживании-оттаивании

[0201] В дополнение к исследованию стабильности при хранении, описанному выше, была оценена совместимость наиболее эффективных молекул scFv в отношении циклов замораживания-оттаивания (F/T) (коллоидная стабильность). Поскольку на ранних стадиях разработки лекарственное вещество обычно хранится в замороженном виде, приготовление состава и процесс наполнения/окончательной обработки потребуют некоторых операций замораживания и оттаивания.

[0202] Для оценки стабильности F/T применяли те же аналитические методы (SE-HPLC, SDS-PAGE) и параметры (% содержания мономера и % потери мономера), что и для исследования стабильности при хранении, для контроля качества молекул в течение пяти циклов F/T. Таблица 13 иллюстрирует ход потери % содержания мономера в течение пяти циклов F/T. Поскольку специальное исследование замораживания-оттаивания не проводили, показаны данные замораживания-оттаивания, полученные с образцами при температуре -80°C в ходе исследования стабильности при хранении, которые были получены в течение 28 дней. Поскольку для некоторых белков можно было зарегистрировать только четыре временные точки, с этими белками также проводили только четыре F/T-цикла.

Таблица 12: Исследование стабильности при хранении в течение 28 дней при 10 мг/мл и температурах -80°C, 4°C и 40°C.

Sc01: трансплантат CDR, sc04: полный трансплантат

ID белка	ID клона (scFv)	Temp. [°C]	содержание мономера [%]			% изменения мономера		концентрация белка [мг/мл]			% изменения содержания белка	
			д0	д14	д28	д14	д28	д0	д14	д28	д14	д28
PRO1506	44-03-A03-sc01	-80	92,5	91,9	94,1	-0,6	1,7	10,1	9,8	Н.А.	-3,0	Н.А.
		4	92,5	92,3	92,2	-0,3	-0,3	10,1	9,4	Н.А.	-6,7	Н.А.
		40	92,5	91,7	92,1	-0,9	-0,5	10,1	9,7	10,3	-3,7	2,0
PRO1517	44-34-C10-sc01	-80	97,4	97,1	96,8	-0,4	-0,7	10,0	9,9	10,9	-1,5	8,4
		4	97,4	96,4	95,2	-1,1	-2,3	10,0	7,9	11,9	-21,7	18,8
		40	97,4	87,2	86,6	-10,5	-11,2	10,0	10,2	10,7	2,0	6,9
PRO1524	44-03-A03-sc04	-80	87,3	88,7	88,9	1,6	1,8	10,5	10,3	9,6	-1,9	-8,1
		4	87,3	89,2	88,2	2,2	1,0	10,5	10,2	9,6	-2,4	-8,8
		40	87,3	88,4	88,4	1,2	1,3	10,5	11,4	13,5	8,4	28,5
PRO1535	44-34-C10-sc04	-80	99,0	98,5	98,1	-0,5	-0,9	10,5	10,9	9,6	3,3	-9,1
		4	99,0	96,9	95,0	-2,1	-4,1	10,5	10,4	7,8	-1,4	-25,6
		40	99,0	90,3	88,6	-8,8	-10,5	10,5	10,8	10,8	2,6	3,1
PRO1538	44-39-B07-sc04	-80	98,2	97,8	Н.А.	-0,3	Н.А.	10,4	10,5	Н.А.	0,6	Н.А.
		4	98,2	96,0	Н.А.	-2,2	Н.А.	10,4	10,2	Н.А.	-2,0	Н.А.
		40	98,2	88,3	Н.А.	-10,0	Н.А.	10,4	12,0	Н.А.	15,2	Н.А.

Н.А. не анализировали

Таблица 13: Стабильность F/T - содержание мономера в % и % изменения мономера при повторном замораживании-оттаивании. Sc01: трансплантат CDR, sc04: полный трансплантат

ID белка	ID клона (scFv)	содержание мономера [%]						% изменения мономера				
		F/T 0	F/T 1	F/T 2	F/T 3	F/T 4	F/T 5	F/T 1	F/T 2	F/T 3	F/T 4	F/T 5
PRO1506	44-03-A03-sc01	92,51	92,4	92,6	91,9	94,1	Н.А.*	-0,1	0,1	-0,6	1,7	Н.А.*
PRO1517	44-34-C10-sc01	97,44	97,7	97,7	97,1	96,9	96,8	0,2	0,3	-0,4	-0,6	-0,7
PRO1524	44-03-A03-sc04	87,31	85,5	85,6	88,7	88,9	Н.А.*	-2,1	-2,0	1,6	1,8	Н.А.*
PRO1535	44-34-C10-sc04	98,98	99,0	98,8	98,5	98,1	Н.А.*	0,0	-0,2	-0,5	-0,9	Н.А.*
PRO1538	44-39-B07-sc04	98,17	98,2	98,2	97,8	97,8	Н.А.*	0,0	0,0	-0,3	-0,4	Н.А.*

*неприменимо, так как можно измерить только 4 временные точки

Таблица 14: DSF выбранных доменов. Sc01: трансплантат CDR, sc04: полный трансплантат

ID белка	ID клона (scFv)	Чистота SE-HPLC [% мономера]	T _m [°C]	T _{onset} [°C]
PRO1506	44-03-A03-sc01	99,0	62,8	56,7
PRO1517	44-34-C10-sc01	97,6	63,7	57,0
PRO1524	44-03-A03-sc04	99,0	59,6	54,0
PRO1535	44-34-C10-sc04	99,1	67,9	62,7
PRO1538	44-39-B07-sc04	95,0	68,3	63,7

Тепловое разворачивание

[0203] Измерения теплового разворачивания пяти выбранных конструкций scFv проводили с использованием дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF). Результирующую среднюю точку теплового разворачивания (T_m) и температуру начала разворачивания, рассчитанную при 10% значений максимального сигнала (Tonset 10%), определяли путем аппроксимации данных к уравнению Больцмана. В Таблице 14 приведены расчетные температуры плавления, измеренные методом DSF. Как видно из Таблицы 14, scFv на основе клона 44-34-C10, демонстрируют высокие температуры плавления, превышающие 63°C. Кроме того, PRO1538 показал высокую температуру плавления.

Пример 2: Создание и тестирование анти-IL31-молекул:

Цель проекта

[0204] Целью проекта было создание гуманизированных фрагментов моноклональных антител, которые специфически связываются и нейтрализуют биологический эффект человеческого IL-31. Еще одна цель состояла в том, чтобы идентифицировать фрагменты антитела против IL-31, которые являются эффективными и достаточно стабильными для включения в форматы полиспецифических антител.

2.1. Создание, селекция, гуманизация и продукция анти-IL-31-связывающих доменов, включенных в полиспецифические антитела по настоящему изобретению.

[0205] Генерацию кроличьих антител против IL-31, скрининг и отбор подходящих клонов, а также гуманизацию и получение гуманизированных анти-IL-31-связывающих доменов проводили, как описано в параллельной заявке на патент EP20216938.9, которая включена в настоящее описание ссылкой. Анти-IL-31-связывающие домены, эффективные и стабильные

[0206] идентифицировали и отбирали на основе их биофизических и функциональных свойств в количестве, достаточном для включения в форматы полиспецифических антител. Было установлено, что клон 50-09-D07 имеет в целом наилучшие биофизические и функциональные свойства.

2.2. Характеристика подходящих анти-IL-31-связывающих доменов

[0207] Для дальнейшей характеристики подходящих анти-IL-31-связывающих доменов были проведены следующие анализы.

2.2.1. Производство подходящих анти-IL-31-связывающих доменов для

характеристики (формат scFv)

[0208] Экспрессию конструкций млекопитающих проводили в клетках CHO-S, как описано выше в разделе 1.2.1. Производство двух конструкций scFv sc01 и sc03 (PRO1632 и PRO1643, соответственно), происходящих из одного клона, т. е. клона 50-09-D07, представлено в Таблице 15.

2.2.2. Фармакодинамическая характеристика подходящих анти-IL-31-связывающих доменов (формат scFv)

[0209] Антитела scFv, которые были признаны подходящими, т. е. PRO1632 и PRO1643, характеризовались первичными фармакодинамическими свойствами.

Аффинность к IL-31 человека и яванского макака

[0210] Аффинность двух гуманизированных scFv к IL-31 человека и яванского макака определяли анализом SPR на устройстве T200 (Biacore, GE Healthcare). IL-31 яванского макака производили по запросу Sino Biological, поскольку он не был доступен в продаже. IL-31-His человека и яванского макака захватывали с помощью антитела против метки His, соединенного с поверхностью карбоксиметилированного декстрана, и scFv инъецировали в качестве аналита. После каждого цикла введения аналита сенсорный чип регенерировали и происходил захват нового антигена. scFv измеряли с помощью многоциклового кинетического анализа доза-ответ в режиме высокой пропускной способности с двумя концентрациями (30 и 10 нМ), разведенными в рабочем буфере. Полученные сенсограммы аппроксимировали с использованием модели связывания 1:1.

[0211] Как показано в Таблице 16, связывание с IL-31 человека было подтверждено для обоих гуманизированных scFv.

Анализ димеризации IL-31RA/OSMR (блокировка индуцированной IL-31 человека передачи сигналов)

[0212] Анализ димеризации IL-31RA/OSMR использовали для проверки способности гуманизированных scFv ингибировать индуцированную IL-31 передачу сигнала через гетеродимер IL-31RA/OSMR. 10000 клеток на лунку высевали в 96-луночный планшет. Серийные разведения scFv и контрольного антитела BMS-981164 добавляли в планшеты на следующий день в присутствии 10 нг/мл IL-31. После 6-часовой инкубации при 37°C и 5% CO₂ добавляли раствор для детектирования, планшеты инкубировали еще в течение часа и измеряли люминесценцию.

[0213] Два scFv тестировали в клеточном анализе. Как описано выше, эффективность анализируемых молекул сравнивали с BMS-981164.

[0214] Относительные значения IC₅₀ рассчитывали в единицах массы (нг/мл) BMS-981164 и scFv. Данные об активности приведены в Таблице 17.

Таблица 17. Способность scFv нейтрализовать индуцированную IL-31R и IL-31 передачу сигналов в анализе димеризации IL-31RA/OSMR. sc01: трансплантат CDR; sc03: полный трансплантат.

ID белка	scFv	Нейтрализация индуцированной hIL-31 передачи сигналов в анализе димеризации IL-31RA/OSMR	
	ID клона	IC ₅₀ [нг/мл]	Отн. IC ₅₀ *
PRO1632	50-09-D07-sc01	53,29	0,2
PRO1643	50-09-D07-sc03	11,14	1,16

*: IC₅₀, BMS-981164/IC₅₀, тестируемый образец

Таблица 15: производство scFv из 2 отобранных клонов. Sc01: трансплантат CDR; sc03: Полный трансплантат.

ID белка	ID клона (scFv)	Объем экспрессии [мл]	Выход после очистки с помощью аффинной хроматографии [мг]	Выход/л после очистки с помощью аффинной хроматографии [мг/л]	Конечный выход [мг]	Титр [мг/л]	Чистота SE-HPLC [% мономер]	Чистота SDS-PAGE
PRO1632	50-09-D07-sc01	30	5.8	193	0.7	23	96.4	подтвержденная идентичность ^{o*}
PRO1643	50-09-D07-sc03	30	0.7	23	0.2	7	90.4	подтвержденная идентичность ^{o**}

*обнаружен только интересующий белок

Таблица 16: Аффинность scFv к IL-31 человека. sc01: трансплантат CDR; sc03: Полный трансплантат.

ID белка	scFv	Аффинность к IL-31 человека			Аффинность к IL-31 яванского макака			
		ID клона	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (M)	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (M)
PRO1632	50-09-D07-sc01		1,02E+06	1,26E-03	1,24E-09	1,52E+06	3,06E-03	2,01E-09
PRO1643*	50-09-D07-sc03		8,84E+05	4,47E-04	5,05E-10	7,61E+05	4,44E-04	5,83E-10
PRO1643**	50-09-D07-sc03		8,20E+05	5,16E-04	6,30E-10	7,64E+05	4,26E-04	5,57E-10

* K_D PRO1643 определяли дважды. Первую K_D ($KD 1$) определяли в данном первом анализе SPR в режиме скрининга.

** Вторую K_D ($KD 2$) определяли в данном втором анализе SPR с использованием режима полного титрования.

Конкурентный ИФА (ингибирование связывания hIL-31 с hIL-31RA)

[0215] Эффективность двух гуманизированных scFv дополнительно определяли с использованием конкурентного ИФА. Способность каждого scFv ингибировать взаимодействие между IL-31 человека и IL31RA человека оценивали с помощью ИФА с использованием такой же процедуры, как описано в EP 20216938.9. По сравнению с анализом димеризации IL-31RA/OSMR отдельные значения IC₅₀ на каждой планшете калибровали по IC₅₀ эталонной молекулы BMS-981164. Полные трансплантаты scFv ингибировали взаимодействие между IL-31 человека и IL-31RA человека с аналогичной эффективностью по сравнению с BMS-981164. Данные об активности приведены в Таблице 18.

Таблица 18. Способность scFv ингибировать взаимодействие между IL-31 и IL-31R. sc01: трансплантат CDR; sc03: Полный трансплантат.

ID белка	scFv	Эффективность в ИФА IL-31/IL-31RA	
	ID клона	IC ₅₀ [нг/мл]	Отн. IC ₅₀ *
PRO1632	50-09-D07-sc01	22,91	0,41
PRO1643	50-09-D07-sc03	4,58	2,04

*: IC₅₀, BMS-981164/IC₅₀,
тестируемый образец

Краткое изложение фармакологической характеристики scFv и отбора молекулы для подробной биофизической оценки

[0216] Фармакологическая характеристика двух scFv послужила основой для отбора молекул для подробной биофизической оценки. На основе этих результатах, PRO1643 был отобран для детальной биофизической оценки на основе его общих лучших характеристик.

2.2.3 Биофизическая характеристика подходящих анти-IL-31-связывающих доменов (формат scFv)

Производство материала для оценки стабильности

[0217] PRO1643 снова был получен с использованием того же производственного процесса, который описан выше, в несколько большем масштабе (объем экспрессии 0,25 мкл), чтобы получить достаточное количество материала для оценки стабильности. Образцы готовили в 50 mM фосфатно-цитратном буфере с 150 mM NaCl при pH 6,4 (50 mM NaClP, pH 6,4). Белок концентрировали до >10 мг/мл с использованием центрифужных концентрационных пробирок с 5MWCO после очистки и диализа.

[0218] Потеря мономера при концентрации до 10 мг/мл составила 0,1%, как показано в Таблице 19.

Таблица 19: % потери мономера (SE-HPLC) при концентрации до 10 мг/мл. Sc03: Полный трансплантат

ID белка	ID клона (scFv)	Исходное содержание мономера [%]	Содержание	
			мономера после концентрирования до 10 мг/мл[%]	% потери после концентрирования до 10 мг/мл
PRO164				
3	50-09-D07-sc03	98,3	98,2	0,1

Исследование стабильности при хранении

[0219] PRO1643 подвергали исследованиям стабильности, таким как четырехнедельное исследование стабильности, в котором scFv готовили в буфере на водной основе (конечный буфер, 50 mM NaClP, 150 mM NaCl, pH 6,4) при 10 мг/мл и хранили при < - 80°C, 4°C и 40°C в течение четырех недель. Фракции мономеров и олигомеров в составе оценивали путем интегрирования площадей пиков SE-HPLC в разные моменты времени исследования. Кроме того, концентрацию белка определяли измерением UV280 в разные моменты времени. В Таблице 20 сравниваются измерения 14-го дня и конечной точки, полученные на 28-й день исследования.

[0220] PRO1643 не показал значительной потери содержания мономеров при 4°C и 28-м дне исследования. PRO1643 не показал значительной потери содержания белка при любой температуре.

Стабильность при замораживании-оттаивании

[0221] В дополнение к описанному выше исследованию стабильности при хранении оценивали совместимость PRO1643 в отношении циклов замораживания-оттаивания (F/T) (коллоидная стабильность).

[0222] Для оценки стабильности F/T применяли те же аналитические методы (SE-HPLC, UV-Vis) и параметры (% содержания мономера и % потери мономера), что и для исследования стабильности при хранении, для мониторинга стабильности молекул в течение трех циклов F/T. Таблица 21 иллюстрирует изменение содержания мономера в % и % потери содержания мономера в течение трех циклов F/T. Поскольку специальное исследование замораживания-оттаивания не проводили, данные замораживания-оттаивания, полученные с образцами при температуре -80°C в ходе исследования стабильности при хранении, которые были получены в течение 28 дней, показаны в таблице ниже. Поскольку для каждого образца можно зарегистрировать только три временные точки, данные о стабильности при замораживании-оттаивании доступны только для трех F/T-циклов.

Тепловое разворачивание

[0223] Измерение теплового разворачивания PRO1643 выполняли с использованием дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF). Результирующая средняя точка теплового разворачивания (Tm) и температура начала разворачивания, рассчитанная при

10% значений максимального сигнала (Tonset 10%), определяли путем аппроксимации данных к уравнению Больцмана. В Таблице 22 приведены расчетные температуры плавления, измеренные методом DSF.

Пример 3: Отбор и оптимизация анти-IL-4R-молекул для полиспецифического формата:

3.1. Общие замечания по отбору анти-IL-4R-доменов

[0224] Анти-IL-4R-домены PRO1517 (44-34-C10-sc01) и PRO1535 (44-34-C10-sc04) были отобраны в первую очередь, поскольку они обладают очень хорошими фармакодинамическими свойствами и стабильностью от приемлемой до хорошей. PRO1538 (44-39-B07-sc04) также был отобран, поскольку показал наилучшую стабильность, хотя и с возможностью улучшения фармакологических свойств. PRO1517 (44-34-C10-sc01) подвергали оптимизации стабильности, а PRO1538 (44-39-B07-sc04) подвергали оптимизации баланса pI, как показано ниже в 3.2.

[0225] Анти-IL4R-связывающие домены, примененные в конечных полиспецифических антителях, продемонстрировали исключительную перекрестную реактивность в отношении яванского макака и игрунки.

3.2. Оптимизация анти-IL-4R-доменов

[0226] Анти-IL-4R-домены PRO1538 (44-39-B07-sc03) и PRO1517 (44-34-C10-sc01) были дополнительно оптимизированы для сборки в полиспецифические форматы.

Таблица 20: Исследование стабильности при хранении в течение 28 дней при 10 мг/мл и температурах -80°C, 4°C и 40°C. Sc03: Полный трансплантат

ID белка	ID клона (scFv)	Тем. р. [°C]	содержание мономера [%]			% изменения мономера		концентрация белка [мг/мл]			% изменения содержания белка	
			д0	д14	д28	д14	д28	д0	д14	д28	д14	Д28
			PRO16 43	50-09- D07- sc03	-80	98,2	98,3	99,2	0,1	1,0	10,6	12,4
4	98,2	98,2			99,0	-0,1	0,7	10,6	11,9	10,3	18,4	2,6
40	98,2	97,2			97,8	-1,0	-0,4	10,6	12,1	13,0	20,6	29,1

Таблица 21: Стабильность F/T - содержание мономера в % и % изменения мономера при повторном замораживании-оттаивании. Sc03: Полный трансплантат

ID белка	ID клона (scFv)	содержание мономера [%]				% изменения мономера		
		F/T 0	F/T 1	F/T 2	F/T 3	F/T 1	F/T 2	F/T 3
PRO1643	50-09-D07-sc03	98,2	98,2	98,3	99,2	-0,1	0,1	1

Таблица 22: Измерение DSF для отобранных доменов scFv. Sc03: Полный трансплантат

ID белка	ID клона (scFv)	Чистота SE-HPLC [% мономера]	T _m [°C]	T _{onset10%} [°C]
PRO1643	50-09-D07-sc03	90,4*	69,5	64,3

*исходный материал с содержанием мономера 90,4%, использованный для измерения

Оптимизация анти-IL-4R 44-39-B07-sc04-домена (PRO1538)

[0227] PRO1538 (44-39-B07-sc03) имеет дисбаланс pI между VL и VH (pIVL=8,2 и pIVH=5,0). Дисбаланс pI коррелирует с высокой вязкостью и может негативно повлиять на стабильность. Поэтому были разработаны два новых варианта этой молекулы. Эти варианты описаны ниже. Вкратце, все остатки в VH были детально проанализированы с целью создания молекул с устраненным дисбалансом pI, без ущерба для аффинности связывания и без введения критических уязвимостей последовательности (химических и посттрансляционных модификаций), T-клеточных эпитопов и т. д.

[0228] Были разработаны два варианта, которые приведены в Таблице 23.

[0229] Однако эти варианты PRO1538 (44-39-B07-sc03) не показали желаемого улучшения стабильности. Поскольку PRO1538 значительно менее эффективен в ингибировании индуцированной IL-4 и IL-13 передачи сигналов и имеет более чем в 10 раз меньшую эффективность в блокировании взаимодействия IL-4 с IL-4R, чем PRO1517, PRO1538, его варианты были исключены из дальнейшего рассмотрения, и усилия были сосредоточены на улучшении PRO1517 (4434C10sc01).

Таблица 23: Варианты оптимизации для 44-39-B07-sc03

ID белка	Конструкция	Цель оптимизации	Мутации VL	Мутации VH
PRO2097	44-39-B07-sc05	Баланс pI	I2V, A51P, P75S, G82R, F89Y	V2E, A25R, R82S, Y105F, T143R
PRO2098	44-39-B07-sc06	Баланс pI	I2V, A51P, P75S, G82R, F89Y	V2E, A24R, R82S, Y105F, T143R

Оптимизация анти-IL-4R 44-34-C10-sc01-домена (PRO1517)

[0230] PRO1517 (44-34-C10-sc01) представляет собой анти-IL-4R-scFv с благоприятными характеристиками связывания. Во время биофизической характеристики scFv PRO1517 продемонстрировал хорошую растворимость, но все еще с возможностью улучшения. Были предприняты усилия для дальнейшего улучшения PRO1517 в отношении растворимости, долговременной стабильности и концентрации. Поэтому было разработано четыре новых варианта этой молекулы. Эти варианты описаны ниже. Вкратце, гидрофобные участки в CDR или на прежнем интерфейсе VH-CN были подробно проанализированы, и дисбаланс pI был уменьшен с целью конструирования молекул с удаленными гидрофобными участками без ущерба для аффинности связывания и без

внесения критических уязвимостей последовательности (химических и пост-трансляционные модификации), Т-клеточных эпитопов и т. д.

[0231] Были разработаны четыре варианта, которые приведены в Таблице 24.

Таблица 24: Варианты оптимизации для 44-34-C10-sc01

ID белка	Конструкция	Цель оптимизации	Мутации VL	Мутации VH
PRO1896	44-34-C10-sc06	Растворимость, стабильность		L12R, V103T, L144Q
PRO1897	44-34-C10-sc07	Растворимость, стабильность	Y72S	
PRO1898	44-34-C10-sc08	Растворимость, стабильность	S14R, T87R	
PRO1899	44-34-C10-sc09	Растворимость, стабильность, аффинность		L12R, V103T, L144Q+RDNSK N заменяли на KASST (АНо 82-87)

3,3 Биофизическая характеристика оптимизированных анти-IL-4R-связывающих домена (формат scFv)

Исследование стабильности при хранении

[0232] PRO1897, PRO1898 и PRO1899 подвергали исследованиям стабильности при хранении, как описано выше в разделе 1.2.3. Результаты суммированы в Таблице 25.

[0233] Как видно из Таблицы 25, scFv PRO1897, PRO1898 и PRO1899 демонстрируют превосходную стабильность при хранении. Потеря содержания мономеров после хранения при 4°C в течение 28 дней составила менее 5%. Кроме того, ни одна из этих молекул не показала значительной потери содержания белка при любой температуре.

Тепловое разворачивание

[0234] Термостабильность PRO1897, PRO1898 и PRO1899 анализировали с помощью нанодинамической сканирующей флуориметрии (nDSF) с использованием NanoTemper, позволяющего определить начало разворачивания (Tonset), среднюю точку разворачивания (Tm1) и температуру начала рассеяния. Результаты повторных/тройных измерений Tm1 и Tonset приведены в Таблице 26. Как видно из таблицы 26, PRO1897, PRO1898 и PRO1899 демонстрируют высокие температуры плавления.

Таблица 25: Хранение в течение 28 дней и исследование стабильности F/T при 10 мг/мл и температурах -80°C, 4°C и 40°C.

ID белка	ID клона (scFv)	Темп. [°C]	содержание мономера [%]			% изменения мономера		концентрация белка [мг/мл]			% изменения содержания белка	
			д0	д1	д28	д1	д28	д0	д1	д28	д1	д28
PRO1897	44-34-C10-sc07	-80	97,7	97,7*	Н.А.	-0,1*	Н.А.	10,2	10,5*	Н.А.	2,2*	Н.А.
		4	97,7	98	97	-0,1	-0,3	10,2	10	11	0,3	3,6
		40	97,7	95	87	-2,6	-10,8	10,2	11	13	2,6	30,0
PRO1898	44-34-C10-sc08	-80	97,4	97,3*	Н.А.	-0,1*	Н.А.	10,2	10,4*	Н.А.	1,8*	Н.А.
		4	97,4	97	96	-0,1	-1,1	10,2	10	10	-0,3	-1,7
		40	97,4	93	86	-4,4	-11,8	10,2	10	11	-1,7	9,7
PRO1899	44-34-C10-sc09	-80	98,1	98,0*	Н.А.	0,0*	Н.А.	10,5	10,7*	Н.А.	1,9*	Н.А.
		4	98,1	98	98	-0,1	0,0	10,5	10	11	-0,2	1,8
		40	98,1	97	84	-0,6	-14,3	10,5	11	13	2,9	28,8

Н.А.: не анализировали; * Перед измерением было выполнено пять повторных циклов F/T.

Таблица 26: nDSF оптимизированных доменов.

ID белка	ID клона (scFv)	Чистота SE-HPLC [% мономера]	T _{m1} [°C]	T _{onset} [°C]
PRO1897	44-34-C10-sc07	98,0	70,4	65,7
PRO1898	44-34-C10-sc08	98,0	76,0	67,0
PRO1899	44-34-C10-sc09	98,7	71,3	64,9

3.4. Фармакодинамическая характеристика оптимизированных анти-IL-4R-связывающих доменов (формат scFv)

Аффинность к IL-4R человека

[0235] Аффинность оптимизированных анти-IL-4R-scFv PRO1898 и PRO1899 к IL-4R человека определяли анализом SPR на устройстве T200 (Biacore, GE Healthcare), как описано выше в разделе 1.2.2. scFv измеряли с использованием многоциклового кинетического анализа доза-ответ с семью концентрациями аналита в диапазоне от 0,12 до 90 нМ, разведенными в рабочем буфере. Полученные сенсограммы аппроксимировали с использованием модели связывания 1:1.

[0236] Как показано в Таблице 27, связывание с IL-4R человека и IL-4R яванского макака было подтверждено для всех оптимизированных scFv.

Таблица 27: Аффинность оптимизированных анти-IL-4R-scFv к IL-4R человека.

ID белка	scFv	Аффинность к IL-4R человека		
	ID клона	k _a (M ⁻¹ c ⁻¹)	k _d (c ⁻¹)	K _D (M)
PRO1898	44-34-C10-sc08	2,15E+06	1,70E-05	7,91E-12
PRO1899	44-34-C10-sc09	2,95E+06	2,04E-05	6,92E-12

Аффинность к IL-4R яванского макака

[0237] Аффинность оптимизированных анти-IL-4R-scFv PRO1898 и PRO1899 к IL-4R яванского макака измеряли с использованием тех же условий, что и для анализа аффинности IL-4R человека, с той разницей, что IL-4R яванского макака-Fc был захвачен вместо IL-4R человека-Fc, как описано выше в разделе 1.2.2. Результаты этого анализа суммированы в Таблице 28.

Таблица 28: Аффинность оптимизированных анти-IL-4R-scFv к IL-4R яванского макака.

ID белка	scFv	Аффинность к IL-4R яванского макака условия захвата		
	ID клона	k _a (M ⁻¹ c ⁻¹)	k _d (c ⁻¹)	K _D (M)
PRO1898	44-34-C10-sc08	1,20E+06	1,09E-04	9,08E-11
PRO1899	44-34-C10-sc09	1,1E+07	1,4E-04	1,2E-11

Анализ репортерного гена Stat-6 в клетках HEK-Blue (блокировка индуцированной IL-4 человека и IL-13 человека передачи сигналов)

[0238] Оптимизированные анти-IL-4R-scFv PRO1898 и PRO1899 анализировали в этом тесте НЕК-Blue на предмет их способности блокировать опосредованную IL-4R передачу сигналов, как описано выше в разделе 1.2.2. Активность анализируемых молекул сравнивали с дупилумабом. Все данные об эффективности приведены в Таблице 29. Относительные значения IC₅₀ рассчитывали в единицах массы (нг/мл) дупилумаба и scFv. Оптимизированные scFv блокировали индуцированную IL-4 и IL-13 передачу сигналов с высокой эффективностью, подобной дупилумабу (см. Фигуру 3).

Таблица 29. Эффективность scFv PRO1898 и PRO1899 в отношении нейтрализации индуцированной IL-4 и IL-13 передачи сигналов в анализе репортерного гена stat-6.

ID белка	scFv	Нейтрализация индуцированной hIL-4 передачи сигналов в анализе репортерного гена		Нейтрализация индуцированной hIL-13 передачи сигналов в анализе репортерного гена		
		ID клона	IC ₅₀ [нг/мл]	отн. IC ₅₀ *	IC ₅₀ [нг/мл]	Отн. IC ₅₀ *
Дупилумаб	Н.А.		1,15	1,00	1,00	1,00
PRO1898	44-34-C10-sc08		1,00	1,15	1,15	0,87
PRO1899	44-34-C10-sc09		0,71	1,61	0,56	1,80

IC₅₀, дупилумаб/IC₅₀, тестируемый образец

Н.А., не применимо.

Конкурентный ИФА (ингибирование связывания hIL-4 с hIL-4R)

[0239] Эффективность оптимизированных анти-IL-4R-scFv PRO1898 и PRO1899 scFv определяли с помощью конкурентного ИФА. Способность каждого scFv ингибировать взаимодействие между IL-4 человека и IL-4R человека оценивали с помощью ИФА, как описано в разделе 1.2.2. Аналогично анализу репортерного гена stat-6, индивидуальные значения IC₅₀ на каждом планшете калибровали относительно IC₅₀ эталонной молекулы дупилумаба.

[0240] Результаты конкурентного анализа ИФА суммированы в Таблице 30. Блокирующая активность PRO1898 и PRO1899 была аналогична дупилумабу (см. Фигуру 4).

Таблица 30: Способность scFv PRO1898 и PRO1899 ингибировать взаимодействие hIL-4 и IL-4R в конкурентном анализе ИФА.

ID белка	scFv	Ингибирование в конкурентном ИФА hIL-4 - IL-4R		
		ID клона	IC ₅₀ [нг/мл]	rel. IC ₅₀ *
Дупилумаб	Н.А.		6,78	1,00
PRO1898	44-34-C10-sc08		3,41	1,95
Дупилумаб	Н.А.		6,18	1,00
PRO1899	44-34-C10-sc09		2,98	2,07

IC50, дупилумаб/IC50, тестируемый образец; Н.А.: не применимо

Пример 4: Отбор и оптимизация анти-IL31-молекул для полиспецифического формата:

4.1. Общие замечания по отбору анти-IL-31-доменов

[0241] Анти-IL-31-домен PRO1643 (50-09-D07-sc03) был отобран в первую очередь для дальнейшей разработки, поскольку он проявляет желаемые фармакодинамические свойства, а также превосходную стабильность. Тем не менее, анти-IL-31-связывающий домен PRO1643 (50-09-D07-sc03) подвергся дальнейшему улучшению растворимости, как показано ниже в 4.2.

[0242] Анти-IL-31-связывающие домены, применяемые в конечных полиспецифических антителах, перекрестно реагируют с IL-31 яванского макака.

4.2. Оптимизация анти-IL-31-доменов

[0243] Анти-IL-31-домен PRO1643 (50-09-D07-sc03) был дополнительно оптимизирован для сборки в полиспецифический формат.

Оптимизация анти-IL-31-домена 50-09-D07-sc03

[0244] PRO1643 (50-09-D07-sc03) представляет собой очень стабильный анти-IL-31-scFv, однако, тем не менее, были предприняты усилия по его улучшению в отношении растворимости, долговременной стабильности и поведения концентрации. Поэтому были разработаны новые варианты этой молекулы. Эти варианты описаны ниже. Вкратце, гидрофобные участки в CDR или на прежнем интерфейсе VH-CN были подробно проанализированы с целью создания молекул с удаленными гидрофобными участками без ущерба для аффинности связывания и без внесения критических уязвимостей последовательности (химических и пост-трансляционные модификации), Т-клеточных эпитопов и т. д.

[0245] Были разработаны четыре варианта, которые приведены в Таблице 31.

Таблица 31: Варианты оптимизации для 50-09-D07-sc03

ID белка	Конструкция	Цель оптимизации	Мутации VL	Мутации VH
PRO1900	50-09-D07-sc04	Растворимость, стабильность	-	L12R, V103T, L144Q
PRO1901	50-09-D07-sc05	Растворимость, стабильность	-	L12S, V103T, L144Q
PRO1902	50-09-D07-sc06	Растворимость, стабильность	-	Y59S
PRO1903	50-09-D07-sc07	Растворимость, стабильность, уязвимость последовательности (DS)	D32E	-

4.3. Биофизическая характеристика оптимизированных анти-IL-31-связывающих доменов (формат scFv)

Исследование стабильности при хранении

[0246] PRO1900, PRO1901, PRO1902 и PRO1903 подвергали исследованиям

стабильности при хранении, как описано выше в разделе 1.2.3. кроме того, что последний показатель был взят на 14-й день, а F/T, а также не оценивали стабильность при -80°C. Результаты суммированы в Таблице 32.

[0247] Как показано в Таблице 32, scFv PRO1900, PRO1901, PRO1902 и PRO1903 проявляли превосходную стабильность при хранении. Потеря содержания мономеров после хранения при 4°C в течение 14 дней составила менее 0,2% и < 3% после хранения при 40°C в течение 14 дней. Кроме того, ни одна из этих молекул не показала значительной потери содержания белка при любой температуре и любой точке данных.

Тепловое разворачивание

[0248] Термостабильность PRO1900, PRO1901, PRO1902 и PRO1903 анализировали с помощью нанодинамической сканирующей флуориметрии (nDSF) с использованием NanoTemper, позволяющего определить начало разворачивания (Tonset), среднюю точку разворачивания (Tm1) и температуру начала рассеяния. Результаты повторных/тройных измерений Tm1 и Tonset приведены в Таблице 33. Как можно сделать вывод из Таблицы 33, PRO1900, PRO1901, PRO1902 и PRO1903 демонстрируют высокие температуры плавления.

4.4. Фармакодинамическая характеристика оптимизированных анти-IL-31-связывающих доменов (формат scFv)

Аффинность к IL-31 человека

[0249] Аффинность PRO1643 и оптимизированных анти-IL-31-scFv к IL-31 человека определяли с помощью SPR-анализа на устройстве T200 (Biacore, GE Healthcare), как описано выше в разделе 2.2.2. scFv измеряли с помощью многоциклового кинетического анализа доза-ответ в режиме высокой пропускной способности с двумя концентрациями (30 и 10 нМ), разведенными в рабочем буфере. Полученные сенсограммы аппроксимировали с использованием модели связывания 1:1.

[0250] Как показано в Таблице 34, связывание с IL-31 человека и IL-31 яванского макака было подтверждено для всех оптимизированных scFv.

Анализ димеризации Path Hunter IL-31RA/OSMR (блокировка индуцированной IL-31 человека передачи сигналов)

[0251] PRO1643 и оптимизированные scFv тестировали на их способность ингибировать индуцированную IL-31 передачу сигналов через гетеродимер IL-31RA/OSMR с использованием анализа димеризации IL-31RA/OSMR. Анализ проводили, как описано выше. Активность анализируемых молекул сравнивали с BMS-981164.

[0252] Относительные значения IC50 рассчитывали в единицах массы (нг/мл) BMS-981164 и scFv. Данные об активности приведены в Таблице 35. Как видно из Таблицы 35, PRO1643, а также оптимизированные варианты PRO1900, PRO1901 и PRO1903 могут эффективно нейтрализовать индуцированную IL-31 передачу сигналов. Мутации, введенные в вариант PRO1902 для оптимизации растворимости и стабильности, очевидно, привели к нарушению способности ингибировать индуцированную IL-31 передачу сигналов.

Таблица 32: Исследование стабильности при хранении в течение 14 дней при температуре 4°C и 40°C в концентрации 10 мг/мл.

ID белка	ID клона (scFv)	Темп. [°C]	содержание мономера [%]			% изменения мономера		концентрация белка [мг/мл]			% изменения содержания белка	
			д0	д1	д14	д1	д14	д0	д1	д14	д1	д14
PRO1900	50-09-D07-sc04	4	99,8	Н.А.	99,8	Н.А.	0,0	9,8	Н.А.	10,0	Н.А.	2,6
		40	99,8	99,3	98,9	-0,5	-0,9	9,8	10,1	10,1	3,4	3,5
PRO1901	50-09-D07-sc05	4	97,0	Н.А.	97,0	Н.А.	-0,0	10,5	Н.А.	10,9	Н.А.	3,6
		40	97,0	96,9	96,3*	-0,1	-0,7*	10,5	10,1	10,9*	-3,7	4,0*
PRO1902	50-09-D07-sc06	4	98,5	Н.А.	98,4	Н.А.	0,0	9,3	Н.А.	9,4	Н.А.	0,9
		40	98,5	97,2	95,8	-1,3	-2,7	9,3	9,3	9,4	0,7	1,4
PRO1903	50-09-D07-sc07	4	98,7	Н.А.	98,7	Н.А.	-0,1	9,6	Н.А.	10,1	Н.А.	4,5
		40	98,7	98,2	97,7	-0,5	-1,1	9,6	9,8	9,9	1,2	2,3

*образец инкубировали в течение первых 7 дней при 25°C вместо 40°C

Н.А.: не анализировали

Таблица 34: Аффинность scFv к IL-31 человека и яванского макака. Sc03: полный трансплантат, sc04 - sc07: другие варианты трансплантации

ID белка	scFv	Аффинность к IL-31 человека			Аффинность к IL-31 яванского макака			
		ID клона	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (M)	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (M)
PRO1643	50-09-D07-sc03		5,79E+05	6,53E-04	1,13E-09	5,01E+05	5,87E-04	1,17E-09
PRO1900	50-09-D07-sc04		6,61E+05	5,99E-04	9,07E-10	5,54E+05	5,94E-04	1,07E-09
PRO1901	50-09-D07-sc05		5,91E+05	5,65E-04	9,56E-10	5,01E+05	5,69E-04	1,14E-09
PRO1902	50-09-D07-sc06		8,52E+05	2,46E-03	2,89E-09	7,31E+05	2,47E-03	3,38E-09
PRO1903	50-09-D07-sc07		5,24E+05	6,38E-04	1,22E-09	4,34E+05	6,05E-04	1,39E-09

Таблица 33: nDSF оптимизированных анти-IL-31-связывающих доменов (формат scFv).

ID белка	ID клона (scFv)	Чистота SE-HPLC [% мономера]	T _{m1} [°C]	T _{onset} [°C]
PRO1900	50-09-D07-sc04	99,8	70,7	60,5
PRO1901	50-09-D07-sc05	97,7	69,0	52,3
PRO1902	50-09-D07-sc06	98,3	73,8	62,5
PRO1903	50-09-D07-sc07	98,9	71,1	55,6

Таблица 35: Способность scFv нейтрализовать индуцированную IL-31R и IL-31 передачу сигналов в анализе димеризации IL-31RA/OSMR. Sc03: полный трансплантат, sc04 - sc07: другие варианты трансплантата

ID белка	scFv	Нейтрализация индуцированной hIL-31 передачи сигналов в анализе димеризации IL-31RA/OSMR		
		ID клона	IC ₅₀ [нг/мл]	rel. IC ₅₀ *
PRO1643	50-09-D07-sc03		8,078	0,85
PRO1900	50-09-D07-sc04		8,209	0,73
PRO1901	50-09-D07-sc05		8,071	0,78
PRO1902	50-09-D07-sc06		371,3	0,03
PRO1903	50-09-D07-sc07		7,982	1,49

*: IC₅₀, BMS-981164/IC₅₀, тестируемый образец

Пример 5: Биспецифические анти-IL-4RхIL-31-антитела на основе Morrison-HIgG1-Fc-молчащие

5.1. Дизайн Morrison-H

[0253] Формат Morrison (также формат IgG-(scFv)₂) представляет собой двухвалентный и биспецифический молекулярный формат на основе IgG, включающий Fc-область и два домена scFv, которые либо слиты через линкеры с C-концами тяжелых цепей, обычно называемые как формат Morrison-H (см. Фигуру 2A), или которые слиты через линкеры с C-концами легких цепей, обычно называемые форматом Morrison-L (см. Фигуру 2B).

[0254] В первой серии биспецифических анти-IL-4RхIL-31-антител был выбран формат Morrison-H, в котором Fc-область получена из IgG-подкласса IgG1, который был подавлен двойной мутацией Leu234Ala и Leu235Ala, также обычно называемой «мутацией LALA». Два высокостабильных λ-кэппированных scFv-доменов были слиты с C-концом тяжелой цепи.

[0255] Всего было сконструировано 19 биспецифических антител, имеющих вышеупомянутый формат Morrison-H, несущих анти-IL-4R-домены на Fab-плечах, за

исключением одной молекулы. Объединяли 13 различных анти-IL-4R-доменов, полученных из 5 клонов, и три анти-IL-31-домена, полученных из двух клонов. Девять из этих биспецифических антител Morrison-H проявляли хорошие фармакологические свойства. Эти антитела Morrison-H обобщены в Таблице 36.

Таблица 36: Обзор архитектуры молекулы Morrison-H

PRO ID	Домены Fab-фрагмента	Константная область	scFv-домены	Линкеры
PRO1929	44-34-C10-sc01	каппа/IgG1 (молчащий)	50-09-D07-sc03	(G ₄ S) ₄
PRO1930	44-18-C11-sc08	каппа/IgG1 (молчащий)	50-09-D07-sc03	(G ₄ S) ₄
PRO1982	44-18-C11-sc08	каппа/IgG1 (молчащий)	50-09-D07-sc03	(G ₄ S) ₂
PRO2077	44-18-C11-sc14	каппа/IgG1 (молчащий)	50-09-D07-sc04	(G ₄ S) ₂
PRO2078	44-18-C11-sc18	каппа/IgG1 (молчащий)	50-09-D07-sc04	(G ₄ S) ₂
PRO1973	44-39-B07-sc04	каппа/IgG1 (молчащий)	50-09-D07-sc04	(G ₄ S) ₂
PRO2079	44-39-B07-sc05	каппа/IgG1 (молчащий)	50-09-D07-sc04	(G ₄ S) ₂
PRO2080	44-39-B07-sc06	каппа/IgG1 (молчащий)	50-09-D07-sc04	(G ₄ S) ₂
PRO1977	44-03-A03-sc04	каппа/IgG1 (молчащий)	50-09-D07-sc04	(G ₄ S) ₂

5.2. Производство молекулы Morrison-H

[0256] Экспрессию полиспецифических конструкций проводили в клетках FreeStyle CHO-S с использованием транзиторной экспрессирующей системы CHOgro (Mirus). Представляющие интерес гены были оптимизированы для экспрессии у млекопитающих, синтезированы и клонированы в стандартный вектор pcDNA3.1. Экспрессирующие культуры культивировали партиями во встряхиваемых колбах в течение 6-7 дней (жизнеспособность клеток <70%) при 37°C. Температуру экспрессии снижали до 32°C через 1 день экспрессии всех молекул, перечисленных в Таблице 37, за исключением PRO1982, PRO2078 и PRO2080, которые поддерживали при 37°C в течение всего периода экспрессии. Супернатанты культуры отделяли от клеток центрифугированием с последующей стерильной фильтрацией 0,22 мкм. Целевые белки были захвачены из осветленных культуральных супернатантов с помощью аффинной хроматографии с Протеином L или A с последующей стадией полировки эксклюзионной хроматографией (в случае, если после захвата уже не было фракций с подходящим содержанием мономера согласно оценке с помощью SE-HPLC). Для контроля качества изготовленного материала использовали стандартные аналитические методы, такие как SE-HPLC, SDS-PAGE и UV280.

[0257] В Таблице 37 представлен обзор производства этих молекул. Все молекулы были доведены до содержания мономеров > 98% после этапа полировки SEC.

Таблица 37: Обзор продукции молекул Morrison-H

ID белка	Формат	Домен Fab-фрагмента	scFv-домен	Титр экспрессии после захвата [мг/л]	Конечный Титр [мг/л]	Чистота SE-HPLC [% мономера]
PRO1929	Morrison-H	44-34-C10-sc01	50-09-D07-sc03	33,2	19,4	99,2
PRO1930	Morrison-H	44-18-C11-sc08	50-09-D07-sc03	16,9	7,4	98,4
PRO1982	Morrison-H	44-18-C11-sc08	50-09-D07-sc03	22,9	14,2	98,2
PRO2077	Morrison-H	44-18-C11-sc14	50-09-D07-sc04	19,1	11,6	99,4
PRO2078	Morrison-H	44-18-C11-sc18	50-09-D07-sc04	18,6	9,7	98,9
PRO1973	Morrison-H	44-39-B07-sc04	50-09-D07-sc04	37,2	18*	98,1
PRO2079	Morrison-H	44-39-B07-sc05	50-09-D07-sc04	43,1	19,6	99,4
PRO2080	Morrison-H	44-39-B07-sc06	50-09-D07-sc04	34,4	16,3	99,2
PRO1977	Morrison-H	44-03-A03-sc04	50-09-D07-sc04	21,8	11,8*	98,5

расчетное/экстраполированное значение, так как не весь материал использовался для полировки

5.3. Биофизическая и фармакологическая характеристика

[0258] Девять полиспецифических молекул, то есть PRO1929, PRO1930, PRO1982 и их улучшенные варианты PRO2077 и PRO2078; PRO1973 и его улучшенные варианты PRO2079 и PRO2080 и PRO1977 были отобраны для дополнительной характеристики.

[0259] Девять молекул были подвергнуты расширенной биофизической характеристике, чтобы определить их пригодность для разработки процесса и состава. Эти молекулы были охарактеризованы рядом методов для оценки температуры плавления и агрегации, растворимости при концентрациях более 150 г/л, потери содержания мономера через 2 недели при 4°C и 25°C, увеличения гидродинамического радиуса и вариантов заряда и фрагментации белков. Растворимость также оценивали с помощью ПЭГ-скрининга. Для PRO1929 определяли потерю содержания мономера и увеличение гидродинамического радиуса.

[0260] Исходя из этих результатов, PRO2077, PRO2080, PRO1977, PRO1929 являются лучшими конструкциями. Они содержат анти-IL-4R-домены 44-18-C11-sc14, 44-39-09-sc06, 44-03-A04-sc03 и 44-34-C10-sc01, соответственно, и анти-IL-31-домен 50-09-D07-sc04. Предполагаемая целевая концентрация 150 г/л была достигнута для всех молекул. С точки зрения мономерной стабильности при хранении при 4°C и 25°C PRO1929 и PRO2080 имели лучший профиль. Что касается химической стабильности и развития

процесса, PRO2077 и PRO2080 показали хорошую стабильность рН и сложность варианта с низким зарядом.

[0261] С фармакологической точки зрения PRO2077 демонстрирует в 2 раза более высокую эффективность блокирования индуцированной IL-4 и IL-13 передачи сигналов по сравнению с дупилумабом. Анти-IL-4R-домен в этой молекуле не проявляет перекрестной реактивности с IL-4R яванского макака. PRO2080, PRO1977 и PRO1929 блокируют передачу сигналов IL-4R приблизительно в 2-3 раза слабее, чем дупилумаб. PRO2080 и PRO1977, по-видимому, проявляют перекрестную реактивность с IL4R яванского макака на основании авидности связывания. Вариант PRO1929 может работать как суррогат. PRO1929 проявляет сильную перекрестную реактивность с IL-4R яванского макака и аналогичную эффективность ингибирования передачи сигналов IL-4R по сравнению с PRO2080 и PRO1977. Все молекулы сильно блокируют индуцированную IL-31 передачу сигналов и перекрестно реактивны с IL-31 яванского макака. Кроме того, все молекулы проявляют пикомолярные аффинности к обеим человеческим мишеням.

Пример 6: Биспецифические анти-IL-4RxIL-31-антитела на основе Morrison-H и Morrison-L IgG4

6.1. Дизайн формата Morrison

[0262] Во второй серии биспецифических анти-IL-4RxIL-31-антител были выбраны форматы Morrison-H и Morrison-L, в которых Fc-область получена из IgG4 подкласса IgG. Два высокостабильных λ -кэппированных scFv-домена были слиты с C-концами тяжелой цепи (Morrison-H) или легкой цепи (Morrison-L).

[0263] На основе перекрестной реактивности с яванскими макаками, превосходной эффективности и превосходных биофизических свойствах, конструкция, включающим домены IL-4R и IL-31 семейства PRO1929, был отдан приоритет.

[0264] Два варианта IL-4R-связывающего агента семейства PRO1929 были включены в переформатирование молекул, упомянутых выше, это были 44-34-C10-sc08 и 44-34-C10-sc09. Один и тот же IL-31-связывающий домен был включен во все конструкции, и это был 50-09-D07-sc04.

[0265] Всего было сконструировано семь молекул IgG4-(scFv)₂, четыре молекулы Morrison-H и три молекулы Morrison-L. Два разных анти-IL-4R-домена, полученных из одного клона, и один анти-IL-31-домен объединяли, как показано в Таблице 38 (Morrison-H) и Таблице 39 (Morrison-L).

Таблица 38: Конструкции IgG4 Morrison-H

PRO ID	Домен Fab-фрагмента	Константная область	scFv-домен
PRO2198	44-34-C10-sc08	IgG4 (S228P)	50-09-D07-sc04
PRO2199	44-34-C10-sc09	IgG4 (S228P)	50-09-D07-sc04
PRO2200	50-09-D07-sc04	IgG4 (S228P)	44-34-C10-sc08
PRO2201	50-09-D07-sc04	IgG4 (S228P)	44-34-C10-sc09

Таблица 39: Конструкции IgG4 Morrison-L

PRO ID	Домен Fab-фрагмента	Константная область	scFv-домен
PRO2206	44-34-C10-sc08	IgG4 (S228P)	50-09-D07_sc04
PRO2207	44-34-C10-sc09	IgG4 (S228P)	50-09-D07_sc04
PRO2208	44-34-C10-sc09	IgG4 (S228P)	50-09-D07_sc04

6.2. Оценка аффинности и специфичности связывания с помощью SPR

Аффинность к IL-4R человека и яванского макака

[0266] Кинетику связывания (включая аффинность) биспецифических молекул Morrison-H (PRO2198, PRO2199) и Morrison-L (PRO2206, PRO2207) с рекомбинантным белком IL-4R человека (ECD с His-меткой, Sino Biological) определяли с помощью SPR-анализа на устройстве T200. (Biacore, Cytiva). В этом эксперименте SPR молекулы Morrison были захвачены с помощью антитела против человеческого IgG-Fc (набор для захвата человеческих антител; Biacore, Cytiva), ковалентно иммобилизованного на поверхности карбоксиметилированного декстрана (сенсорный чип CM5; Biacore, Cytiva) и серии титрования человеческого IL4R ECD вводили в качестве аналита. После каждого цикла введения анализируемого вещества сенсорный чип регенерировали ($MgCl_2$), а затем повторно захватывали новое антитело Morrison. Кинетику связывания с IL-4R человека измеряли с использованием многоциклового кинетического анализа с концентрацией девяти аналитов в диапазоне от 0,175 до 45 нМ, разведенных в рабочем буфере (солевой буфер HEPES, 0,05% Tween-20, pH 7,5). Кажущиеся константы скорости диссоциации (k_d) и ассоциации (k_a) и кажущуюся константу равновесия диссоциации (KD) рассчитывали с помощью программного обеспечения для анализа Biacore (программное обеспечение для оценки Biacore, версия 3.2, Cytiva) с использованием модели связывания Ленгмюра один к одному и качество аппроксимации контролировали на основе Chi2 и U-значения, которые являются мерами качества аппроксимации кривой. Уровень связывания рассчитывали как достигнутую максимальную стабильность связывания, нормализованную к теоретическому R_{max} . Перекрестную реактивность с IL-4R яванского макака измеряли с использованием тех же условий, что и для анализа кинетики IL-4R человека, с той разницей, что в качестве аналита использовали рекомбинантный белок IL-4R яванского макака (ECD с His-меткой, Acro Biosystems) вместо IL-4R человека.

[0267] Как показано в Таблице 40, высокоаффинное связывание с IL-4R человека было продемонстрировано для антител Morrison-H и Morrison-L. Рассчитанные значения KD очень близки в пределах от 291 пМ до 48 пМ, где антитело Morrison-H PRO2198 имеет аффинность 291 ± 136 пМ в отношении связывания с IL-4R человека. Кинетическая аффинность к IL-4R яванского макака также одинакова среди протестированных молекул ($209-11$ пМ), при аффинности 144 ± 49 пМ, измеренной для антитела PRO2198 Morrison-H, что демонстрирует перекрестную реактивность всех молекул с IL-4R с происхождением из яванского макака.

Аффинность к IL-31 человека и яванского макака

[0268] Кинетику связывания (включая аффинность) биспецифических молекул

Morrison-H (PRO2198, PRO2199) и Morrison-L (PRO2206, PRO2207) с рекомбинантным белком IL-31 человека (Peprotech) определяли с помощью SPR-анализа на устройстве T200 (Biacore, Cytiva). В этом эксперименте SPR антитела Morrison инъецировали на поверхность карбоксиметилированного декстрана (сенсорный чип CM5; Biacore, Cytiva), на которую иммобилизовали человеческий рекомбинантный белок IL-4R (ECD с Fc-меткой, R&D Systems), и инъецировали в качестве аналита серию титрования IL-31 человека. Аффинность к IL-31 человека измеряли с использованием кинетического анализа с одним циклом с инъекцией пяти последовательных концентраций аналита в диапазоне от 0,05 до 30 нМ, разведенных в рабочем буфере (солевой буфер HEPES, 0,05% Tween-20, pH 7,5), без регенерации поверхности сенсорного чипа после инъекции аналита. Расчет кинетики и кажущейся константы равновесия диссоциации (KD), а также измерение качества аппроксимации кривой проводили, как описано выше для IL-4R. Уровень связывания рассчитывали как достигнутую максимальную стабильность связывания, нормализованную к теоретическому Rmax. Перекрестную реактивность к IL-31 яванского макака измеряли с использованием тех же условий, что и для анализа аффинности к IL-31 человека, с той разницей, что в качестве аналита использовали рекомбинантный белок IL-31 яванского макака (ECD с His-меткой, Sino Biological) вместо IL-31 человека.

[0269] Необходимым условием условий SPR, используемых для измерения кинетики связывания с рекомбинантным IL-31, является захват антител Morrison-H и Morrison-L через иммобилизованный IL-4R человека. Все ранее испытанные антитела Morrison продемонстрировали стабильное связывание с иммобилизованным IL-4R человека, и, таким образом, конфигурация была подтверждена. Обоснование использования этой конфигурации SPR состоит в том, чтобы гарантировать однородную ориентацию захваченных молекул Morrison при минимизации стерических затруднений для IL-31-связывающего сайта.

[0270] После демонстрации стабильного захвата антител Morrison с помощью рекомбинантного человеческого белка IL-4R в качестве аналита инъецировали IL-31 и рассчитывали кинетику связывания IL-31 с захваченными молекулами Morrison. Как показано в Таблице 41, все протестированные молекулы Morrison-H и Morrison-L связываются с IL-31 человека и IL-31 яванского макака с одинаковой аффинностью (от 152 до 52 пМ и от 169 до 103 пМ, соответственно). Антитело PRO2198 Morrison-H продемонстрировало связывание с IL-31 человека с расчетной KD 52 ± 18 пМ и связывание с рекомбинантным белком IL-31 яванского макака с аффинностью связывания 10 ± 1 пМ, что подтверждает хорошую перекрестную реактивность.

Одновременное связывание с IL-4R и IL-31 человека и с IL-4R и IL-31 яванского макака

[0271] Одновременное связывание антител Morrison-H и Morrison-L оценивали с помощью анализа SPR на устройстве T200 (Biacore, Cytiva). Как описано выше, связывание антител Morrison с IL-31 (как человека, так и яванского макака) лучше всего измеряется, когда антитело Morrison захватывается поверхностью сенсорного чипа посредством

взаимодействия с IL-4R благодаря гомогенной молекулярной ориентации антитела, а также минимальным стерическим затруднениям IL-31-связывающих сайтов. Таким образом, одновременное связывание тестируемых препаратов Morrison как с IL-4R человека, так и с IL-31 человека оценивали путем инъекции антител Morrison на поверхность карбоксиметилированного декстрана (сенсорный чип CM5; Biacore, Cytiva), на которой был иммобилизован рекомбинантный белок IL-4R человека (Fc Tag, R&D Systems), с последующим введением одной высокой концентрации (45 нМ) IL-31 человека в качестве аналита. Одновременное связывание PRO2199, PRO2206 и PRO2207 оценивали во время кинетического измерения IL-31 человека, как сообщалось выше, с использованием уровней связывания после инъекции IL-31 человека в концентрации 45 нМ. Одновременное связывание PRO2198 как с IL-4R яванского макака, так и с IL-31 яванского макака измеряли аналогично IL-4R человека и IL31 человека, за исключением использования рекомбинантного IL-4R яванского макака (ECD с His-меткой, Acro Biosystems), иммобилизованного на поверхность сенсорного чипа и рекомбинантного белка IL-31 яванского макака (ECD с His-меткой, Sino Biological) в качестве аналита.

[0272] Одновременное связывание с IL-4R человека и IL-31 человека было продемонстрировано с помощью SPR для всех протестированных антител Morrison, т. е. PRO2198, PRO2199, PRO2206 и PRO2207, как показано в качестве примера для PRO2198 на Фигуре 5. Для PRO2198 также было продемонстрировано одновременное связывание с IL-4R яванского макака и IL-31 яванского макака (см. Фигуру 5).

Таблица 40: Кинетика связывания антител Morrison с IL-4R человека и IL-4R яванского макака

ID белка	Fab-фрагмент	scFv-домен	Аффинность по измерениям SPR			
			Антиген	k_a ($M^{-1} c^{-1}$)	k_d (c^{-1})	K_D (M)
PRO2198	44-34-C10-sc08	50-09-D07-sc04	IL-4R человека	3,52E+05	1,01E-04	2,91E-10
PRO2199	44-34-C10-sc09	50-09-D07-sc04	IL-4R человека	2,93E+05	5,76E-05	1,97E-10
PRO2206	44-34-C10-sc08	50-09-D07-sc04	IL-4R человека	4,09E+05	1,95E-05	4,77E-11
PRO2207	44-34-C10-sc09	50-09-D07-sc04	IL-4R человека	2,44E+05	4,61E-05	1,89E-10
PRO2198	44-34-C10-sc08	50-09-D07-sc04	IL-4R яванского макака	3,70E+05	4,90E-05	1,44E-10
PRO2199	44-34-C10-sc09	50-09-D07-sc04	IL-4R яванского макака	9,80E+05	3,44E-05	3,51E-11
PRO2206	44-34-C10-sc08	50-09-D07-sc04	IL-4R яванского макака	1,16E+05	2,42E-05	2,09E-10
PRO2207	44-34-C10-sc09	50-09-D07-sc04	IL-4R яванского макака	2,53E+06	2,77E-05	1,10E-11

Таблица 41: Кинетика связывания антител Morrison с IL-31 человека и IL-31 яванского макака

ID белка	Fab-фрагмент	scFv-домен	Аффинность по измерениям SPR			
	ID клона		ID клона	Антиген	k_a ($M^{-1} c^{-1}$)	k_d (c^{-1})
PRO2-198	44-34-C10-sc08	50-09-D07-sc04	IL-31 человека	2,75E+05	1,60E-05	5,20E-11
PRO2-199	44-34-C10-sc09	50-09-D07-sc04	IL-31 человека	2,51E+05	1,75E-05	6,97E-11
PRO2-206	44-34-C10-sc08	50-09-D07-sc04	IL-31 человека	2,20E+05	2,36E-05	1,07E-10
PRO2-207	44-34-C10-sc09	50-09-D07-sc04	IL-31 человека	1,63E+05	2,47E-05	1,52E-10
PRO2-198	44-34-C10-sc08	50-09-D07-sc04	IL-31 яванского макака	9,92E+04	1,00E-05	1,03E-10
PRO2-199	44-34-C10-sc09	50-09-D07-sc04	IL-31 яванского макака	8,10E+04	1,00E-05	1,23E-10
PRO2-206	44-34-C10-sc08	50-09-D07-sc04	IL-31 яванского макака	5,93E+04	1,00E-05	1,69E-10
PRO2-207	44-34-C10-sc09	50-09-D07-sc04	IL-31 яванского макака	6,09E+04	1,00E-05	1,64E-10

6.3. Связывание с клетками, экспрессирующими IL-4R человека или яванского макака (FACS)

[0273] Для проверки связывания антител Morrison-H и Morrison-L PRO2198, PRO2199, PRO2206 и PRO2207 с клетками HEK293T, экспрессирующими IL-4R человека или яванского макака, клетки HEK293T трансфецировали плазмидами с IL-4R человека и яванского макака и пустой плазмидой с использованием липофектамина 3000. Связывание антитела, нацеленного на метку V5, которая слита с N-концом экспрессирующей конструкции IL-4R человека и яванского макака, подтверждало бы успешную экспрессию обеих мишеней и, таким образом, использовалось в качестве положительного контроля для связывания с плазматической мембраной. Молекулу MorrisonH PRO2077 использовали в качестве отрицательного контроля связывания IL-4R яванского макака, поскольку эта молекула не проявляла перекрестной реактивности с IL-4R яванского макака (см. раздел 5.3).

[0274] 50000 трансфецированных клеток HEK293T на лунку высевали в 96-луночный планшет. Добавляли 5-кратные серийные разведения антител Morrison-H и Morrison-L PRO2198, PRO2199, PRO2206 и PRO2207 и контрольной молекулы PRO2077, не обладающей перекрестной реактивностью с IL4R яванского макака, в концентрациях от 5000 до 0,32 нг/мл в планшеты и инкубировали 60 мин при 4°C на шейкере. Супернатанты удаляли и добавляли реагент для детектирования для анализа проточной цитометрией. Рассчитывали среднее геометрическое интенсивности флуоресценции APC одиночных клеток.

[0275] Все данные об эффективности приведены в Таблице 42. Средние

относительные значения IC₅₀ из повторного анализа указаны в пМ. Антитела Morrison-H и Morrison-L PRO2198, PRO2199, PRO2206 и PRO2207 эффективно связывались с IL-4R человека и яванского макака на трансфицированных клетках HEK293T (см. Фигуру 6).

6.4. Оценка эффективности ингибирования передачи сигналов IL-4 и IL-13 человека (анализ репортерного гена HEK-Blue™ IL4/IL-13 Cells stat-6)

[0276] Анализ HEK-Blue использовали для проверки способности антител Morrison-H и Morrison-L PRO2198, PRO2199, PRO2206 и PRO2207 ингибировать индуцированную IL-4 и IL-13 передачу сигналов через IL-4R. 50000 клеток на лунку высевали в 96-луночный планшет. В планшеты добавляли трехкратные серийные разведения молекул Morrison и эталонного антитела дупилумаба в диапазоне концентраций от 100 до 0,002 нг/мл в присутствии либо 0,05 нг/мл IL-4, либо 0,3 нг/мл IL-13. После 24-часовой инкубации при 37°C и 5% CO₂ супернатанты переносили на новый планшет и определяли количество секретируемой эмбриональной щелочной фосфатазы с использованием субстрата Quanti-Blue. Антитела Morrison-H и Morrison-L PRO2198, PRO2199, PRO2206 и PRO2207 также тестировали на ингибирование индуцированной IL-4 передачи сигналов с избытком IL-31 (10 нМ) в среде для анализа.

[0277] Все данные об активности приведены в Таблице 43 (ингибирование IL-4/IL-4R) и Таблице 44 (ингибирование IL-4/IL-4R). Средние относительные значения IC₅₀ из повторных анализов также указаны в пМ. Антитела Morrison-H и Morrison-L PRO2198, PRO2199, PRO2206 и PRO2207 эффективно блокировали взаимодействие между IL-4 или IL-13 и IL-4R с эффективностью, сравнимой с дупилумабом (см. Фигуру 7). Эффективная блокировка IL-4R поддерживалась, когда IL-31 был связан с анти-IL-31-доменами молекул Morrison-H (см. Фигуру 8).

6.5. Оценка эффективности ингибирования димеризации рецептора, индуцированной IL-31 человека (анализ PathHunter® eXpress IL31RA/OSMRb)

Анализ димеризации PathHunter IL-31RA/OSMRb

[0278] В анализе димеризации IL-31RA/OSMR оценивали способность антител Morrison-H и Morrison-L PRO2198, PRO2199, PRO2206 и PRO2207 ингибировать индуцированную IL-31 передачу сигналов через гетеродимер IL-31RA/OSMR. 10000 клеток на лунку высевали в 96-луночный планшет. На следующий день в планшеты добавляли 3-кратные серийные разведения молекул и контрольного антитела BMS-981164 в диапазоне концентраций от 1000 до 0,2 нг/мл в присутствии 10 нг/мл IL-31. После 6-часовой инкубации при 37°C и 5% CO₂ добавляли раствор для детектирования, планшеты инкубировали еще в течение часа и измеряли люминесценцию. Все антитела также тестировали на ингибирование индуцированной IL-31 передачи сигналов с избытком IL-4R (при 50 нМ) в среде для анализа.

Ингибирование IL-31 человека

[0279] В Таблице 45 показано суммирование всех данных об активности. Средние относительные значения IC₅₀ из повторного анализа указаны в пМ. Все антитела Morrison-H и Morrison-L ингибировали индуцированную IL-31 передачу сигналов с аналогичной

эффективностью по сравнению с BMS-981164. Эффективное блокирование взаимодействия IL-31 с IL-31R сохранялось, когда анти-IL-4R-домены были связаны с IL-4R (см. Фигуру 9).

Ингибирование IL-31 яванского макака

[0280] Для оценки ингибирования передачи сигналов, индуцированной IL-31 яванского макака, использовали анализ димеризации IL31RA/OSMR, как описано выше, с той разницей, что вместо 10 нг/мл IL-31 человека использовали 10 нг/мл IL-31 яванского макака, и только антитела Morrison-H PRO2198 и PRO2199 тестировали на ингибирование. И PRO2198, и PRO2199 эффективно блокировали взаимодействие между IL-31 яванского макака и IL-31RA человека (см. Фигуру 10).

6.6. Оценка эффективности одновременного ингибирования передачи сигналов IL-4 и IL-31 человека (анализ BEAS-2B; CCL2)

[0281] Для оценки эффективности антител Morrison-H PRO2198 и PRO2199 в отношении одновременного ингибирования передачи сигналов, индуцированных IL-4 и IL-31, был проведен клеточный анализ с использованием клеток BEAS-2B (эпителиальных клеток бронхов человека) с использованием сэндвич-ИФА для считывания. В этом анализе блокировка обоих сигнальных путей приводит к снижению секреции CCL2 клетками BEAS-2B.

[0282] 25000 клеток на лунку высевали в 96-луночный планшет в 100 мкл питательной среды и инкубировали в течение ночи при 37°C с 5% CO₂. На следующий день клетки промывали и добавляли 1 нг/мл IL-4 и 10 нг/мл IL-31 с серийными разведениями комбинации дупилумаба и BMS-981164 или антител Morrison-H PRO2198 или PRO2199. Затем клетки инкубировали в течение 24 ч, собирали супернатанты и измеряли концентрацию секретируемого CCL-2 с помощью сэндвич-ИФА, адаптированного из коммерческого набора.

[0283] Анализ BEAS-2B является единственным доступным анализом, который позволяет оценить комбинированное ингибирование IL-4 и IL-31. И PRO2198, и PRO2199 были способны одновременно блокировать передачу сигналов IL-4 и IL-31 с аналогичной эффективностью по сравнению с комбинацией дупилумаба и BMS-981164. Они достигли уровня ингибирования, сравнимого с комбинацией эталонных молекул (см. Фигуру 1).

6.7. Оценка эффективности ингибирования индуцированной IL-4 человека положительной регуляции CD23 на субпопуляциях PBMC человека

[0284] PBMC человека использовали для оценки индуцированной IL-4 положительной регуляции CD23 в моноцитах и наивных В-клетках и В-клетках памяти. PBMC человека выделяли из свежей цельной крови в соответствии с адаптированным протоколом Leucoser, используя пробирки Leucoser со встроенным пористым барьером и центрифугированием в градиенте плотности.

[0285] 400000 PBMC на лунку высевали в 96-луночный планшет в 100 мл среды для анализа. Д планшеты добавляли трехкратные серийные разведения антител Morrison-H PRO2198 и PRO2199, эталонных антител IgG4 против IL-4R PRO2209 и PRO2210, к которым не присоединены анти-IL-31-домены scFv, и эталонного антитела дупилумаба в

диапазоне концентраций от 10000 до 0,169 нг/мл в присутствии 2 нг/мл ИЛ-4. После 48 ч инкубации при 37°C и 5% CO₂ РВМС окрашивали для анализа методом проточной цитометрии с использованием мышиных антител против человеческого CD19-PE, мышиных антител против человеческого CD14-PerCP/Cy5.5, мышиных антител против человеческого CD14-PerCP/Cy5.5 и мышиных антител против человеческого CD23-APC с красителями. После анализа FACS для расчетов использовали среднее геометрическое для гейтированных по CD23 моноцитов, наивных В-клеток и В-клеток памяти. Аппроксимацию четырехпараметрической логистической кривой (4PL) применяли для расчета значений IC₅₀ кривой ингибирования с использованием программного обеспечения GraphPad Prism.

[0286] Данные анализа РВМС суммированы в Таблице 46. Значения IC₅₀, полученные для разных доноров крови, представлены в пикомолярных единицах. Антитела Morrison-H PRO2198 и PRO2199, а также эталонные антитела IgG4 PRO2209 и PRO2210 продемонстрировали аналогичную активность по сравнению с дупилумабом в отношении ингибирования индуцированной ИЛ-4 положительной регуляции CD23 в моноцитах и наивных В-клетках и В-клетках памяти. Молекулы в формате в виде молекул IgG4 без прикрепленных анти-ИЛ-31-доменов блокировали индуцированную ИЛ-4 передачу сигналов с такой же эффективностью по сравнению с дупилумабом (см. Фигуру 11). Таким образом, добавление анти-ИЛ-31-доменов мало влияет на эффективность ингибирования ИЛ-4.

6.8. Оценка эффективности ингибирования продукции TARC, индуцированной ИЛ-4 человека, в цельной крови человека

[0287] Для определения эффективности ингибирования индуцированной ИЛ-4 секреции хемокина, регулируемого тимусом и активацией (TARC, также CCL17), использовали анализ цельной крови на основе коммерческого ИФА в качестве считывания. Блокирование обоих сигнальных путей приводит к снижению уровня TARC в цельной крови.

[0288] Для анализа использовали цельную периферическую кровь человека, собранную в стерильные пробирки, содержащие антикоагулянт ЭДТА. 160 мкл на лунку серийных разведений дупилумаба, PRO2198 или PRO2199 в диапазоне от 64800 до 1,10 пМ добавляли в 96-луночный планшет с круглодонными лунками либо с 1 нг/мл ИЛ-4, либо с 1 нг/мл ИЛ-13. После добавления 40 мкл цельной крови на лунку планшеты инкубировали в течение 24 ч при 37°C с 5% CO₂. На следующий день планшеты центрифугировали 10 мин при 1000 g, собирали супернатанты и замораживали при -20°C. Затем супернатанты анализировали с использованием набора ИФА DuoSet TARC/CCL17 для человека от R&D systems и определяли уровни TARC.

[0289] Анализ TARC проводили с кровью трех разных доноров на предмет индуцированной ИЛ-4 секреции TARC. PRO2198 и PRO2199 нейтрализовали ИЛ-4-индуцированный TARC в цельной крови человека с эффективностью, сравнимой с дупилумабом, т. е. со значениями IC₅₀ менее 500 пМ.

Пример 7: Биофизическая характеристика

[0290] Антитела Morrison-H и Morrison-L PRO2198, PRO2199, PRO2206 и PRO2207

подвергали нескольким процедурам биофизической характеристики. Были исследованы следующие биофизические свойства:

1. Подтверждение идентичности
2. Исследование стресса с несколькими рН
 - a. Химическая стабильность и неоднородность заряда
 - b. Термостабильность
3. Исследование возможности высококонцентрированных составов (HCF)

7.1. Подтверждение идентичности:

Определение массы

[0291] Массы анализировали с помощью анализа интактной массы с использованием ESI-MS. Все протестированные антитела Morrison-H и Morrison-L, то есть PRO2198, PRO2199, PRO2206 и PRO2207, показали ожидаемые массы легкой цепи и тяжелой цепи. Кроме того, тяжелая цепь демонстрирует ожидаемое гликозилирование. Определенная масса для каждого антитела Morrison показана в Таблице 47.

Таблица 42: Связывание плазматической мембраны с IL-4R человека и яванского макака на трансфицированных НЕК293Т-клетках.

PRO ID	Домен Fab-фрагмента	Константная область	scFv-домен	IL-4R человека		IL-4R яванского макака	
				EC ₅₀	отн. IC ₅₀	EC ₅₀	Отн. IC ₅₀
				[нМ]	отн. EC ₅₀ (EC ₅₀ V5 антитела/EC ₅₀ образца)	[нМ]	отн. EC ₅₀ (EC ₅₀ V5 антитела/EC ₅₀ образца)
PRO2198	44-34-C10-sc08	IgG4(S228P)	50-09-D07-sc04	1,11	3,31	0,97	21,56
PRO2199	44-34-C10-sc09	IgG4(S228P)	50-09-D07-sc04	0,85	4,33	1,78	11,73
PRO2206	44-34-C10-sc08	IgG4(S228P)	50-09-D07-sc04	0,83	4,46	0,90	23,18
PRO2207	44-34-C10-sc09	IgG4(S228P)	50-09-D07-sc04	0,60	6,15	0,65	32,22
PRO2077	44-18-C11-sc14	каппа/IgG1 (молчащий)	50-09-D07-sc04	0,60	6,18	Нет связывания	Нет связывания

Таблица 43. Эффективность антител Morrison-H и Morrison-L в отношении нейтрализации индуцированной IL-4 человека передачи сигналов в анализе репортерного гена stat-6 без и с IL-31 в среде для анализа. N= количество повторных анализов.

PRO ID	Домен Fab-фрагмента	scFv-домен	Среднее значение IC ₅₀	Среднее значение отн. IC ₅₀	Сохранение IC ₅₀ с избытком IL-31 и без него (n=1)
			[пМ]	[IC ₅₀ дупилумаб/ IC ₅₀ sample]	Значения [IC ₅₀ , без IL-31/IC ₅₀ , с IL-31] нг/мл
PRO2198	44-34-C10-sc08	50-09-D07-sc04	23,9**	0,42	0,71
PRO2199	44-34-C10-sc09	50-09-D07-sc04	11,5**	0,72	1,25
PRO2206*	44-34-C10-sc08	50-09-D07-sc04	11,8	0,45	Не измеряли
PRO2207*	44-34-C10-sc09	50-09-D07-sc04	9,4	0,52	Не измеряли

IC₅₀ или относительная IC₅₀ (один анализ)/Н.А.: неприменимо

** Среднее значение

Таблица 44. Способность молекул Morrison-H и Morrison-L нейтрализовать индуцированную IL-13 человека передачу сигналов в анализе репортерного гена stat-6. N= количество повторных анализов.

PRO ID	Домен Fab-фрагмента	scFv-домен	Среднее IC ₅₀	Среднее отн. IC ₅₀
			[пМ]	[IC ₅₀ дупилумаба/ IC ₅₀ образца]
PRO2198	44-34-C10-sc08	50-09-D07-sc04	22,1**	0,42
PRO2199*	44-34-C10-sc09	50-09-D07-sc04	11,3	0,69
PRO2206*	44-34-C10-sc08	50-09-D07-sc04	29,5	0,26
PRO2207*	44-34-C10-sc09	50-09-D07-sc04	12,6	0,62

IC₅₀ или относительная IC₅₀ (один анализ)/Н.А.: неприменимо

** Среднее значение.

Таблица 45. Способность молекул Morrison-H и Morrison-L нейтрализовать индуцированную IL-31 человека передачу сигналов в анализе димеризации IL-31RA/OSMR без IL-4R и с IL-4R в среде. N= количество повторных анализов.

PRO ID	Домен Fab-фрагмента	scFv-домен	Среднее IC ₅₀	Среднее отн. IC ₅₀	Сохранение IC ₅₀ с избытком IL-4R и без него (n=1)
			[пМ]	[IC ₅₀ BMS-981164/ IC ₅₀ образца]	Значения [IC ₅₀ , без IL-4R/IC ₅₀ , с IL-4R] нг/мл
PRO2198	44-34-C10-sc08	50-09-D07-sc04	198	0,70	1,02
PRO2199	44-34-C10-sc09	50-09-D07-sc04	142	0,61	0,90
PRO2206*	44-34-C10-sc08	50-09-D07-sc04	230	0,65	Не измеряли
PRO2207*	44-34-C10-sc09	50-09-D07-sc04	215	0,55	Не измеряли

*IC₅₀ или относительная IC₅₀ (один анализ)/Н.А.: неприменимо

Таблица 46: Способность антител Morrison нейтрализовать индуцированную IL-4 экспрессию CD23 на PBMC человека

PRO ID	Домен Fab-фрагмента	Константная область	scFv-домен	Донор крови	моноциты		наивные В-клетки		В-клетки памяти	
					IC ₅₀ [пМ]	[IC ₅₀ дупилумаба/ IC ₅₀ образца]	IC ₅₀ [пМ]	[IC ₅₀ дупилумаб/ IC ₅₀ sample]	IC ₅₀ [пМ]	[IC ₅₀ Дупилумаб / IC ₅₀ sample]
PRO21-98	44-34-C10-sc08	IgG4(S228P)	50-09-D07-sc04	1	90,37	0,11	1366	0,31	4470	0,14
PRO21-99	44-34-C10-sc09	IgG4(S228P)	50-09-D07-sc04	1	69,74	0,15	1099	0,38	2531	0,25
PRO22-06	44-34-C10-sc08	IgG4(S228P)	50-09-D07-sc04	2	110,5	0,12	1480	0,45	4339	0,13
PRO22-07	44-34-C10-sc09	IgG4(S228P)	50-09-D07-sc04	3	*54,47	0,02	1036	0,12	1580	0,20

*приблизительные значения, верхнее ограничение применяется при аппроксимации кривых

Таблица 47: Массы легкой и тяжелой цепей каждого антитела Morrison, найденные в восстанавливающих условиях

Массы в [Да]	PRO2198	PRO2199	PRO2206	PRO2207
Рассчитанная масса легкой цепи (LC)	23582	23458	51028	50904
Детектированная масса	23580	23453	51019	50895
Рассчитанная масса тяжелой цепи (HC)	77368,8	77169	49923	49743
Детектированная масса Основные образцы	78798 (+1429)	78618 (+1429)	51358 (+1435)	51179 (+1436)
Комментарии	HC: Не полностью восстановлена и гликозилирована	LC: не полностью восстановлена HC: Не полностью восстановлена и гликозилирована	LC: не полностью восстановлена HC: Не полностью восстановлена и гликозилирована	LC: не полностью восстановлена HC: Не полностью восстановлена и гликозилирована

Модель гликозилирования

[0292] PRO2198 и PRO2199 были проанализированы более подробно на предмет их гликозилирования. Обе молекулы демонстрируют сходное гликозилирование. Приблизительное относительное гликозилирование соответствующей тяжелой цепи показано в Таблице 48. Обе молекулы гликозилированы преимущественно сахаром G0F. Также обнаруживаются более низкие количества G1F и G2F. Негликозилированной массы тяжелой цепи не наблюдалось.

Таблица 48: Тип и относительная распространенность гликозилирования тяжелых цепей

Гликозилирование	PRO2198	PRO2199
G0F (+1445 Да)	65%	65%
G1F (+1608 Да)	30%	30%
G2F (+1770 Да)	5%	5%

SDS page

[0293] Идентичность антител Morrison-H и Morrison-L PRO2198, PRO2199, PRO2206 и PRO2207 дополнительно анализировали с помощью SDS-PAGE в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях (см. Фигуру 12).

[0294] Для молекул Morrison-H ожидаемые полосы наблюдали как в восстанавливающих, так и в не восстанавливающих условиях. Некоторый димер HC наблюдается в восстанавливающих условиях, предположительно из-за неполного восстановления межцепочечного дисульфида.

[0295] В случае молекул Morrison-L все ожидаемые полосы видны как в восстанавливающих, так и в не восстанавливающих условиях и представляют наиболее заметные варианты. Дополнительная полоса между 37 кДа и 50 кДа наблюдается в условиях восстановления, что свидетельствует о том, что LC или HC не полностью денатурированы или восстановлены в выбранных условиях. Полоса между 75 кДа и 100 кДа предположительно происходит от димера LC. В не восстанавливающих условиях видны LC и димеры LC. Для молекул IgG известно, что LC и димеры LC являются растворимыми и могут присутствовать при использовании общего процесса очистки.

7.2. Исследование стресса с несколькими pH:

[0296] Цель исследования стресса с несколькими pH заключалась в изучении химической и термической стабильности антител Morrison-H и Morrison-L PRO2198, PRO2199, PRO2206 и PRO2207. Молекулы подвергали диализу в 20 mM буфере MES/ацетат/Нерес с pH 3,5, 5, 7 и 8,5. В последних трех условиях образцы инкубировали в течение 10 дней при 40°C, чтобы вызвать химическую деградацию, такую как окисление и фрагментация. pH 3,5 представляет собой жесткое стрессовое состояние, ведущее к быстрой деградации и гидролизу, поэтому эти образцы инкубировали при 25°C в течение 10 дней. Формирование вариантов заряда анализировали с помощью CEX-HPLC, а фрагментацию исследовали с помощью SDS-PAGE. Молекулы инкубировали при концентрации 1 мг/мл. Термостабильность анализировали с помощью nDSF (NanoTemper),

определяя начало разворачивания (Tonset), середину разворачивания (Tm1) и начало агрегации (TScattering).

Зарядный профиль вариантов

[0297] Во время более позднего развития DSP очистка с высоким выходом является важной мерой. Одним из основных методов, используемых для очистки IgG-подобных молекул, является ионообменная хроматография. Таким образом, антитела IgG, демонстрирующие высокую целевую чистоту по данным CEX-HPLC, вероятно, будут менее проблемными во время развития стадии ионообменной очистки.

[0298] Все протестированные антитела, то есть PRO2198, PRO2199, PRO2206 и PRO2207, продемонстрировали сравнимую сложность (гетерогенность заряда), где молекулы Morrison-L показали несколько меньшую сложность, чем молекулы Morrison-H. Кроме того, молекулы PRO2199 и PRO2207, на основе клона IL4R sc09, имели несколько более высокую целевую чистоту.

[0299] Таким образом, все молекулы показали низкую неоднородность заряда после общего процесса очистки без существенных различий.

Формирование вариантов по заряду

[0300] Формирование вариантов по заряду анализировали для PRO2198, PRO2199, PRO2206 и PRO2207 после инкубации в 20 mM буфере MES/ацетат/Нерес при pH 3,5, pH 5, pH 7 и pH 8,5. Особое значение придается химической стабильности при pH 5 и pH 7, поскольку эти значения pH определяют приблизительные пределы для более поздних составов. В Таблице 49 показаны полученные результаты. При pH 5 все молекулы показали хорошую устойчивость к химической деградации. При более высоких значениях pH усиливалась химическая деградация с повышением образования кислых вариантов составов. Все молекулы продемонстрировали одинаковую стабильность, за исключением PRO2206, которая имела более высокую потерю мишени при pH 8,5. При pH 3,5 наблюдалось лишь незначительная химическая деградация.

Таблица 49: Образование вариантов по заряду при различных значениях pH (№ 1 Температура хранения при pH 3,5 составляет 25°C)

Значения в [отн. %]	PRO2198	PRO2199	PRO2206	PRO2207
t0	76.4	81.4	78.1	84.1
Δмишени через 10 дней хранения при 40°C ^{#1}				
pH 3,5	3,1	1,9	1,0	1,3
pH 5,0	1,1	0,2	-1,0	-0,7
pH 7,0	-5,5	-7,2	-6,8	-7,2
pH 8,5	-12,9	-11,8	-22,0	-15,5

Анализ фрагментации с помощью SDS-PAGE

[0301] Все белки анализировали на фрагментацию с использованием анализа SDS-PAGE (см. Фигуру 13). Никакой фрагментации не наблюдалось ни для одного из антител Morrison при pH 3,5, pH 5 и pH 7. Лишь небольшая фрагментация HC PRO2198 и PRO2199 наблюдалась при pH 8,5. Хотя для молекул Morrison-L не наблюдалось фрагментации HC, она могла быть перекрыта близкой LC.

[0302] Таким образом, все молекулы показали хорошую устойчивость к фрагментации.

Термостабильность

[0303] В рамках исследования pH-стресса PRO2198, PRO2199, PRO2206 и PRO2207 анализировали на предмет их термостабильности в диапазоне pH 3,5-8,5. Определяли как тепловое разворачивание, так и начало тепловой агрегации. Во время теплового разворачивания все молекулы показали более одного перехода из-за многодоменной архитектуры молекул. Для простоты показана только первая средняя точка плавления. В Таблице 50 обобщены результаты.

Таблица 50: Термостабильность

pH	PRO2198	PRO2199	PRO2206	PRO2207
Начало разворачивания (T_{onset}) с помощью nDSF [°C]				
3,5	45,6	43,4	42,4	40,9
5	55,4	55,1	55,8	56,3
7	60,5	59,3	58,7	57,5
8,5	59,7	58,3	57,0	55,1
Средняя точка первого перехода разворачивания (T_{m1}) с помощью nDSF [°C]				
3,5	50,7	50,6	49,7	50,0
5	62,9	62,8	62,1	62,0
7	66,9	66,7	66,2	66,1
8,5	66,5	66,2	65,1	65,1
Начало агрегации ($T_{\text{рассеяния}}$) с помощью nDSF [°C]				
3,5	Нет наблюдаемой агрегации			
5	Нет наблюдаемой агрегации			
7	73,5	71,6	72,2	69,0
8,5	71,4	68,4	68,8	65,2

[0304] Начало разворачивания (T_{onset}), а также первая точка плавления (T_{m1}) были самыми высокими при pH 7 для всех молекул. Изменение pH до 8,5 лишь незначительно снижало термостабильность. По направлению к кислому pH термостабильность снижалась. Однако при pH 5 все проявления разворачивания происходили при температуре выше 55°C. При pH 3,5 термостабильность снижалась до значения T_{onset} ниже 50°C.

[0305] Тепловая агрегация наблюдалась только при pH 7 и pH 8,5. При кислом pH, как при pH 3,5, так и при pH 5,0, все антитела Morrison не образовывали более крупных агрегатов даже в развернутом состоянии. При нейтральном и щелочном pH начало агрегации было выше первой точки плавления, что свидетельствует о ненативном механизме агрегации.

[0306] Хотя различия между молекулами не были существенными, PRO2198 в целом

обладает наибольшей стабильностью. Это было наиболее заметно при pH 3,5 с более высоким значением Tonset на 5°C по сравнению с PRO2207. Это pH имеет значение в производственном процессе для стадии вирусной инактивации.

7.3. Исследование высокой концентрации

[0307] Для испытаний возможности концентраций PRO2198 был приготовлен в двух составных буферах:

Буфер для состава F1: 20 мМ ацетат при pH 5,5;

Буфер для состава F2: 20 мМ цитрата с 50 мМ NaCl при pH 5,5.

Растворимость - концентрация белка

[0308] PRO2198 может быть сконцентрирован выше 100 мг/мл без признаков осаждения или достижения предела растворимости. Кроме того, PRO2198 не показал заметного снижения концентрации белка, т. е. PRO2198 был достаточно растворимым, чтобы достичь и поддерживать целевую концентрацию выше 100 мг/мл в течение по меньшей мере четырех недель при 4°C и 25°C.

Стабильность мономера при различных температурах

[0309] PRO2198 был приготовлен в F1 и F2 и сконцентрирован до >100 мг/мл. Концентрированные образцы хранили при 4°C, 25°C и 40°C до 4 недель. В разные моменты времени содержание мономеров анализировали с помощью SE-HPLC. Результаты суммированы в Таблице 51.

Таблица 51: Стабильность мономера для PRO2198 при концентрации >100 мг/мл

Температура хранения [°C]	Время [недели]	Состав F1		Состав F2	
		Мономер [отн. %]		Мономер [отн. %]	
		Absolut	Delta	Absolut	Delta
N/A	0	99,0	0,0	99,1	0,0
4,0	4	98,1	-0,9	98,3	-0,8
25,0	4	96,1	-2,9	96,2	-2,9
40,0	2	83,1	-15,9	82,0	-17,1
	4	72,4	-26,6	70,9	-28,2

7.4. Общие методы, используемые для биофизической характеристики антител Morrison-N и Morrison-L.

Замена буфера

[0310] Замену буфера осуществляли диализом. Антитела диализовали на диализных мембранах Spectra Pro 3 (Spectrum Laboratories) по меньшей мере с 200-кратным избытком диализного буфера.

Концентрирование антител

[0311] Антитела концентрировали с использованием центрифужных концентраторов с отсечением по молекулярной массе (MWCO) 10 кДа или 30 кДа. Образцы центрифугировали с шагом 5 мин при 22°C до достижения целевой концентрации. В промежутках между шагами образцы ресуспендируют.

Определение концентрации белка

[0312] Концентрацию белковых образцов определяли с помощью планшетного

ридера Tecan и планшета NanoQuant. Буфер использовали в качестве холостого опыта для вычитания из поглощения, измеренного при 280 нм. В каждое измерение вносилась поправка на рассеяние, вызванное видимыми частицами, определяемыми при длине волны 310 нм. Скорректированное значение нормализовали к длине пути 1 см, а концентрацию белка рассчитывали с использованием теоретического коэффициента поглощения соответствующего белка. Для образцов белка с концентрацией выше 10 мг/мл образец разводили в соответствующем буфере по меньшей мере в 10 раз или до номинальной концентрации 1 мг/мл.

SDS-PAGE

[0313] SDS-PAGE проводили в восстанавливающих условиях. После денатурации и восстановления 5 мкг образца наносили на градиентный гель (4%-20%). После разделения белковые полосы окрашивали кумасси синим, а гель обесцвечивали очищенной водой.

Хранение

[0314] Для оценки стабильности белка при различных температурах образцы инкубировали при 4°C, 25°C и 40°C. Хранение при 4°C осуществляли в холодильнике при номинальной температуре 4°C. Для хранения при 25°C и 40°C образцы помещали в шкафы с регулируемой влажностью 65% гН и 75% гН, соответственно.

Тепловое разворачивание с помощью nanoDSF

[0315] Тепловое разворачивание с использованием анализа теплового сдвига определяли по изменению интенсивности флуоресценции Sypro Orange. Флуоресценция красителя чувствительна к гидрофобным взаимодействиям. По мере разворачивания белка гидрофобные аминокислоты подвергаются воздействию растворителя, что приводит к усилению флуоресценции Sypro Orange. Результирующую среднюю точку теплового разворачивания (T_m), а также начальную температуру, рассчитанную при 10% от максимального сигнала (T_{onset} - это температура при: $\text{мин. сигнал} + 0,1 * (\text{макс. сигнал} - \text{мин. сигнал})$) определяли путем аппроксимации данных к уравнению Больцмана.

Содержание мономеров по данным SE-HPLC

[0316] Содержание мономеров определяли с помощью аналитической эксклюзионной хроматографии с использованием колонки Shodex KW403-4F, работающей в 50 mM фосфате натрия, 300 mM NaCl, pH 6,5. Для анализа вводили 5 мкг образца и регистрировали поглощение при 280 нм. Качество образца выражается в относительных процентах мономера, HMWS и LMWS.

Катионообменная HPLC (CEX-HPLC)

[0317] Для количественной оценки вариантов по заряду применяли аналитическую катионообменную хроматографию. Образцы анализировали на колонке MAbPac™ SCX-10. Варианты по заряду разделяли с использованием градиента pH от pH 4 до pH 10. Для анализа вводили 30 мкг образца и регистрировали поглощение при 280 нм. Качество образца выражается в относительных процентах целевых, кислых вариантов по заряду и основных вариантов по заряду.

Масс-спектрометрия

[0318] Для выявления и исключения тяжелых посттрансляционных модификаций определяли интактную массу антител Morrison. Образцы восстанавливали с помощью DTT перед анализом ESI-MS, обессоливали и анализировали в MeOH:2-PrOH:0,2% FA (30:20:50). Нано-ESI-MS анализы образцов проводили на масс-спектрометре Syn-apr G2-Si. Записанные данные m/z затем были деконволюционированы в масс-спектры с применением алгоритма максимальной энтропии MaxEnt1 (MaxLynx) с разрешением выходной массы 0,5 Да/канал и однородной гауссовской модели повреждений на полувысоте 0,7 Да.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полиспецифическое антитело, содержащее:

а) один или два связывающих домена, которые специфически связываются с IL-4R (IL4R-BD), и

б) один или два связывающих домена, которые специфически связываются с IL-31 (IL31-BD),

где

- полиспецифическое антитело содержит Fc-область иммуноглобулина;

- каждый из указанных IL4R-BD содержит последовательность HCDR1 SEQ ID NO: 1, последовательности HCDR2 SEQ ID NO: 2, последовательность HCDR3 SEQ ID NO: 3, последовательность LCDR1 SEQ ID NO: 7, последовательность LCDR2 SEQ ID NO: 8, и последовательности LCDR3 SEQ ID NO: 9; и

- каждый из указанных IL31-BD содержит последовательность HCDR1 SEQ ID NO: 12, последовательность HCDR2 SEQ ID NO: 13, последовательности HCDR3 SEQ ID NO: 14, последовательность LCDR1 SEQ ID NO: 17 или 18, последовательность LCDR2 SEQ ID NO: 19, и последовательности LCDR3 SEQ ID NO: 20.

2. Полиспецифическое антитело по п. 1, где Fc-область иммуноглобулина выбрана из IgG-подкласса, конкретно, из IgG-подклассов IgG1 и IgG4, конкретно, из IgG4.

3. Полиспецифическое антитело по п. 2, где формат указанного полиспецифического антитела выбран из двухвалентных биспецифических форматов IgG, трехвалентных биспецифических форматов IgG и четырехвалентных биспецифических форматов IgG;

более конкретно, где формат указанного полиспецифического антитела выбран из IgG на основе KiH; DVD-Ig; CODV-IgG и Morrison (слияние IgG CH3-scFv (Morrison-H) или слияние IgG CL-scFv (Morrison-L)), еще более конкретно из DVD-Ig и Morrison (слияние IgG CH3-scFv (Morrison-H) или слияние IgG CL-scFv (Morrison-L)).

4. Полиспецифическое антитело по п. 3, где формат указанного полиспецифического антитела выбран из форматов Morrison.

5. Полиспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов, где указанное полиспецифическое антитело содержит два IL4R-BD и/или два IL31-BD.

6. Полиспецифическое антитело по п. 5, где IL4R-BD расположены в Fab-плечах, а IL31-BD расположены в scFv-части формата Morrison.

7. Полиспецифическое антитело по любому из пп. 4-6, где формат полиспецифического антитела выбран из формата Morrison-L и Morrison-H, в частности, представляет собой формат Morrison-H.

8. Полиспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов, где указанные IL4R-BD и указанные IL31-BD дополнительно содержат каркасные последовательности FR1-FR4 домена VH3 или VH4; конкретно, каркасные последовательности FR1-FR4 домена VH3.

9. Полиспецифическое антитело по п. 8, где указанные IL4R-BD и указанные IL31-BD в формате scFv содержат

(i) домены VL, содержащие каркас VL, содержащий каркасные области FR1, FR2 и FR3, которые выбраны из подтипов V_κ, в частности, из подтипов V_κ1 и V_κ3, конкретно, относятся к подтипу V_κ1, и каркасную область FR4, которая выбрана из V_κ FR4 и V_λ FR4, конкретно, представляет собой V_λ FR4, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70, 80, 90 процентов идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 26 - SEQ ID NO: 33, более конкретно, V_λ FR4, выбранную из любой из SEQ ID NO: 26 - SEQ ID NO: 33, конкретно, V_λ FR4 в соответствии с SEQ ID NO: 26 или 33.

10. Полиспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов, где указанные IL4R-BD содержат

a) последовательность VH, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную любой из аминокислотных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 4, 5 и 6; и

b) последовательность VL, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную любой из аминокислотных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 10 и 11,

в частности, где указанные IL4R-BD содержат

a) последовательность VH SEQ ID NO: 4 и последовательность VL SEQ ID NO: 11;

или

b) последовательность VH SEQ ID NO: 5 и последовательность VL SEQ ID NO: 10;

или

c) последовательность VH SEQ ID NO: 6 и последовательность VL SEQ ID NO: 10.

11. Полиспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов, где указанные IL31-BD содержат

a) последовательность VH, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную любой из аминокислотных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 15 и 16; и

b) последовательность VL, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную любой из аминокислотных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 21 и 22,

в частности, где указанный IL31-BD содержит

a) последовательность VH SEQ ID NO: 15 и последовательность VL SEQ ID NO: 22;

или

b) последовательность VH SEQ ID NO: 16 и последовательность VL SEQ ID NO: 21.

12. Полиспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов, где по меньшей мере один из двух IL4R-BD и по меньшей мере один из двух IL31-BD способны одновременно связываться с соответствующими антигенами.

13. Нуклеиновая кислота или две нуклеиновые кислоты, кодирующие полиспецифическое антитело по любому из пп. 1-12.

14. Вектор или два вектора, содержащие нуклеиновую кислоту или две нуклеиновые кислоты по п. 13.

15. Клетка-хозяин или клетки-хозяева, содержащие вектор или два вектора по п. 14.

16. Способ получения полиспецифического антитела по любому из пп. 1-12, включающий (i) получение нуклеиновой кислоты или двух нуклеиновых кислот по п. 13, или вектора, или двух векторов по п. 14, экспрессию указанной нуклеиновой кислоты или указанных двух нуклеиновых кислот или указанного вектора или векторов, и сбор указанного полиспецифического антитела из экспрессирующей системы, или (ii) получение клетки-хозяина или клеток-хозяев по п. 15, культивирование указанной клетки-хозяина или указанных клеток-хозяев; и сбор указанного полиспецифического антитела из клеточной культуры.

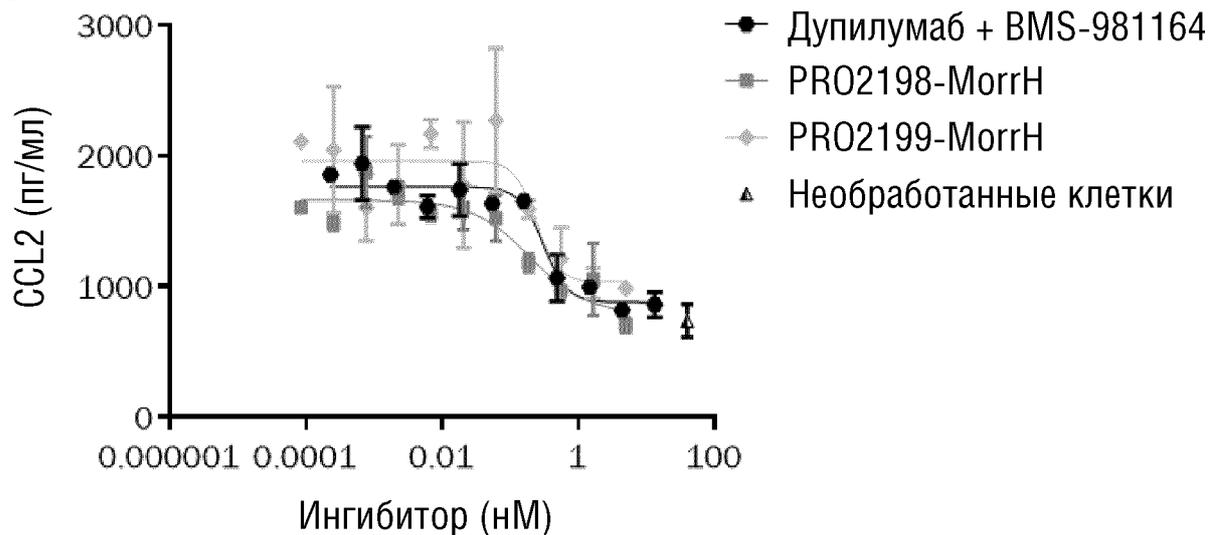
17. Фармацевтическая композиция, содержащая полиспецифическое антитело по любому из пп. 1-12 и фармацевтически приемлемый носитель.

18. Полиспецифическое антитело по любому из пп. 1-12 для применения при лечении заболевания, выбранного из аллергических, воспалительных и аутоиммунных заболеваний, конкретно, аллергических заболеваний, вызывающих зуд, воспалительных заболеваний, вызывающих зуд, и аутоиммунных заболеваний, вызывающих зуд, конкретно, атопического дерматита, острого аллергического контактного дерматита, хронической спонтанной крапивницы, буллезного пемфигоида, очаговой алопеции, дерматомиозита, узловатого пруриго, псориаза и атопической астмы; конкретно когда указанное заболевание представляет собой атопический дерматит.

По доверенности

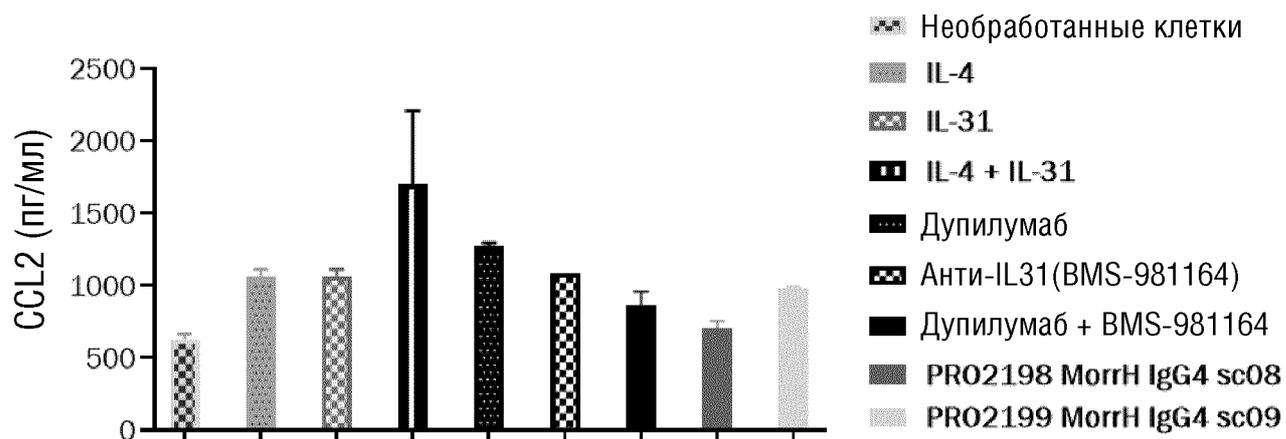
ФИГ.1

А



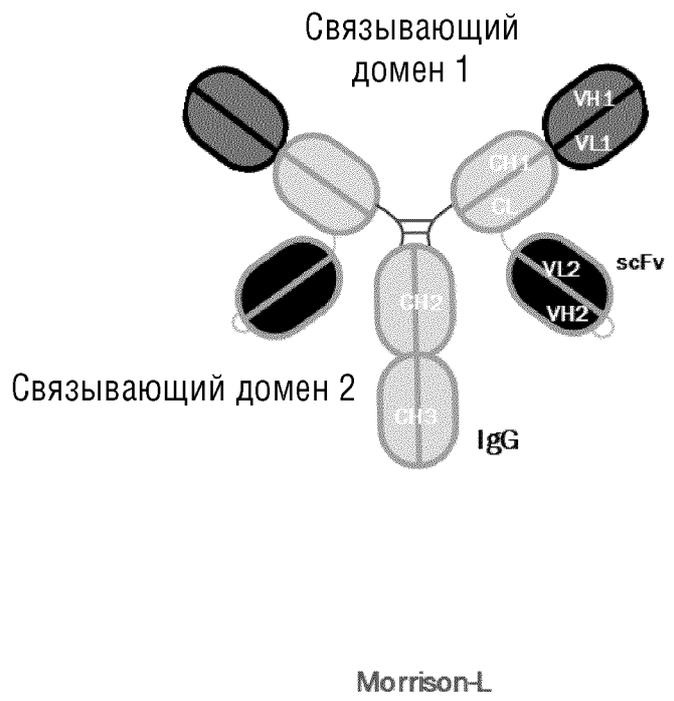
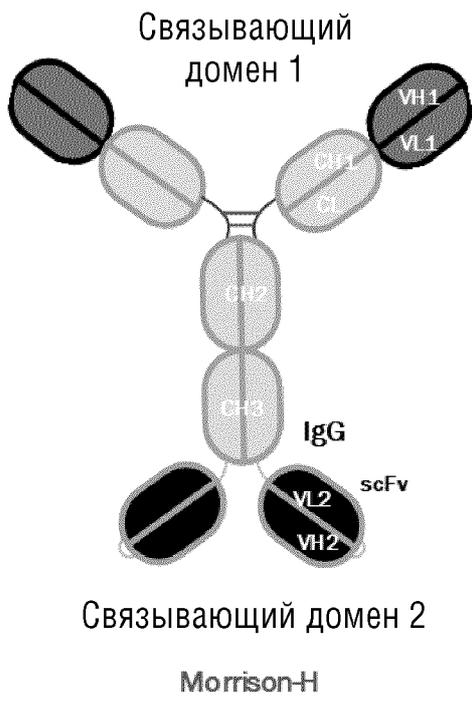
	Дупилумаб + BMS-981164	PRO2198-MorrH	PRO2199-MorrH
IC50	0.3082	0.1960	0.2408

В

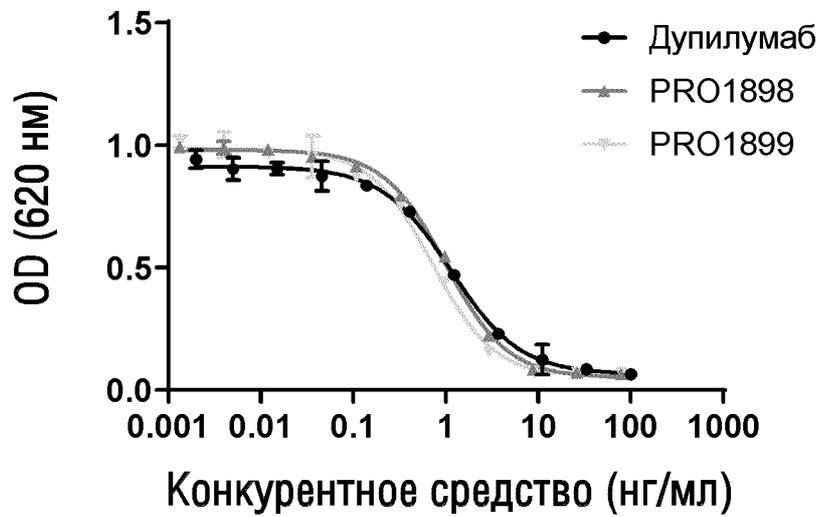
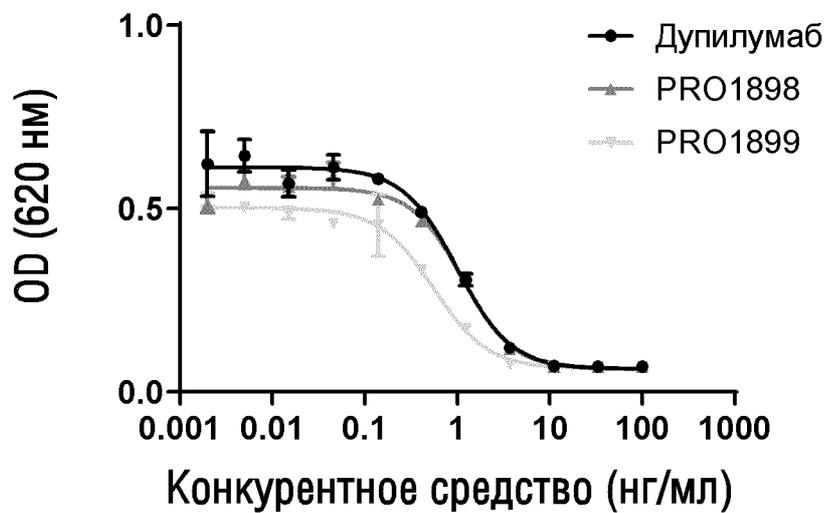


IL-4	-	+	-	+	+	+	+	+	+
IL-31	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Конкурентное средство	-	-	-	-	Dupl	BMS	Dupl и BMS	PRO 2198	PRO 2199

ФИГ.2

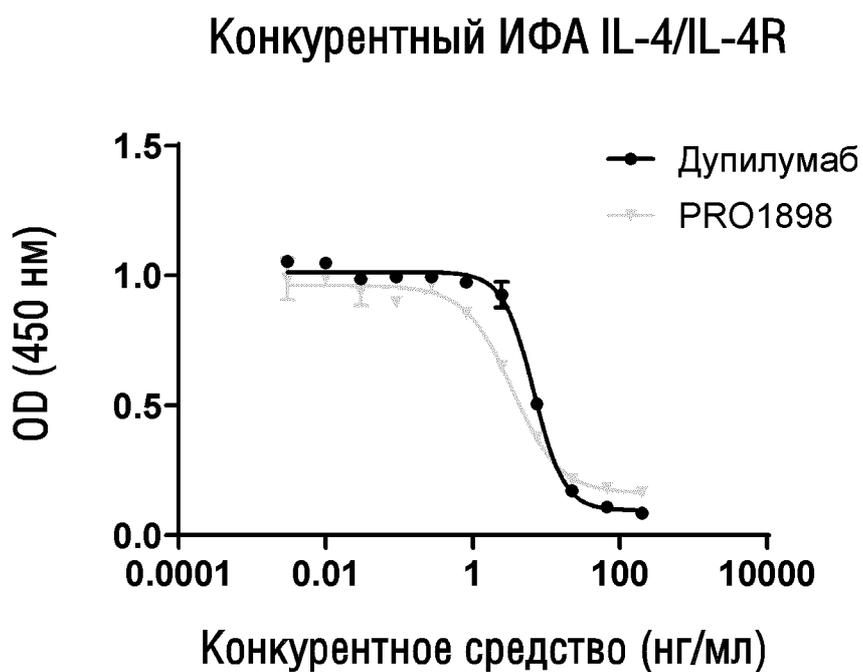


ФИГ.3

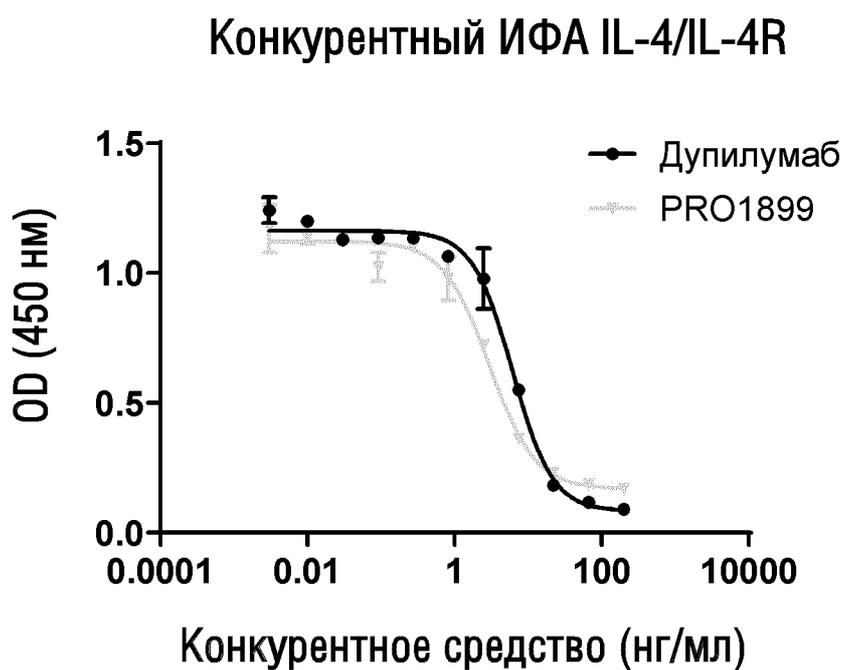
A Ингибирование индуцированной IL-4 секреции SEAP**B** Ингибирование индуцированной IL-13 секреции SEAP

ФИГ.4

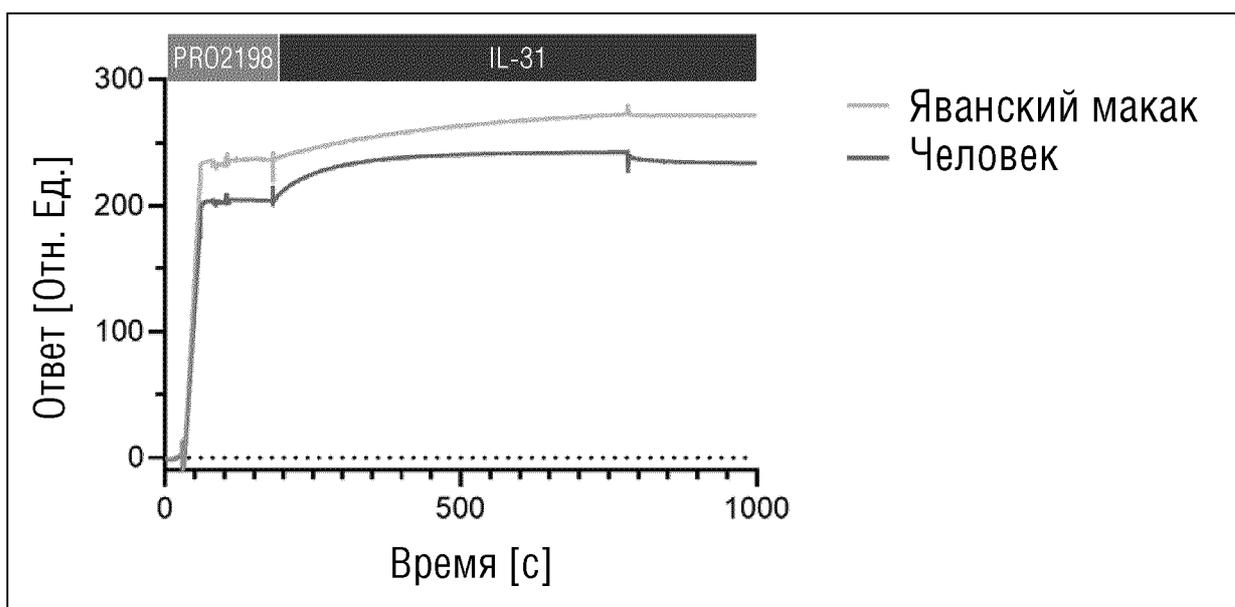
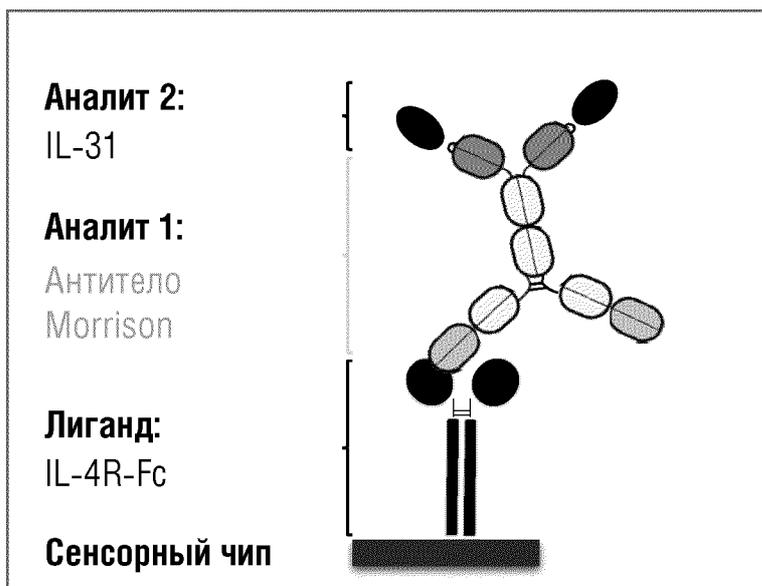
А



В

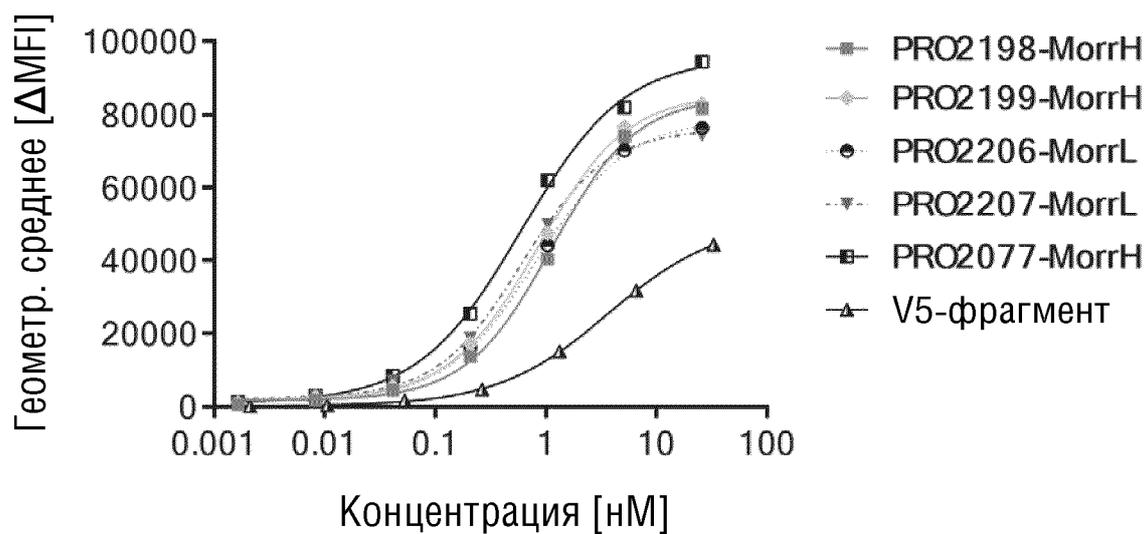


ФИГ.5

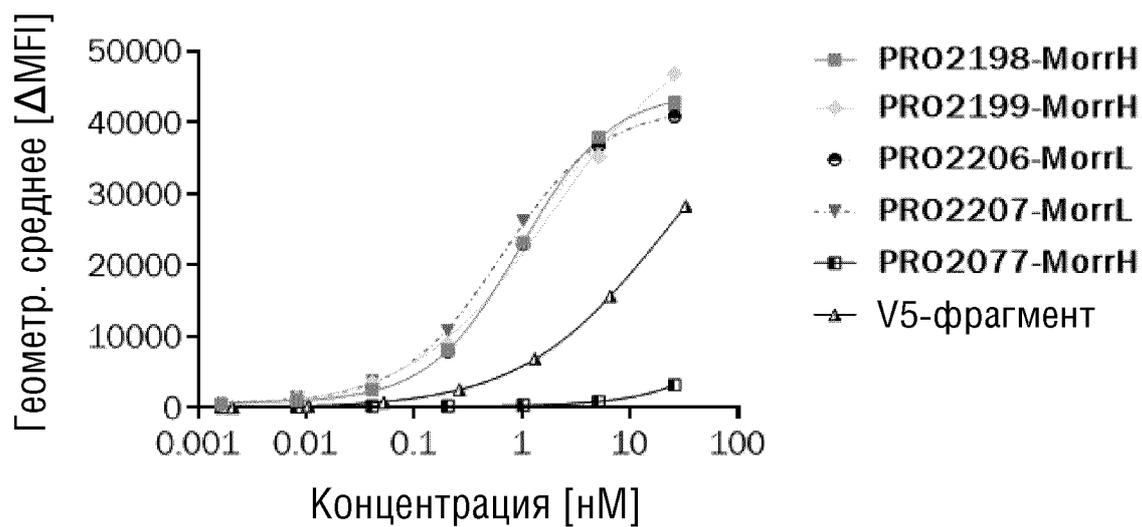


ФИГ.6

А

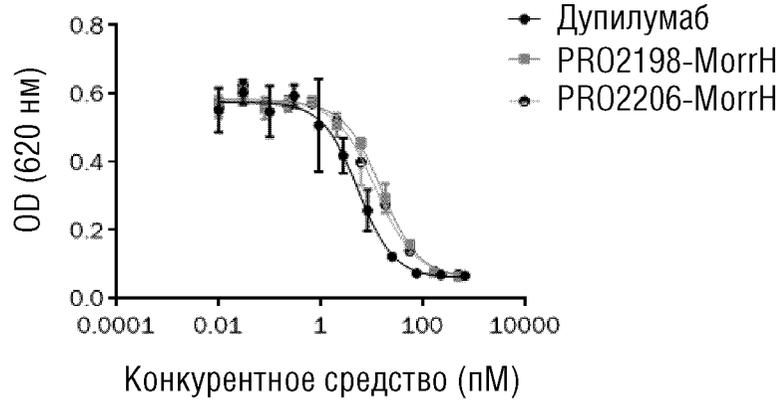


В



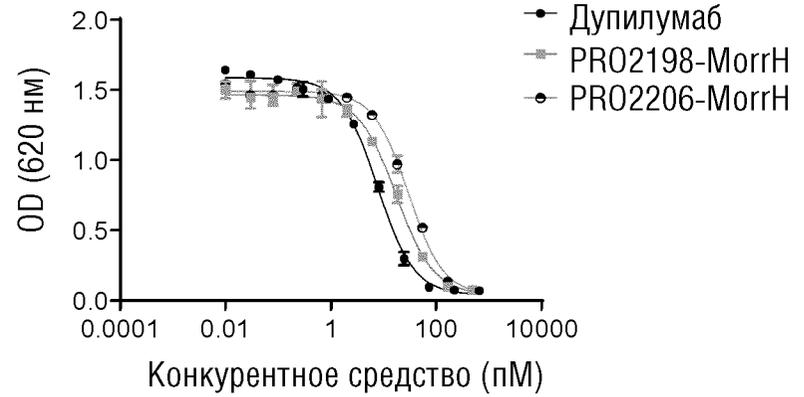
ФИГ.7

A Ингибирование индуцированной IL-4 секреции SEAP



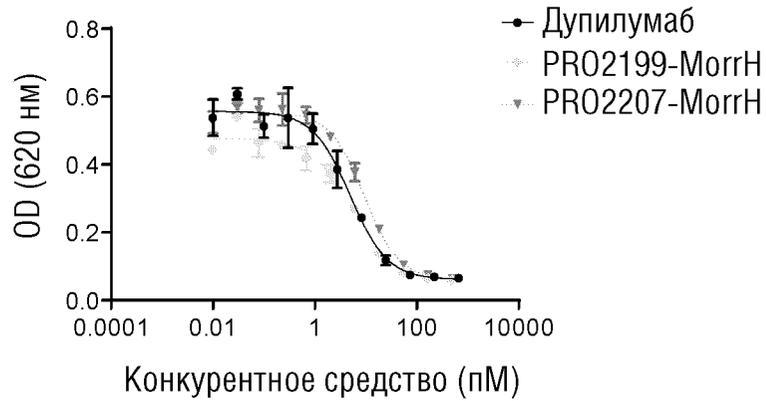
	Дупилумаб	PRO2198-MorrH	PRO2206-MorrL
IC50	5.346	15.35	11.77

B Ингибирование индуцированной IL-13 секреции SEAP



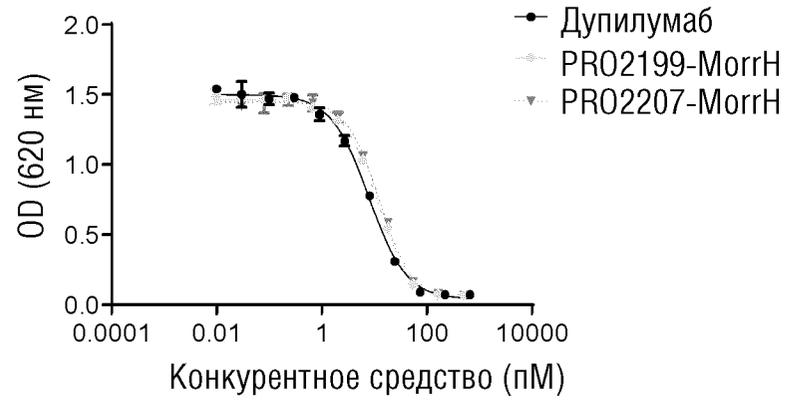
	Дупилумаб	PRO2198-MorrH	PRO2206-MorrL
IC50	7.653	17.35	29.51

C Ингибирование индуцированной IL-4 секреции SEAP



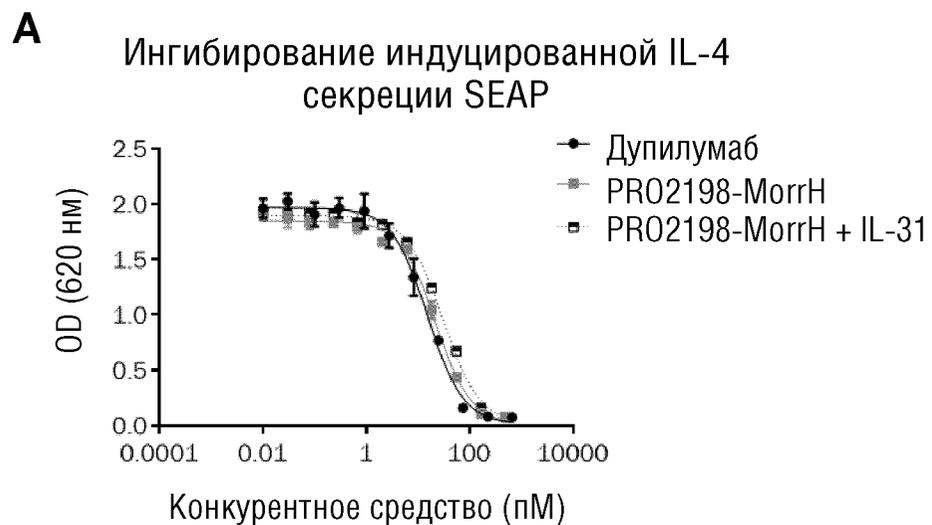
	Дупилумаб	PRO2199-MorrH	PRO2207-MorrL
IC50	4.931	5.437	9.420

D Ингибирование индуцированной IL-13 секреции SEAP

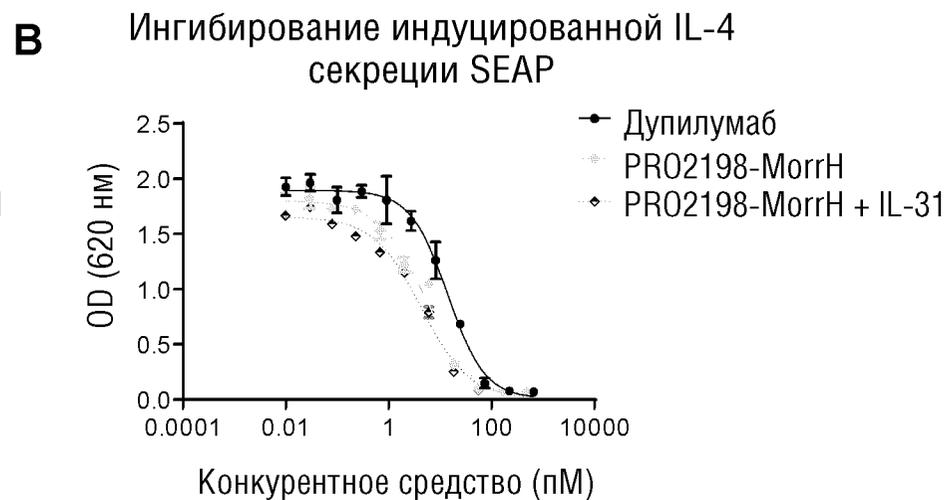


	Дупилумаб	PRO2199-MorrH	PRO2207-MorrL
IC50	7.804	11.29	12.59

ФИГ.8



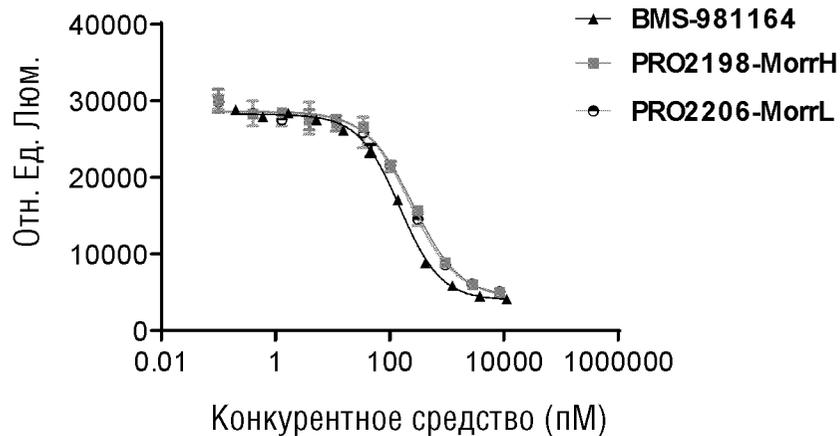
	Дупилумаб	PRO2198-MorrH	PRO2198-MorrH + IL-31
IC50	15.23	21.87	30.66



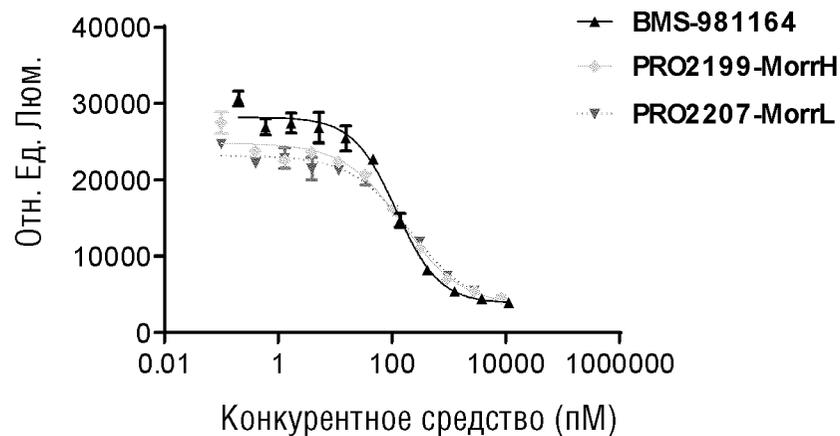
	Дупилумаб	PRO2198-MorrH	PRO2198-MorrH + IL-31
IC50	14.02	5.403	4.312

ФИГ.9

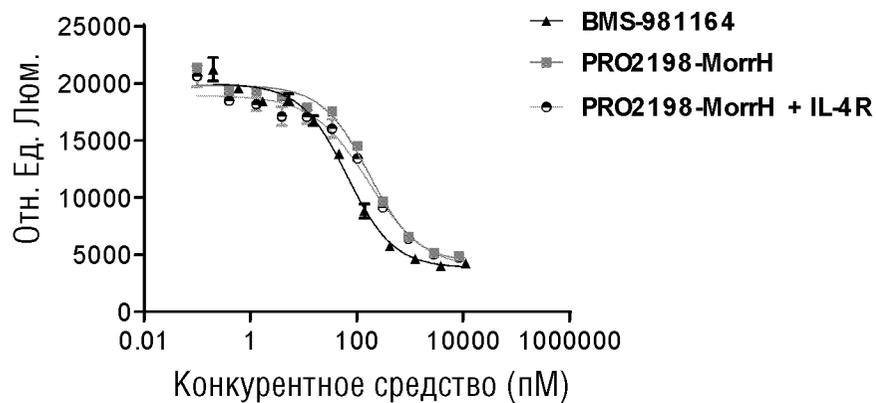
A Ингибирование индуцированной IL-31 передачи сигналов



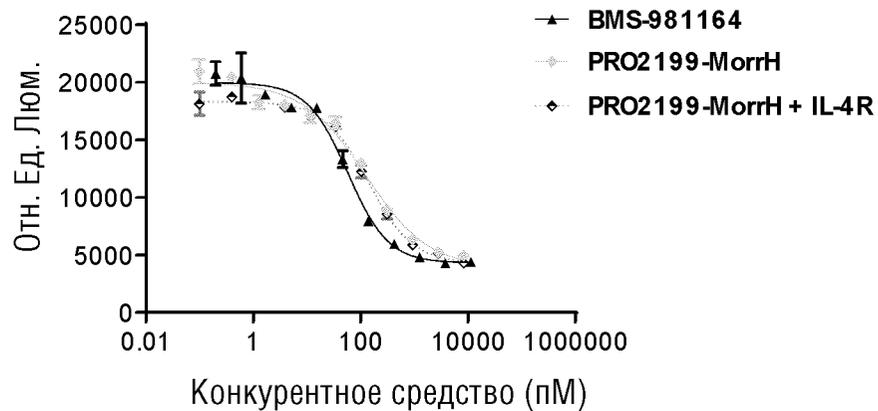
B Ингибирование индуцированной IL-31 передачи сигналов



C Ингибирование индуцированной IL-31 передачи сигналов

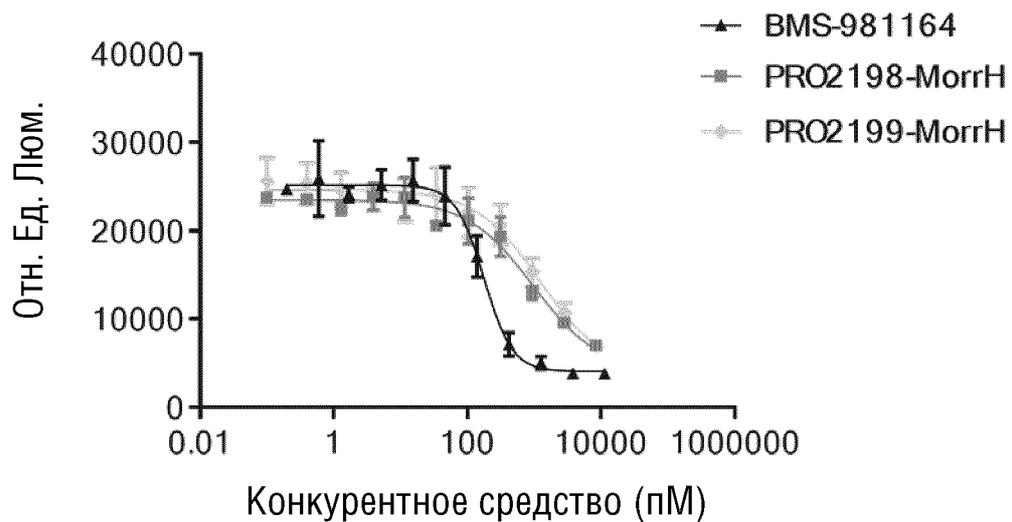


D Ингибирование индуцированной IL-31 передачи сигналов



ФИГ.10

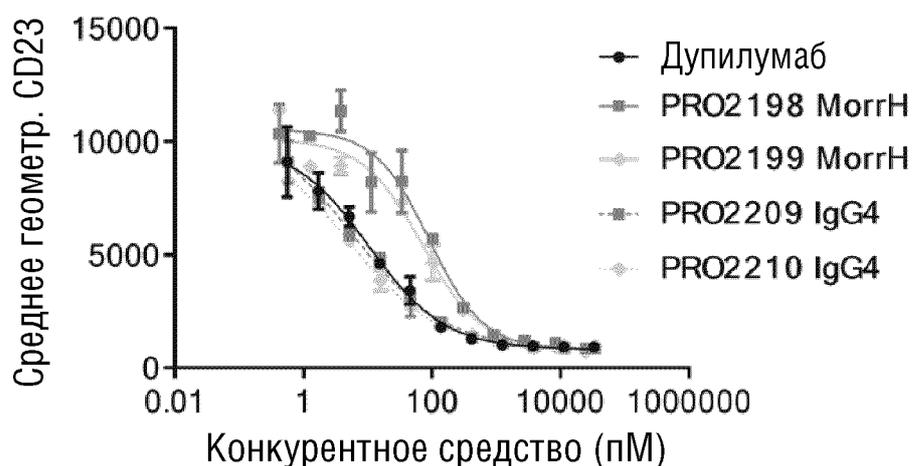
**Ингибирование индуцированной IL-31
яванского макака передачи сигналов**



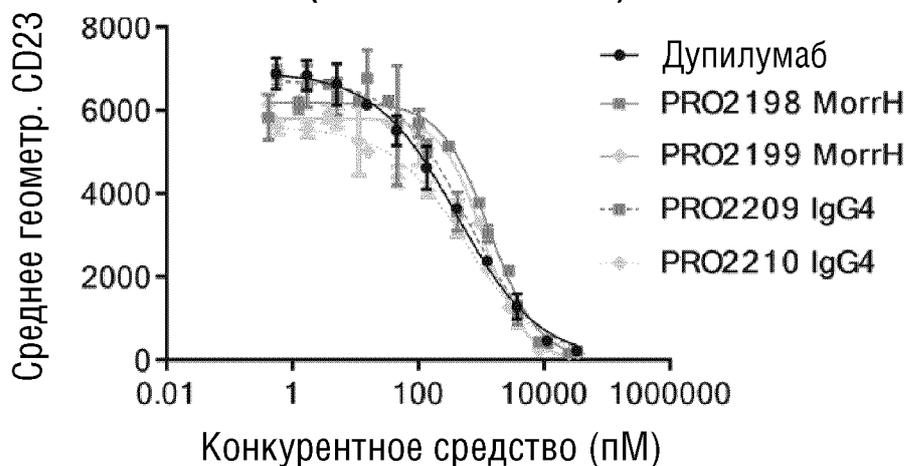
	BMS-981164	PRO2198-MorrH	PRO2199-MorrH
IC50	177.8	959.1	1211

ФИГ.11

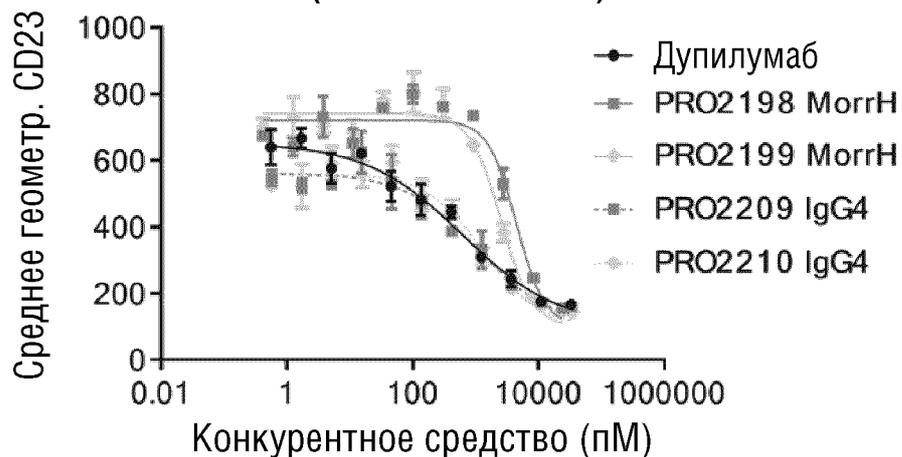
А Ингибирование индуцированной IL-4 экспрессии CD23 (моноциты)



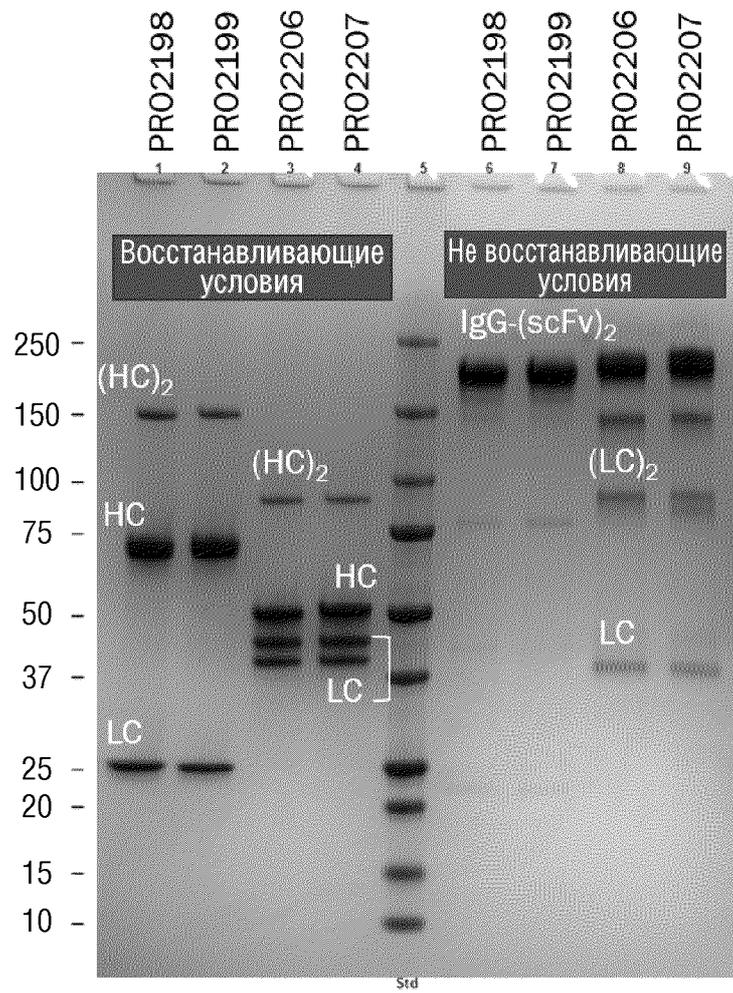
В Ингибирование индуцированной IL-4 экспрессии CD23 (наивные В-клетки)



С Ингибирование индуцированной IL-4 экспрессии CD23 (В-клетки памяти)



ФИГ.12



ФИГ.13

