

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046243**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.02.20

(21) Номер заявки
202090364

(22) Дата подачи заявки
2018.07.30

(51) Int. Cl. **C07K 16/24** (2006.01)
C07K 16/16 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01)

(54) **АНТИТЕЛА С ФУНКЦИОНАЛЬНЫМИ ДОМЕНАМИ В ОБЛАСТИ ИЗГИБА МЕЖДУ ВАРИАБЕЛЬНЫМ И КОНСТАНТНЫМ ДОМЕНОМ**

(31) **PCT/EP2017/069357**

(32) **2017.07.31**

(33) **EP**

(43) **2020.06.26**

(86) **PCT/EP2018/070640**

(87) **WO 2019/025391 2019.02.07**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ИНСТИТУТ ФОР РИСЕРЧ ИН
БАЙОМЕДИСИН (СН)**

(72) Изобретатель:
**Ланцавеккья Антонио, Пикколи Лука
(СН)**

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

(56) **WO-A1-2009018386
WO-A1-2016207402**

JOSHUA TAN ET AL.: "A LAIR1 insertion generates broadly reactive antibodies against malaria variant antigens", NATURE, vol. 529, no. 7584, 23 December 2015 (2015-12-23), pages 105-109, XP055296957, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature16450

FU-LIEN HSIEH: "The structure of a LAIR1-containing human antibody reveals a novel mechanism of antigen recognition", ELIFE, vol. 6, 20 May 2017 (2017-05-20), pages 1-11, XP055426101, DOI: 10.7554/eLife.27311

Pavel E Yakovlev: "Discovery and characterization of a high potency anti-inflammatory trispecific TNF-alpha/IL-17 Alpha/IL-17F inhibitor", PEGS Boston 2016, 29 April 2016 (2016-04-29), XP055426431, Retrieved from the Internet: URL:https://www.slideshare.net/PavelYakovlev7/discovery-and-characterization-of-a-high-potency-anti-inflammatory-trispecific-tail17ail17f-inhibitor [retrieved on 2017-11-17], the whole document

(57) В изобретении описаны сконструированные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, в которых дополнительный функциональный домен инсертирован в область изгиба антитела или антигенсвязывающего фрагмента. В изобретении также описаны молекулы нуклеиновых кислот, например векторы, кодирующие такие антитела и антигенсвязывающие фрагменты, клетки хозяева и композиции, включающие такие антитела, антигенсвязывающие фрагменты или молекулы нуклеиновых кислот и их применение. Например, описан формат мультиспецифичного антитела, в котором дополнительный сайт связывания (специфичность) инсертирован в область изгиба антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

B1**046243****046243****B1**

Настоящее изобретение относится к области сконструированных антител с дополнительным функциональным доменом, например, к форматам мультиспецифических антител. В частности, настоящее изобретение относится к сконструированным антителам, у которых дополнительный функциональный домен инсертирован в область изгиба антитела. Соответственно, например, предусмотрен формат мультиспецифических антител, у которых сайт дополнительного связывания (специфичность) инсертирован в область изгиба антитела.

В последние годы появилось множество форматов мультиспецифических антител, основанных на молекулярном конструировании классических природных антител, например, IgG, которые специфически связываются с одним типом антигена. В отличие от классических природных антител, например, IgG, мультиспецифические антитела способны связываться с двумя или несколькими различными мишенями, предлагая тем самым широкий спектр применений.

Классические природные антитела представляют собой Y-образные молекулы, содержащие четыре полипептидные цепи: две тяжелые цепи и две легкие цепи (фиг. 1A). Каждая легкая цепь состоит из двух доменов, N-концевой домен называют варибельным доменом или доменом VL, а C-концевой домен называют константным доменом или CL. Каждая тяжелая цепь состоит из четырех или пяти доменов, в зависимости от класса антитела. N-концевой домен тяжелой цепи называют варибельным или доменом VH. Следующий домен в направлении от N к C-концу называют первым константным доменом или CH1. Следующую часть тяжелой цепи называют шарнирной областью, за которой обычно следуют второй, третий и, в некоторых случаях, четвертый константный домен или CH2, CH3 и CH4, соответственно. Константная область, которая содержит константные домены, идентична у всех антител одного и того же изотипа, но отличается у антител разных изотипов. Тяжелые цепи γ , α и δ имеют константную область, состоящую из трех тандемных (расположенных в линию) доменов Ig, и шарнирную область для дополнительной гибкости; тяжелые цепи μ и ϵ имеют константную область, состоящую из четырех доменов иммуноглобулина.

Помимо шарнирной области, область изгиба также обеспечивает гибкость для связывания антигена. Изгиб представляет собой соединение между варибельными доменами и константными доменами в тяжелой и легкой цепях антитела.

Обычно, C-конец варибельного домена (VH или VL) непосредственно связан с N-концом крайних N-концевых константных доменов (обычно CH1 или CL), и соединение между C-концом варибельного домена и (VH или VL) и N-концом крайнего N-концевого константного домена (обычно CH1 или CL) называется "изгибом" или "областью изгиба". Область изгиба позволяет изгибать и вращать варибельные домены относительно константных доменов. Область изгиба также называют "молекулярным шаровидным суставом", поскольку она обеспечивает движение по типу движения шаровидного сустава (Lesk A.M., Chothia C. *Nature*. 335(6186), 1988, 188-90).

В собранном антителе домены VL и VH объединяются вместе для образования сайта связывания антигена. Кроме того, домены CL и CH1 объединяются вместе, чтобы сформировать одну тяжелую цепь, связанную с одной легкой цепью. Каждая шарнирная область тяжелой цепи включает, по меньшей мере, один и часто несколько остатков цистеина. В собранном антителе остатки цистеина в тяжелых цепях выровнены так, что дисульфидные связи могут образовываться между остатками цистеина в шарнирных областях и ковалентно связывать два гетеродимера тяжелой и легкой цепей вместе. Таким образом, полностью собранные антитела являются моноспецифическими в том отношении, что они связывают один тип антигена, и двухвалентными в том отношении, что они имеют два независимых сайта связывания антигена.

Основываясь на структуре таких моноспецифических двухвалентных классических природных антител, были сконструированы форматы мультиспецифических антител (см. обзоры Spiess C, Zhai Q., Carter P.J. *Mol Immunol*. 67(2A), 2015, 95-106 и Weidle U.H. с соавт., *Cancer Genomics Proteomics*. 10(1), 1-18). В общем, форматы мультиспецифических антител предшествующего уровня техники можно классифицировать на пять различных структурных групп: (i) мультиспецифические IgG, (ii) присоединенные IgG, (iii) мультиспецифические фрагменты антител, (iv) мультиспецифические гибридные белки и (v) мультиспецифические конъюгаты антител (Spiess C, Zhai Q., Carter P.J. *Mol Immunol*. 67(2A), 2015, 95-106).

Форматы мультиспецифических антител IgG обычно являются одновалентными для каждой специфичности (для каждого антигена). Первоначальные попытки объединить специфичности связывания двух целых антител против различных антигенов-мишеней в терапевтических целях использовали химически гибридные гетероконъюгатные молекулы (Staerz с соавт., *Nature* 314, 1985, 628-631). Биспецифичные антитела были получены из гибридных гибридом методами гетерогибридом (Milstein и Cuello, *Nature* 305, 1983, 537-540). Форматы мультиспецифических антител IgG включают CrossMab, DAF (два-в-одном), DAF (четыре-в-одном), DutaMab, DT-IgG, обычные LC по типу "выступ-во-впадину", сборку "выступ-во-впадину", заряженную пару, обмен Fab-фрагментами, SEEDbody, Triomab, LUZ-Y, Fcab, к λ -body и ортогональный Fab, например, согласно описанию Spiess C, Zhai Q., Carter P.J. *Mol Immunol*. 67(2A), 2015, 95-106.

В прилагаемых форматах антител IgG классический моноспецифический IgG создается путем присоединения дополнительных антигенсвязывающих фрагментов к N- и/или C-концу тяжелой и/или легкой цепи. Примеры таких дополнительных антигенсвязывающих фрагментов включают однодоменные антитела (неспаренные VH или VL), парные вариабельные домены антител, например Fv или scFv, или сконструированные каркасные белки. Форматы прилагаемых антител IgG включают DVD-IgG, IgG(H)-scFv, scFv-(H)IgG, IgG(L)-scFv, scFv-(L)IgG, IgG(L,H)-Fv, IgG(H)-V, V(H)-IgG, IgG(L)-V, V(L)-IgG, KIH IgG-scFab, 2scFv-IgG, IgG-2scFv, scFv4-Ig и Zybody, например, согласно описанию в публикации Spiess C, Zhai Q, Carter PJ. *Mol Immunol.* 2015 67(2A), 95-106. DVI-IgG (четыре-в-одном) представляет собой формат антитела IgG увеличенного размера, объединенный с форматом мультиспецифического антитела IgG, согласно описанному выше. Одно из важных преимуществ прилагаемых мультиспецифических форматов IgG заключается в том, что они могут обеспечивать одновременное связывание антигена со всеми вариабельными доменами и, следовательно, обеспечивать повышенную способность к специфическому связыванию.

Фрагменты мультиспецифических антител обычно утратили один или несколько константных доменов по сравнению с природными антителами.

Фрагменты мультиспецифических антител включают нанотела; нанотело-HAS, BiTE-антитела; diabodies (диантитела); DART; TandAb; scDiabodies; sc-Diabody-CH3; Diabody-CH3; Triple Bodies (трехвалентные антитела); Miniantibodies (миниантитела); Miniantibodies; Minibodies; TriBi minibodies; scFv-CH3 KIH; Fab-scFv; scFv-CH-CL-scFv; F(ab')₂; F(ab')₂-scFv2; scFv-KIH; Fab-scFv-Fc; Tetravalent HCAb (тетравалентные антитела); scDiabody-Fc; Diabody-Fc; Tandem scFv-Fc; и внутриклеточные антитела, согласно описанному, например, в статье Spiess C, Zhai Q, Carter PJ, *Mol Immunol.* 2015 67(2A), 95-106. Мультиспецифические гибридные белки включают Dock and Lock; ImmTAC; HSAbody; scDiabody-HAS; и Tandem scFv-Toxin, согласно описанию, например, в Spiess C, Zhai Q., Carter P.J., *Mol Immunol.* 2015 67(2A), 95-106, в частности на фиг. 1 и соответствующем описании, например, стр. 95-101. Конъюгаты мультиспецифических антител включают IgG-IgG, Cov-X-Body, scFv1-PEG-scFv2, согласно описанному, например, в статье Spiess C, Zhai Q, Carter PJ, *Mol Immunol.* 2015 67(2A), 95-106, в частности на фиг. 1 и соответствующем описании, например, стр. 95-101.

Обычно формат антитела выбирают в зависимости от предполагаемого применения. Например, длительный фармакологический период полураспада желателен для многих применений. Как правило, это достигается включением области Fc - тогда как для других приложений короткий период полураспада (и, следовательно, отсутствие области Fc) может быть выгодным. Более того, выход продукции может быть важным, в частности, поскольку известно, что производство мультиспецифических форматов антител IgG путем коэкспрессии двух различных легких и тяжелых цепей в одной клетке-хозяине является очень сложной задачей и может привести к неправильным связям антител, которые трудно удалить. Кроме того, для многих форматов антител, таких как форматы добавленных антител IgG, обычно требуются линкеры, чтобы обеспечить достаточную гибкость для одновременного связывания различных антигенов, но гибкая природа линкеров может сделать их более склонными к протеолитическому расщеплению, что может привести к созданию неудачного антитела по стабильности, агрегации и повышенной иммуногенности. Следует отметить, что для определенных применений стабильность антител может быть более важной, чем способность связывания, или наоборот, что зависит от назначения. Кроме того, формат антитела может быть выбран в зависимости от специфичности, то есть определенные сайты связывания антигена достигают лучших выходов продукции, стабильности и/или значений связывания в определенном формате антител - тогда как другие специфичности достигают лучших характеристик в других форматах антител (например, благодаря к размеру/структуре/природе целевого антигена).

Таким образом, существует необходимость в дополнительных форматах антител, обеспечивающих различные свойства. Поэтому целью настоящего изобретения является разработка нового формата антител с дополнительными функциональными возможностями, например, мультиспецифических антител или антител, сконструированных для обеспечения дополнительных функциональных возможностей, например, функциональность репортера, функциональность транслокации или функциональность носителя. Новый формат антител может необязательно был создан объединением с известными форматами антител, например, для получения антител с несколькими сайтами связывания или биспецифических антител с дополнительными функциональными возможностями. Эти цели достигаются благодаря сущности настоящего изобретения, изложенного в тексте ниже и в прилагаемой формуле изобретения.

Хотя настоящее изобретение подробно описано ниже, следует учитывать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными методологиями, протоколами и реагентами, описанными в настоящем изобретении, поскольку их можно заменять. Также следует учитывать, что используемая в настоящем изобретении терминология не ограничивает рамок охвата настоящего изобретения, которое ограничивается только прилагаемой формулой изобретения. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем изобретении, имеют те же значения, которые обычно приняты специалистами в данной области.

Ниже в настоящем изобретении будут описаны элементы настоящего изобретения. Эти элементы перечислены в определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, однако следует учиты-

вать, что они могут комбинироваться каким-либо образом и в каком-либо количестве для создания дополнительных вариантов осуществления настоящего изобретения. Различные описанные примеры и предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения не должны рассматриваться в качестве ограничивающих рамки охвата настоящего изобретения. Настоящее описание следует рассматривать как поддерживающее и охватывающее варианты осуществления, которые объединяют явно описанные варианты осуществления с любым количеством раскрытых и/или предпочтительных элементов. Кроме того, любые перестановки и комбинации всех описанных элементов в этом изобретении должны рассматриваться как раскрытые в описании настоящего изобретения, если контекст не указывает иное.

В данном описании и в формуле изобретения, которая приведена ниже, если контекст не требует иного, следует понимать, что термин "содержание" и такие варианты, как "содержит" и "содержащий", подразумевают включение указанного элемента, целого числа или этапа, но не исключено, что также и какого-либо другого неназванного элемента, целого числа или этапа. Термин "состоит из" представляет собой конкретное воплощение термина "содержит", в котором исключен любой другой неуказанный элемент, целое число или этап. В контексте настоящего изобретения понятие "включает" охватывает понятие "состоит из". Соответственно, понятие "включающий" охватывает понятие "состоящий из", например, композиция, "включающая" X может состоять исключительно из X или может включать что-то дополнительное, например, X+Y.

В контексте описания настоящего изобретения (особенно в контексте формулы изобретения), ссылки на единственное и множественное число должны толковаться как охватывающие как единственное, так и множественное число, если иное не указано в настоящем документе или если нет явного противоречия контексту. Перечисление диапазонов значений в данном документе просто предназначено для того, чтобы служить кратким способом индивидуальной ссылки на каждое отдельное значение, попадающее в диапазон. Если в данном описании не указано иное, каждое отдельное значение включается в описание, как если бы оно было отдельно указано. Ни один язык в описании не должен истолковываться как указывающий на какой-либо элемент, не заявленный в описании, но существенный для практического применения изобретения.

Понятие "в значительной степени" не исключает понятия "полностью", например, композиция, которая "по существу не содержит" Y, может быть композицией полностью без Y. При необходимости понятие "в значительной степени" может быть не употреблено в описании настоящего изобретения.

Понятие "примерно" по отношению к числовому значению x означает $x \pm 10\%$.

В контексте настоящего изобретения понятия "пептид", "полипептид", "белок" относятся к пептидам, олигопептидам или белкам, в том числе гибридным белкам, соответственно, включающим, по меньшей мере, две аминокислоты, соединенные друг с другом, предпочтительно обычной пептидной связью, или, в другом варианте, модифицированной пептидной связью, например, в случае изостерических пептидов. В частности, к понятиям "пептид", "полипептид", "белок" также относятся "пептидомиметики", которые означают аналоги пептидов, содержащих непептидные структурные элементы, которые способны мимикрировать или выступать антагонистами по отношению к биологическому действию (действиям) природного исходного пептида. У пептидомиметика утрачены классические пептидные характеристики, например, расщепляемые ферментами пептидные связи.

Пептид, полипептид или белок могут состоять из каких-либо 20 аминокислот, соответствующих генетическому коду. Кроме того, пептид, полипептид или белок также могут дополнительно содержать аминокислоты, отличные от 20 аминокислот, определенных генетическим кодом, или они могут состоять из аминокислот, отличных от 20 аминокислот, определенных генетическим кодом. В частности, пептид, полипептид или белок в контексте настоящего изобретения могут в равной степени состоять из аминокислот, модифицированных естественными процессами, например, процессами посттрансляционного созревания, или химическими процессами, которые хорошо известны специалисту в данной области. Такие модификации детально описаны в литературе. Эти модификации могут появляться в каком-либо месте полипептида: в пептидном скелете, в аминокислотной цепи или даже на карбокси- или аминоконцах. В частности, пептид или полипептид может быть разветвленным в результате убиквитинирования или быть циклическим разветвленным или нет. Такой тип модификации может быть результатом естественных или искусственных посттрансляционных процессов, которые хорошо известны специалисту в данной области. Понятия "пептид", "полипептид", "белок" в контексте настоящего изобретения, в частности, также включают модифицированные пептиды, полипептиды и белки. Например, модификации пептида, полипептида или белка могут включать ацетилирование, ацилирование, АДФ-рибозилирование, амидирование, ковалентную фиксацию нуклеотида или производного нуклеотида, ковалентную фиксацию липида или липидного производного, ковалентную фиксацию фосфатидилинозитола, ковалентное или нековалентное сшивание, циклизация, образование дисульфидной связи, деметилирование, гликозилирование, включая пегилирование, гидроксигилирование, йодирование, метилирование, миристоилирование, окисление, протеолитические процессы, фосфорилирование, пренилирование, рацемизация, сенолоилирование, сульфатирование, добавление аминокислот, например, аргинилирование или убиквитинирование. Такие модификации полностью детально описано в литературе (Creighton

Т. Е. "Proteins Structure and Molecular Properties" 1993, 2e изд., Нью-Йорк; "Post-translational Covalent Modifications of Proteins" 1983, под ред. Johnson B. C, изд. Academic Press, Нью-Йорк; Seifter с соавт. Meth. Enzymol. 182, 1990, 626-646; Rattan с соавт. Ann NY Acad Sci, 663, 1992, 48-62). Соответственно, понятия "пептид", "полипептид", "белок" предпочтительно включают, например, липопептиды, липопро-теины, гликопептиды, гликопротеины и другие.

Предпочтительно, однако, белок, полипептид или пептид представляет собой "классический" пептид, полипептид или белок, причем "классический" пептид, полипептид или белок обычно состоит из аминокислот, выбранных из 20 аминокислот, определяемых генетическим кодом, связанных друг другу обычной пептидной связью.

В контексте настоящего изобретения понятие "первая полипептидная цепь" относится к полипептиду, который должен быть связан со вторым полипептидом ("вторая полипептидная цепь"). В частности, первая и вторая полипептидные цепи связаны через дисульфидную связь. Первая полипептидная цепь может содержать один, два, три тяжелых константных домена антитела. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения он содержит три константных домена тяжелой цепи антитела: CH1, CH2 и CH3 и шарнирную область между CH1 и CH2. Указанные константные домены тяжелой цепи могут быть получены из антитела, которое является мышинным, химерным, синтетическим, гуманизированным или человеческим, а также моноклональным или поликлональным. Первая полипептидная цепь может включать один или несколько переменных доменов, предпочтительно переменные домены тяжелой цепи антитела. В контексте настоящего изобретения понятие "вторая полипептидная цепь" относится к полипептиду, который связан с первым полипептидом ("первой полипептидной цепью"). В частности, первая и вторая полипептидные цепи связаны через дисульфидную связь. Вторая полипептидная цепь может включать константную область CL легкой цепи антитела. Указанная константная область легкой цепи может быть получена из антитела, которое является мышинным, химерным, синтетическим, гуманизированным или человеческим, а также моноклональным или поликлональным. Вторая полипептидная цепь может содержать один или несколько переменных доменов, предпочтительно переменные домены легкой цепи антитела.

В общем, "антитело" является белком, который специфически связывается с антигеном. Обычно антитело имеет уникальную структуру, которая позволяет ему специфически связываться с соответствующим антигеном, но, обычно, антитела имеют сходную структуру и, в частности, также известны под названием "иммуноглобулины" (Ig). В контексте настоящего изобретения понятие "антитело" охватывает различные формы антител, включая, но ими не ограничиваясь, целые антитела, фрагменты антител, в частности антигенсвязывающие фрагменты, антитела человека, химерные антитела, гуманизированные антитела, рекомбинантные антитела и генетически сконструированные антитела (варианты антител или мутантные антитела) до тех пор, пока сохраняются специфические свойства по настоящему изобретению. Хотя описание настоящего изобретения, включающее формулу настоящего изобретения, может в некоторых местах четко относиться к антигенсвязывающему фрагменту (фрагментам), фрагменту (фрагментам) антитела, варианту (вариантам) и/или производному (производным) антитела, подразумевается, что понятие "антитело" включает все категории антител, а именно антигенсвязывающий фрагмент (фрагменты), фрагмент (фрагменты) антитела, вариант (варианты) и производное (производные) антител.

В контексте настоящего изобретения понятия "антигенсвязывающий фрагмент", "фрагмент" и "фрагмент антитела" используют взаимозаменяемо для обозначения какого-либо фрагмента антитела по настоящему изобретению, который сохраняет (i) антигенсвязывающую активность антитела, а также (ii) дополнительную функциональность, обеспечиваемую (дополнительным) функциональным доменом, например, связывающую активность, обеспечиваемую (независимым) сайтом связывания. В антигенсвязывающих фрагментах по настоящему изобретению, специфические свойства сохраняются согласно настоящему изобретению. Как правило, примеры фрагментов антител включают одноцепочечные антитела, Fab, Fab' или F (ab')₂, но ими не ограничиваются. Фрагменты антител могут быть получены из антител методами, которые включают ферментативное расщепление, например, пепсином или папаином, и/или расщеплением дисульфидных связей путем химического восстановления. В другом варианте, фрагменты антител могут быть получены путем клонирования и экспрессии части последовательностей тяжелых или легких цепей. Кроме того, термин "антитело" в контексте настоящего описания включает как антитела, так и их антигенсвязывающие фрагменты.

В настоящем изобретении предполагают, что понятие "антитело человека" включает антитела, имеющие переменные и константные области, производные от последовательностей иммуноглобулина человека. Антитела человека хорошо известны в данной области (van Dijk, M.A. и van de Winkel, 2001, 368-374). Антитела человека могут также формироваться у трансгенных животных (например, мышей), которые после иммунизации могут вырабатывать полный иммунный репертуар или подборку антител человека в отсутствие эндогенной выработки иммуноглобулина. Перенос матрицы гена иммуноглобулина зародышевой линии человека в такую мутантную зародышевую линию мыши приводит к выработке антител человека в ответ на антиген (см., например, Jakobovits A. с соавт., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1993, 2551-2555; Jakobovits A. с соавт., Nature 362, 1993, 255-258; Bruggemann M., с соавт., 1993, 3340). Антитела человека также могут быть получены в библиотеках фагового дисплея (Hoogenboom H.R., Win-

ter G., 227, 1992, 381-388; Marks J.D. с соавт., 222, 1991, 581-597). Методы Cole с соавт. и Voerger с соавт. применимы для получения моноклональных антител человека (Cole с соавт., 1985, 77; и Voerger P. с соавт., 147, 1991, 86-95). Предпочтительно моноклональные антитела человека получают с использованием улучшенной иммортализации клеток EBV-B по описанию в статье Traggiai E. с соавт., Nat Med, 10(8), 2004, 871-875. Понятие "антитело человека" в контексте настоящего изобретения также относится к антителам, которые модифицированы для выработки свойств, соответствующих настоящему изобретению.

Антитела по настоящему изобретению могут быть получены в очищенной форме. Соответственно, антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть очищенным антителом или антигенсвязывающим фрагментом. Обычно антитело может быть представлено в композиции, которая в значительной степени не содержит других полипептидов, например, где менее 90% (по массе), обычно менее 60% и чаще обычно менее 50% композиции состоит из других полипептидов.

В контексте настоящего изобретения понятие "вариабельный домен" (или "вариабельная область", вариабельный домен легкой цепи (VL), вариабельный домен тяжелой цепи (VH)) относится к домену антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который представляет собой N-концевой домен в классических природных антителах, обычно домен, обеспечивающий наибольшую вариабельность в классических природных антителах, и который непосредственно участвует в связывании антитела с антигеном. Обычно домены вариабельных легких и тяжелых цепей человека имеют одинаковую одну и ту же общую структуру, и каждый домен содержит каркасные области (FR), последовательности которых являются широко консервативными (в частности, четыре каркасные области (FR)) и три "гипервариабельные области" или определяющие комплементарность области CDR (в частности, три "гипервариабельные области"/CDR). Каркасные области обычно принимают конформацию β -листа, и CDR могут образовывать петли, соединяющие структуру β -листа. CDR в каждой цепи обычно удерживаются в своей трехмерной структуре каркасными областями и объединяются с CDR из другой цепи сайта связывания антигена.

В контексте настоящего изобретения понятие "гипервариабельная область" относится к аминокислотным остаткам антитела, которые отвечают за связывание антигена. Гипервариабельная область содержит "определяющие комплементарность области" ("CDR"). "Каркасные области" ("FR") представляют собой такие области вариабельных доменов, которые не являются остатками гипервариабельной области, как определено в настоящем документе. Области CDR и FR могут быть определены в соответствии со стандартным определением в публикации Kabat с соавт., 1991. Обычно, в частности в нативных моноспецифических антителах IgG, три CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) расположены непоследовательно в вариабельном домене. Другими словами, CDR на тяжелой и/или легкой цепи могут быть разделены, например, каркасными областями, причем каркасная область (FR) представляет собой область в вариабельном домене, которая является менее "вариабельной", чем CDR. Например, в антителе вариабельный домен (или каждый вариабельный домен, соответственно) может предпочтительно содержать четыре каркасных области, разделенные тремя CDR. В частности, вариабельный домен антитела (вариабельный домен VH или VL легкой или тяжелой цепи) содержит от N- к C-концу домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. CDR на каждой цепи разделены аминокислотами такой каркасной области. Обычно три CDR тяжелой цепи и три CDR присоединенной легкой цепи образуют вместе антигенсвязывающий сайт (активный центр или паратоп). Иначе говоря, поскольку, в частности, в нативных моноспецифических антителах IgG сайты связывания антигена обычно состоят из двух вариабельных доменов, для каждого сайта связывания антигена имеется шесть CDR (тяжелая цепь: CDRH1, CDRH2 и CDRH3; легкая цепь: CDRL1, CDRL2, и CDRL3). Одно антитело, в частности одно нативное моноспецифическое антитело IgG, обычно имеет два (идентичных) сайта связывания антигена и, следовательно, содержит двенадцать CDR (то есть $2 \times$ шесть CDR).

Из-за "мультиспецифичности", то есть различных сайтов связывания антигена, тяжелая цепь и/или легкая цепь мультиспецифических антител, или их антигенсвязывающие фрагменты, могут (каждый) включать более трех CDR, в частности, более трех различных CDR. Например, мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающие фрагменты могут включать, по меньшей мере, два разных вариабельных домена, причем каждый из указанных, по меньшей мере, двух разных вариабельных доменов является производным от разных моноспецифических антител, например, типа IgG. Поскольку такое моноспецифическое антитело обычно содержит три CDR в тяжелой цепи и три CDR в легкой цепи, образующие сайт связывания антигена, мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению может, в частности, содержать три CDR тяжелой цепи первого антитела и три CDR легкой цепи первого антитела, три CDR тяжелой цепи второго антитела и три CDR легкой цепи второго антитела, необязательно три CDR тяжелой цепи третьего антитела и три CDR легкой цепи третьего антитела, и т.д. Таким образом, число CDR, состоящих из тяжелой цепи и/или легкой цепи мультиспецифического антитела, предпочтительно кратно трем, например трем, шести, девяти, двенадцати и т.д. Таким образом, также предпочтительно, чтобы сумма CDR, состоящая как из тяжелой цепи, так и из легкой цепи мультиспецифического антитела, была кратна шести, например шесть, двенадцать, восемнадцать и т.д. Поскольку "сайт связывания антигена" обычно характеризуется CDR, то есть CDRH1, CDRH2, и CDRH3, а также CDRL1,

CDRL2 и CDRL3, в мультиспецифических антителах по настоящему изобретению предпочтительно, чтобы CDR были расположены таким образом, чтобы порядок (например, CDRH1, CDRH2 и CDRH3 и/или CDRL1, CDRL2 и CDRL3, полученный из того же моноспецифического антитела), сохранялся для сохранения сайта связывания антигена, то есть для сохранения способности специфически связываться с определенным сайтом в антигене. Это означает, что, например, порядок CDRH1, CDRH2 и CDRH3, полученных из первого моноспецифического антитела в аминокислотном отрезке, предпочтительно не прерывается каким-либо CDR, производным от второго моноспецифического антитела. Важно, что если мультиспецифическое антитело содержит антигенсвязывающие сайты, производные, по меньшей мере, от двух разных моноспецифических антител, CDR или переменные домены таких моноспецифических антител располагаются в мультиспецифическом антителе согласно настоящему изобретению так, что "антигенный рецептор" каждого моноспецифического антитела, от которого происходят CDR (или переменные области), сохраняется, т.е. сохраняется его способность специфически связываться с определенным сайтом в антигене.

В контексте настоящего изобретения переменным доменом может быть какой-либо переменный домен (в частности, VH и/или VL) природного антитела или переменный домен может быть модифицированным/сконструированным переменным доменом. Модифицированные/сконструированные переменные домены известны в данной области. Обычно переменные домены являются модифицированными/сконструированными для того, чтобы deletировать или добавить одну или несколько функций, например, путем "модифицирования на уровне генов зародышевой линии" ("удаление" соматических мутаций) или путем гуманизирования.

В контексте настоящего изобретения понятие "константные домены" относится к доменам антитела, которые не участвуют непосредственно в связывании антитела с антигеном, но проявляют различные эффекторные функции. Обычно тяжелая цепь включает три или четыре константных домена, в зависимости от класса иммуноглобулина: CH1, CH2, CH3 и, необязательно, CH4 (в направлении от N- к C-концу). Соответственно, константная область тяжелой цепи обычно образуется следующим образом (в направлении от N- к C-концу): CH1 - шарнир (гибкий полипептид, содержащий аминокислоты между первым и вторым константными доменами тяжелой цепи) - CH2 - CH3 (- CH4). Легкая цепь обычно включает только один константный домен, называемый CL, который обычно также формирует константную область легкой цепи. В контексте настоящего изобретения константный домен может представлять собой какой-либо константный домен (в частности, CL, CH1, CH2, CH3 и/или CH4) природного антитела, или константный домен может представлять собой модифицированный/сконструированный константный домен.

Модифицированные/сконструированные константные домены известны в данной области. Обычно константные домены модифицируют/конструируют для удаления или добавления одной или нескольких функций, например, в контексте функциональности области Fc. В зависимости от аминокислотной последовательности константной области тяжелых цепей, антитела или иммуноглобулины делят на классы: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно поделены на подклассы, например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, IgA1 и IgA2. Константные области тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называются α , ϵ , γ и μ соответственно. Антитела по настоящему изобретению предпочтительно относятся к типу IgG.

В целом, антитела могут быть какого-либо изотипа (например, IgA, IgG, IgM, т.е. тяжелая цепь α , γ или μ), но предпочтительнее IgG. В пределах изотипа IgG антитела могут относиться к подклассам IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, причем IgG1 является предпочтительным. Антитела могут иметь легкую цепь K или λ .

В контексте настоящего изобретения понятие "рекомбинантное антитело" включает все антитела, которые не встречаются в природе, например антитела, экспрессируемые с использованием рекомбинантного вектора экспрессии (например, обеспечивающего один или несколько константных доменов), трансфицированного в клетку-хозяина.

Понятие "мультиспецифические" в контексте настоящего изобретения применительно к антителу или его антигенсвязывающего фрагмента означает способность антитела или его антигенсвязывающего фрагмента связываться, по меньшей мере, с двумя разными эпитопами, например, на разных антигенах или на одном и том же антигене. Таким образом, понятия "биспецифический", "триспецифический", "тетраспецифический" и т. д. относятся к числу различных эпитопов, с которыми антитело может связываться. Например, обычные моноспецифические антитела типа IgG имеют два идентичных антигенсвязывающих сайта (паратоп) и, таким образом, могут связываться только с одинаковыми эпитопами (но не с разными эпитопами). Напротив, мультиспецифическое антитело имеет, по меньшей мере, два разных типа паратопов/сайтов связывания и может, таким образом, связываться, по меньшей мере, с двумя различными эпитопами. В настоящем изобретении понятие "паратоп" относится к антигенсвязывающему сайту антитела. Более того, одна "специфичность" может относиться к одному, двум, трем или более идентичным паратомам в одном антителе (фактическое количество паратопов/сайтов связывания в одной отдельной молекуле антитела называется "валентностью"). Например, одно нативное антитело IgG явля-

ется моноспецифическим и двухвалентным, поскольку оно имеет два идентичных паратопа. Соответственно, мультиспецифическое антитело содержит по меньшей мере два (разных) паратопа/ сайта связывания. Таким образом, понятие "мультиспецифические антитела" относится к антителам, имеющим более одного паратопа и способным связываться с двумя или более различными эпитопами. Понятие "мультиспецифические антитела" включает, в частности, биспецифические антитела, подобные описанным выше, а также обычно белок, например антитело, каркасы молекул, которые связываются, в частности, с тремя или более различными эпитопами, то есть антителами с тремя или более паратопами/сайтами связывания.

В частности, мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать два или более паратопов/сайтов связывания, причем некоторые паратопы/сайты связывания могут быть идентичными, таким образом, что все паратопы/сайты связывания антитела принадлежат, по меньшей мере, к двум различным типам паратопов/сайтов связывания и, следовательно, антитело обладает, по меньшей мере, двумя специфичностями. Например, мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может содержать четыре паратопа/сайта связывания, причем каждые два паратопа/сайта связывания идентичны (т.е. имеют одинаковую специфичность), и, таким образом, антитело или его фрагмент является биспецифическим и четырехвалентным (два идентичных паратопа/сайта связывания для каждой из двух специфичностей). Таким образом, "одна специфичность" относится, в частности, к одному или нескольким паратопам/сайтам связывания, проявляющим одинаковую специфичность (что обычно означает, что такие один или несколько паратопов/сайтов связывания идентичны), и, таким образом, "две специфичности" могут быть реализованы двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью или более паратопами/сайтами связывания, при условии, что они относятся только к двум специфичностям. В другом варианте осуществления настоящего изобретения мультиспецифическое антитело может содержать единственный паратопа/сайт связывания для каждой (по меньшей мере для двух) специфичности, то есть мультиспецифическое антитело содержит в общей сложности по меньшей мере два паратопа/сайта связывания. Например, биспецифическое антитело содержит единственный паратопа/сайт связывания для каждой из двух специфичностей, то есть антитело содержит в целом два паратопа/сайта связывания. Также предпочтительно, чтобы антитело содержало два (идентичных) паратопа/сайта связывания для каждой из двух специфичностей, то есть антитело содержит всего четыре паратопа/сайта связывания. Предпочтительно антитело содержит три (идентичных) паратопа/сайта связывания для каждой из двух специфичностей, то есть антитело содержит всего шесть паратопов/сайтов связывания.

В контексте настоящего изобретения понятие "антиген" относится к какому-либо структурному веществу, которое служит мишенью для рецепторов адаптивного иммунного ответа, в частности, в качестве мишени для антител, рецепторов Т-клеток и/или рецепторов В-клеток. Понятие "эпитоп", также называемый "антигенная детерминанта", является частью (или фрагментом) антигена, который распознается иммунной системой, в частности антителами, рецепторами Т-клеток и/или рецепторами В-клеток. Таким образом, один антиген содержит, по меньшей мере, один эпитоп, то есть один антиген содержит один или несколько эпитопов. Антигеном может быть (i) пептид, полипептид или белок, (ii) полисахарид, (iii) липид, (iv) липопротеин или липопептид, (v) гликолипид, (vi) нуклеиновая кислота или (vii) низкомолекулярное лекарственное средство или токсин. Таким образом, антиген может представлять собой пептид, белок, полисахарид, липид, их комбинацию, включающую липопротеины и гликолипиды, нуклеиновую кислоту (например, ДНК, мРНК, кшРНК, антисмысловые олигонуклеотиды, ложную ДНК, плазмиду) или небольшую молекулу лекарственное средство (например, циклоспорин А, паклитаксел, доксорубин, метотрексат, 5-аминолевулиновая кислота) или какая-либо их комбинация. Предпочтительно, антиген выбран из (i) пептида, полипептида или белка, (ii) полисахарида, (iii) липида, (iv) липопротеина или липопептида и (v) гликолипида; более предпочтительно, антиген является пептидом, полипептидом или белком.

В контексте настоящего изобретения понятие "сайт связывания антигена" означает часть антитела, которая включает область, специфически связывающуюся и комплементарную части антигена или всему антигену. Если антиген большой, антитело может связываться только с определенной частью антигена, которая называется "эпитоп". Обычно, два переменных домена, в частности переменный домен тяжелой цепи VH и переменный домен легкой цепи VL, объединяются с образованием одного сайта связывания антигена. В частности, сайт связывания антигена образован тремя CDR переменного домена тяжелой цепи и тремя CDR переменного домена легкой цепи, то есть шестью CDR согласно описанному выше.

Понятие "специфически связывающийся" и аналогичные понятия не подразумевают неспецифическое прилипание.

Понятие "линкер" (или "спейсер") в настоящем изобретении относится к пептиду, адаптированному для соединения различных доменов полипептида или белка, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Линкеры известны в данной области техники и подробно описаны, например, Reddy Chichili V.P., Kumar V. и Sivaraman J., 2013). Обычно линкеры разрабатывают таким образом, чтобы они не влияли на функциональность. В частности, линкер не связывается специфически с мишенью. Линкер может содержать какие-либо аминокислоты, причем аминокислоты глицин (G) и серин (S) могут быть

предпочтительными. Предпочтительно, линкер состоит из аминокислот глицина (G) и серина (S) ("GS-линкер"). Если два или более линкеров включены в один полипептид или белок, линкеры могут быть одинаковыми или отличаться друг от друга. Кроме того, линкер может состоять из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот.

В контексте настоящего изобретения понятие "молекула нуклеиновой кислоты или нуклеиновая кислота" означает молекулы ДНК и молекулы РНК. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двухцепочечной.

В контексте настоящего изобретения понятия "клетка", "линия клеток" и "культура клеток" используют взаимозаменяемо, и все такие обозначения означают потомство. Таким образом, слова "трансформанты" и "трансформированные клетки" включают первичную субъектную клетку и полученные из нее культуры без учета количества пересевов. Очевидно, что все потомство может быть не в полной мере идентичным по ДНК из-за преднамеренных или случайных мутаций. Включены варианты потомства, которые имеют ту же функцию или биологическую активность, которые были отобраны в первоначально трансформированной клетке. Там, где подразумеваются разные обозначения, это будет ясно из контекста.

В контексте настоящего изобретения понятие "вариант последовательности" (или просто "вариант") означает какое-либо изменение определенной последовательности, в результате чего эта измененная последовательность является какой-либо из последовательностей, перечисленных в "Таблицы последовательностей и номера SEQ ID" (перечень последовательностей), то есть последовательностей от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 133. Таким образом, понятие "вариант последовательности" подразумевает варианты нуклеотидной последовательности и варианты аминокислотной последовательности. Следует отметить, что варианты последовательности по настоящему изобретению являются, в частности, вариантами функциональной последовательности, то есть вариантами последовательности, поддерживающей биологическую функцию, например, последовательности антитела. Предпочтительные поддерживаемые биологические функции в контексте настоящего изобретения включают (i) связывание антитела с его антигенами и (ii) функцию, обеспечиваемую (дополнительным) функциональным доменом, например, связывание (независимого) сайта связывания со своей мишенью.

Таким образом, предпочтительные варианты последовательности представляют собой варианты функциональной последовательности, имеющие по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, при по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности со сравниваемой последовательностью. В контексте настоящего изобретения фраза "вариант функциональной последовательности, имеющий по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, при по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности со сравниваемой функциональной последовательностью" означает, что вариант функциональной последовательности имеет, по меньшей мере, 70% идентичности последовательности, предпочтительно, по меньшей мере, 75% идентичности последовательности, предпочтительно, по меньшей мере, 80% идентичности последовательности, более предпочтительно, по меньшей мере, 85% идентичности последовательности, более предпочтительно, по меньшей мере, 88% идентичности последовательности, еще более предпочтительно, по меньшей мере, 90% идентичности последовательности, еще более предпочтительно, по меньшей мере, 92% идентичности последовательности, и еще более предпочтительно, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности, еще более предпочтительно, по меньшей мере, 96% идентичности последовательности, особенно предпочтительно, по меньшей мере, 97% идентичности последовательности, особенно предпочтительно, по меньшей мере, 98% идентичности последовательности и наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности с соответствующей сравниваемой функциональной последовательностью.

Понятие "вариант последовательности" включает, в частности, такие варианты, которые содержат мутации и/или замены по сравнению со сравниваемой последовательностью. К вариантам последовательности фрагмента Fc относятся, но ими не ограничиваются, те последовательности, которые имеют замену L на A в положении CH2 4, CH2 5 или обе эти замены.

Идентичность последовательности обычно рассчитывают относительно полной длины сравниваемой последовательности (то есть последовательности, указанной в изобретении). В настоящем изобретении процент идентичности последовательности может быть определен, например, с помощью BLAST, используя по умолчанию параметры NCBI (Национальный центр биотехнологической информации; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) [Blosum 62 матрица; штраф на внесение делеции в выравнивание = 11 и штраф на продолжение делеции = 1].

В контексте настоящего изобретения понятие "вариант нуклеотидной последовательности" означает вариант измененной последовательности, в которой один или несколько нуклеотидов относительно сравниваемой последовательности делетированы или замещены, или один или несколько нуклеотидов инсертированы в последовательность контрольной нуклеотидной последовательности. Нуклеотиды в

настоящем изобретении обозначают общепринятым однобуквенным обозначением (А, С, G или Т). Из-за вырожденности генетического кода "вариант нуклеотидной последовательности" может либо привести к изменению соответствующей эталонной аминокислотной последовательности, то есть "варианта аминокислотной последовательности", либо нет. Предпочтительными вариантами последовательностей являются такие варианты нуклеотидных последовательностей, которые не приводят к вариантам аминокислотных последовательностей (молчащие мутации), но другие мутации, которые нельзя назвать молчащими, также подразумеваются в настоящем изобретении, в частности мутантные нуклеотидные последовательности, которым соответствуют аминокислотные последовательности, обладающие идентичностью со сравниваемой последовательностью, по меньшей мере, на 80%, предпочтительно, по меньшей мере, на 90%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 95%.

Понятие "вариант аминокислотной последовательности" имеет измененную последовательность, в которой одна или несколько аминокислот в сравниваемой последовательности делетированы или замещены, или одна или несколько аминокислот инсертированы в последовательность сравниваемой аминокислотной последовательности. В результате изменений вариант аминокислотной последовательности, по меньшей мере, на 80% идентичен сравниваемой последовательности, предпочтительно, по меньшей мере, на 90%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 95%, наиболее предпочтительно, по меньшей мере, на 99% вариант аминокислотной последовательности идентичен сравниваемой последовательности. Варианты последовательностей, которые по меньшей мере на 90% идентичны, содержат не более 10 изменений, т.е. какой-либо комбинаций делеций, инсерций или замещений на 100 аминокислот сравниваемой последовательности.

Хотя допустимо наличие неконсервативных замещений аминокислот, предпочтительно, чтобы они были консервативными аминокислотными замещениями, в которых замещенная аминокислота имеет сходные структурные или химические свойства с соответствующей аминокислотой в сравниваемой последовательности. Примерами являются консервативные аминокислотные замещения, представляющие замещение одной алифатической или гидрофобной аминокислоты, например, аланина, валина, лейцина или изолейцина, другой гидрофобной аминокислотой; замещение одной гидроксилсодержащей аминокислоты, например, серина и треонина, другой гидроксилсодержащей аминокислотой; замещение одного кислотного остатка, например, глутаминовой кислоты или аспарагиновой кислоты, другим кислотным остатком; замещение одного амид-содержащего остатка, например, аспарагина и глутамина, на другой амид-содержащий остаток; замена одного ароматического остатка, например фенилаланина и тирозина, на другой ароматический остаток; замещение одного основного остатка, например лизина, аргинина и гистидина, другим основным остатком; и замещение одной низкомолекулярной аминокислоты, например аланина, серина, треонина, метионина или глицина, другой низкомолекулярной аминокислотой.

К инсерциям аминокислотной последовательности относятся амино- и/или карбокси-концевые гибриды, варьирующие по длине от одного остатка до полипептидов, содержащих сотни и более остатков, а также инсерций внутри последовательности одной или многих аминокислотных остатков. К примерам концевых инсерций относятся гибриды с N- или C-конца аминокислотной последовательности репортерной молекулы или фермента.

Важно отметить, что изменения в вариантах последовательности не отменяют функциональности соответствующей контрольной последовательности, в данном случае, например, функциональности последовательности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которая заключается в связывании с его антигенами, и/или дополнительной функциональности, обеспечиваемой функциональным доменом, например, для связывания с мишенью (независимого) сайта связывания. Подходы к определению нуклеотидов и аминокислотных остатков, которые могут быть замещены, инсертированы или делетированы без нарушения такой функциональности, основаны на использовании компьютерных программ, хорошо известных в данной области.

В контексте настоящего изобретения последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, "производная от" обозначенной нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, относится к происхождению нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка. Предпочтительно последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, которая происходит от конкретной последовательности, имеет аминокислотную последовательность, которая по существу идентична той последовательности или ее части, из которой она получена, причем, будучи "по существу идентичной", включает варианты последовательности, согласно описанному выше. Предпочтительно последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, которая производна от конкретного пептида или белка, происходит из соответствующего домена в конкретном пептиде или белке. Таким образом, понятие "соответствующая" относится, в особенности, к одной и той же функциональности. Например, "внеклеточный домен" соответствует другому "внеклеточному домену" (другого белка), или "трансмембранный домен" соответствует другому "трансмембранному домену" (другого белка). "Соответствующие" части пептидов, белков и нуклеиновых кислот легко могут быть определены специалистом в данной области. Аналогичным образом последовательности, "производные от" другой последовательности, обычно легко идентифицируют специалисты в данной области, поскольку имеют свое происхождение от этой, другой, последовательности.

Предпочтительно, последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, производная от другой нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, может быть идентичной исходной нуклеиновой кислоте, пептиду, полипептиду или белку (производной которого она является). Однако последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, полученная из другой нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, может также иметь одну или несколько мутаций относительно исходной нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка (производной которого она является), в частности, последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, полученная из другой нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, может представлять собой вариант функциональной последовательности, согласно описанному выше, исходной нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка (производной которого она является). Например, в пептиде/белке один или несколько аминокислотных остатков могут быть замещены другими аминокислотными остатками, или один или несколько аминокислотных остатков могут быть инсертированы или делетированы.

В контексте настоящего изобретения понятие "мутация" относится к изменению в последовательности нуклеиновой кислоты и/или аминокислотной последовательности по сравнению с контрольной последовательностью, например, соответствующей геномной последовательностью. Мутация, например, по сравнению с геномной последовательностью может быть, например, (природной) соматической мутацией, спонтанной мутацией, индуцированной мутацией, например, вызванной ферментами, химическими веществами или радиацией, или мутацией, полученной сайт-направленным мутагенозом (методы молекулярной биологии для внесения специфических и направленных изменений в последовательности нуклеиновой кислоты и/или в аминокислотной последовательности). Таким образом, также следует учитывать, что понятия "мутация" или "мутирование" связаны с получением мутаций физическим методом, например, в последовательности нуклеиновой кислоты или в аминокислотной последовательности. К мутациям относят замещения, делеции или инсерции одного или нескольких нуклеотидов или аминокислот, а также инверсии нескольких (двух или более) последовательных нуклеотидов или аминокислот. Для достижения мутации в аминокислотной последовательности предпочтительно, чтобы мутация могла быть произведена в нуклеотидной последовательности, кодирующей указанную аминокислотную последовательность, для экспрессии (рекомбинантного) мутировавшего полипептида. Мутация может быть достигнута, например, изменением методом сайт-направленного мутагеноза, кодона молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующего одну аминокислоту, чтобы получить кодон, кодирующий другую аминокислоту, или путем синтеза варианта последовательности, например, зная нуклеотидную последовательность молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, и создавая синтез молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую вариант полипептида, без необходимости мутировать один или несколько нуклеотидов молекулы нуклеиновой кислоты.

В контексте настоящего изобретения понятие "заболевание" в целом является синонимом и используется взаимозаменяемо с понятиями "расстройство" и "состояние" (состоянии здоровья), поскольку все они отражают отклонение от нормы состояния организма человека или животного или одной из его частей, что нарушает нормальное функционирование, обычно проявляется в различии признаков и симптомов и приводит к уменьшению продолжительности или качества жизни человека или животного.

Несколько документов цитируются в тексте настоящего изобретения. Сущность каждого из них (включая все патенты, патентные заявки, научные публикации, спецификации производителя, инструкции и другие документы), упоминаемых выше или ниже в тексте, полностью включена в настоящее описание в качестве ссылок на их сущность. Ничто в настоящем документе не должно быть истолковано как признание того, что изобретение не имеет права предшествовать такому раскрытию в силу предшествующего изобретения.

Следует учитывать, что настоящее изобретение не ограничено конкретной методологией, протоколами и реагентами, указанными в настоящем описании, поскольку они могут варьироваться. Также следует учитывать, что используемая в настоящем изобретении терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения и не предназначена для ограничения рамок его охвата, ограниченных только прилагаемой формулой изобретения. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном описании, имеют значения, известные специалистам в данной области.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты с функциональными доменами в области изгиба

Первый объект настоящего изобретения предусматривает антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, включающее первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, причем первая полипептидная цепь включает в направлении от N- к C-концу

- (i) один или несколько переменных доменов,
- (ii) (дополнительный) функциональный домен, и

(iii) один или несколько константных доменов, причем вторая полипептидная цепь включает в направлении от N- к C-концу

(iv) один или несколько переменных доменов, формирующих сайты связывания антигена, с одним или несколькими переменными доменами (i) первой полипептидной цепи,

(v) необязательный (дополнительный) функциональный домен, и

(vi) один или несколько константных доменов, отличающиеся тем, что (дополнительный) функциональный домен (ii) первой полипептидной цепи не включает фрагмента второй полипептидной цепи и необязательный (дополнительный) функциональный домен (v) второй полипептидной цепи не включает фрагмента первой полипептидной цепи.

Настоящее изобретение основано на неожиданном установленном факте, заключающемся в том, что (дополнительный) функциональный домен может быть инсертирован в область изгиба антитела, то есть между переменным доменом и самым N-концевым константным доменом, в частности CH1 или CL. На фиг. 1А показано классическое природное антитело с областью изгиба, обозначенной стрелками. Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что антитела, измененные в области изгиба для придания такого дополнительного функционального домена, могут, например, одновременно связываться (1) с антигеном, на который нацелены их переменные домены, и (2) с дополнительной мишенью, на которую нацелен сайт связывания, интродуцированный в область изгиба антитела, что показано в примерах настоящего описания. В отличие от предшествующего уровня техники, согласно которому форматы мультиспецифических антител получают дополнительные сайты связывания либо заменой пары тяжелой/легкая цепь другой парой тяжелой/легкая цепь с отличной специфичностью (как в описанных выше форматах мультиспецифических антител IgG, которые часто бывают одновалентными для каждой специфичности) или путем присоединения дополнительных сайтов связывания к N- или C-концам тяжелых или легких цепей (как в описанных выше форматах антител IgG), в антителах по настоящему изобретению дополнительный функциональный домен, например дополнительный сайт связывания (специфичность) инсертируют в тяжелую и/или легкую цепь, а именно в область сгиба. Неожиданно было установлено, что N-конец переменного домена (например, VH) инсертированного функционального домена, например сайта связывания, все еще образует в полной мере функциональный сайт связывания антигена с соответствующим переменным доменом другой полипептидной цепи (например, VL) - даже если другая полипептидная цепь является немодифицированной в области сгиба. То же самое относится и к мультиспецифическим антителам: несмотря на встроенный функциональный домен, N-конец переменного домена (доменов) встроенного функционального домена все еще ассоциируется с соответствующими переменными доменами в другой полипептидной цепи с образованием функциональных сайтов связывания антигена (например, VH1 -VH2 в одной полипептидной цепи с VL1 - VL2 в другой полипептидной цепи и т.д.).

Таким образом, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты в соответствии с настоящим изобретением называются молекулы Ig "с инсерцией в область изгиба" ("In-Elbow-Insert (IEI-Ig)"). Значимость результатов, полученных авторами настоящего изобретения, заключается в том, что оно позволяет получать множество различных новых форматов антител, например, показанных на фиг. 1. Антитела IEI-Ig и их антигенсвязывающие фрагменты в соответствии с настоящим изобретением могут быть либо основаны на классических природных антителах, как показано на фиг. 1Б, либо они могут быть объединены с другими (мультиспецифическими) форматами антител для получения новых форматов антител с еще большей специфичностью, что отражено на фиг. 1В.

Например, чтобы получить антитело по настоящему изобретению, классическое моноспецифическое антитело, предпочтительно моноклональное антитело человека, может служить в качестве "каркаса" антитела, и дополнительный функциональный домен, такой как сайт связывания, инсертируют в область сгиба (т.е. между переменным и крайним N-концевым константным доменом, в частности, C-концом переменного домена и N-концом CH1 и/или CL, соответственно) тяжелой цепи и/или легкой цепи каркасного антитела. В других примерах фрагменты классического моноспецифического антитела, предпочтительно фрагменты моноклонального антитела человека, которые содержат (i) по меньшей мере две полипептидные цепи, такие как тяжелая и легкая цепь, и (ii) в каждой полипептидной цепи, по меньшей мере, переменный домен и константный домен могут служить в качестве "каркасного антитела", и функциональный домен, например, сайт связывания, инсертируют в область сгиба первой и/или второй полипептидной цепи фрагмента каркасного антитела. К предпочтительным примерам таких фрагментов антител, которые можно использовать в качестве каркаса для получения антитела согласно настоящему изобретению путем инсерции функционального домена, например, сайта связывания, в область изгиба, включают Fab, Fab' и F(ab')₂. Более того, какое либо рекомбинантное антитело или его фрагмент, например, мультиспецифическое, в частности биспецифическое, антитело или его фрагмент, которые содержат (i) по меньшей мере две полипептидные цепи, такие как тяжелая и легкая цепь, и (ii) в каждой полипептидной цепи, по меньшей мере, переменный домен и константный домен, также могут служить в качестве "каркасного" антитела, и функциональный домен, например, сайт связывания, инсертируют в область сгиба первой и/или второй полипептидной цепи рекомбинантного каркасного антитела (фрагмента).

К примерам антител, которые могут выступать в качестве каркасных антител, относят антитела GCE536 (VH: SEQ ID NO: 1, VL: SEQ ID NO: 2, константная область тяжелой цепи: SEQ ID NO: 3, константная область легкой цепи: SEQ ID NO: 4; Piccoli L. с соавт., Nature communications 6, 7375 (2015)); C1 (см. пример 1; VH: SEQ ID NO: 5, VL: SEQ ID NO: 6, константная область тяжелой цепи: SEQ ID NO: 3,

константная область легкой цепи: SEQ ID NO: 7); C1b (VH: SEQ ID NO: 8, VL: SEQ ID NO: 9, константная область тяжелой цепи: SEQ ID NO: 3, константная область легкой цепи: SEQ ID NO: 4) и FI174 (VH: SEQ ID NO: 10, VL: SEQ ID NO: 11, константная область тяжелой цепи: SEQ ID NO: 3, константная область легкой цепи: SEQ ID NO: 4; Pappas L. с соавт., Nature 516, 418-422 (2014)).

Антитело в соответствии с настоящим изобретением или его антигенсвязывающий фрагмент также можно получить методами клонирования, например, коммерчески доступными IgG-векторами или наборами векторов, которые включают константные домены/области, например, тяжелой и/или легкой цепи. Например, соответствующие переменные домены, например, переменный домен тяжелой и легкой цепей VH и VL, первого антитела могут быть клонированы в соответствующих полипептидных цепях, что обеспечивается вектором; и, кроме того, дополнительный функциональный домен может быть клонирован в первую и/или вторую полипептидную цепь таким образом, что он располагается между (крайним С-концевым) переменным доменом и (крайним N-концевым) константным доменом, то есть в области сгиба.

Первая и/или вторая полипептидная цепь антитела или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением содержит (дополнительный) функциональный домен. В частности, "функциональный домен" является пептидом или полипептидом, который связан с соседними доменами полипептидной цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента (обычной) пептидной связью. В частности, N-конец (дополнительного) функционального домена связан с С-концом (крайним С-концом) переменного домена, а С-конец (дополнительного) функционального домена связан с N-концом (крайним N-концом) константного домена пептидной связью.

Обычно понятие "функциональный домен" относится к функциональной единице, например, антитела или антигенсвязывающего фрагмента. Как правило, функциональный домен обеспечивает белок, например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, с (дополнительной) функциональностью. Соответственно, (дополнительный) функциональный домен обычно содержит все аминокислоты/последовательности, необходимые для обеспечения (дополнительной) функции. В частности, (дополнительный) функциональный домен (ii) первой полипептидной цепи не содержит фрагмента второй полипептидной цепи, а необязательный (дополнительный) функциональный домен (v) второй полипептидной цепи не содержит фрагмента первой полипептидной цепи. То есть вторая полипептидная цепь (в частности, какой-либо ее фрагмент, например, даже одна аминокислота) не требуется и не участвует в (функциональности) (дополнительного) функционального домена первой полипептидной цепи. Кроме того, если вторая полипептидная цепь также содержит (дополнительный) функциональный домен, первая полипептидная цепь (в частности, какой-либо ее фрагмент, например, даже одна аминокислота) не требуется и не участвует в (функциональности) (дополнительного) функционального домена второй полипептидной цепи. Все аминокислоты (аминокислотные последовательности), необходимые или вовлеченные в участие в функциональности (дополнительного) функционального домена первой и/или второй полипептидной цепи, содержатся в (дополнительном) функциональном домене самой этой полипептидной цепи - фрагменты или аминокислоты другой полипептидной цепи не требуются/не вовлечены. Соответственно (дополнительный) функциональный домен отличается, например, от сайта связывания антигена, сформированного переменным доменом первой полипептидной цепи вместе с переменным доменом второй полипептидной цепи. То есть (дополнительный) функциональный домен отличается, например, от антигенсвязывающего сайта, образованного переменными доменами двух разных полипептидных цепей (однако (дополнительный) функциональный домен по-прежнему может содержать сайт связывания антигена - если включенные переменные домены расположены на одной полипептидной цепи, что подробнее описано ниже).

Особенно предпочтительно (дополнительный) функциональный домен первой и/или второй полипептидной цепи содержит или состоит из Ig-подобного домена; например, Ig-подобный домен белка или (поли)пептида, например, в примере ниже. Основная структура молекул иммуноглобулина (Ig) представляет собой тетрамер из двух легких цепей и двух тяжелых цепей, связанных дисульфидными связями. Существует два типа легких цепей: каппа и лямбда, каждая из которых состоит из константного домена (CL) и переменного домена (VL). Существует пять типов тяжелых цепей: альфа, дельта, эpsilon, гамма и мю, все они состоят из переменного домена (VH) и трех (в альфа, дельта и гамма) или четырех (в эpsilon и мю) константных доменов (от CH1 до CH4). Молекулы Ig являются высокомолекулярными белками, в которых переменные и константные домены имеют четкие фрагменты консервативных последовательностей. Домены в Ig и Ig-подобных молекулах сгруппированы в четыре типа: V-набор (переменный), C1-набор (константный-1), C2-набор (константный-2) и I-набор (промежуточный). Структурные исследования показали, что эти домены имеют общую базовую структуру бета-сэндвичей по типу греческий ключ, причем разные типы отличаются количеством нитей в бета-листах, а также по последовательности. Иммуноглобулин-подобные домены, которые связаны как по последовательности, так и по структуре, могут быть обнаружены в нескольких различных белковых семействах. Ig-подобные домены участвуют в разнообразных функциях, включая распознавание клеток друг другом, рецепторы клеточной поверхности, мышечной структуре и иммунной системе.

К предпочтительным примерам Ig-подобных доменов относят Ig-подобные домены какого-либо из

следующих белков или (поли)пептидов: A1BG (альфа-1-В гликопротеин), ACAM, ADAMTSL1 (ADAMTS-подобный 1), ADAMTSL3 (ADAMTS-подобный 3), AGER (специфический рецептор усовершенствованных конечных продуктов гликозилирования), ALCAM (молекулы клеточной адгезии активированных лейкоцитов - activated leukocyte cell adhesion molecule), ALPK3 (альфа киназа 3), AMIG01 (молекула адгезии с Ig-подобным доменом 1), AMIGO2 (молекула адгезии с Ig-подобным доменом 2), AMIGO3 (молекула адгезии с Ig-подобным доменом 3), AXL (AXL рецептор тирозинкиназы), BCAM (молекула адгезии базальных клеток (группа крови Лютерана)), BOC (BOC ассоциированная клеточная адгезия, регулируемая онкогеном), BSG (базиджин (группа крови Ok)), BTLA (ассоциированных с В и Т лимфоцитами), C10orf72, C20orf102, CADM1 (молекула клеточной адгезии 1), CADM3 (молекула клеточной адгезии 3), CADM4 (молекула клеточной адгезии 4), CCDC141 (содержащий домен спиральной катушки 141), CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD22, CD33, CD47, CD48, CD80, CD84, CD86, CD96, CD101, CD160, CD200, CD244, CD276, CDON (ассоциированная клеточная адгезия, регулируемая онкогеном), CEACAM1 (молекула клеточной адгезии, связанная с карциноэмбриональным антигеном 1), CEACAM5 (молекула клеточной адгезии, связанная с карциноэмбриональным антигеном 5), CEACAM6 (молекула клеточной адгезии, связанная с карциноэмбриональным антигеном 6), CEACAM7 (молекула клеточной адгезии, связанная с карциноэмбриональным антигеном 7), CEACAM8 (молекула клеточной адгезии, связанная с карциноэмбриональным антигеном 8), CEACAM16 (молекула клеточной адгезии, связанная с карциноэмбриональным антигеном 16), CEACAM18 (молекула клеточной адгезии, связанная с карциноэмбриональным антигеном 18), CEACAM20 (молекула клеточной адгезии, связанная с карциноэмбриональным антигеном 20), CEACAM21 (молекула клеточной адгезии, связанная с карциноэмбриональным антигеном 21), СНЫ (L1-подобная молекула клеточной адгезии), CILP (белок промежуточного слоя хряща), CILP2 (белок промежуточного слоя хряща 2), CLMP (CXADR-подобный мембранный белок), CNTFR ((рецептор цилиарного нейротрофического фактора), CNTN1 (контактин 1), CNTN2 (контактин 2), CNTN3 (контактин 3), CNTN4 (контактин 4), CNTN5 (контактин 5), CNTN6 (контактин 6), CSF1R (рецептор колониестимулирующего фактора 1), CXADR (CXADR, Ig-подобная молекула клеточной адгезии), DSCAM (DS молекула клеточной адгезии), DSCAML1 (DS cell adhesion molecule like 1 - молекула, подобная DS молекуле клеточной адгезии, 1), EMB (embigin), ESAM (молекула адгезии эндотелиальных клеток), FUR (F11 рецептор), FAIM3, FCMR (Fc фрагмент рецептора IgM), HMCN1 (гемицентин 1), HMCN2 (гемицентин 2), FCAR (Fc фрагмент рецептора IgA), FCER1A (Fc фрагмент IgE рецептора Ia), FCGR1A (Fc фрагмент IgG рецептора Ia), FCGR1B (Fc фрагмент IgG рецептора Ib), FCGR1CP (Fc фрагмент IgG рецептора Ic, псевдоген), FCGR2A (Fc фрагмент IgG рецептора IIa), FCGR2B (Fc фрагмент IgG рецептора IIb), FCGR2C (Fc фрагмент IgG рецептора IIc), FCGR3A (Fc фрагмент IgG рецептора IIIa), FCGR3B (Fc фрагмент IgG рецептора IIIb), FCRH1, FCRH3, FCRH4, FCRL1 (Fc рецептор-подобный белок 1), FCRL2 (Fc рецептор-подобный белок 2), FCRL3 (Fc рецептор-подобный белок 3), FCRL4 (Fc рецептор-подобный белок 4), FCRL5 (Fc рецептор-подобный белок 5), FCRL6 (Fc рецептор-подобный белок 6), FCRLA (Fc рецептор-подобный белок A), FCRLB (Fc receptor like B), FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FGFRL1, FLT1 (fms-подобная тирозинкиназа 1), FLT3 (fms-подобная тирозинкиназа 3), FLT4 (fms-подобная тирозинкиназа 4), FSTL4 (фоллистатин-подобный 4), FSTL5 (фоллистатин-подобный 5), GP6 (гликопротеин VI тромбоцитов), GPA33 (glycoprotein A33), GPR116, GPR125, ADGRF5 (G-белок адгезии сопряженный рецептор F5), ADGRA2 (G-белок адгезии сопряженный рецептор A2), hEMMPRIN, HEPACAM (молекула адгезии печеночных и глиальных клеток), HEPACAM2 (представитель 2 семейства HEPACAM), HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DQB, HLA-DQB1, HNT, HSPG2 (протеогликан сульфата гепарана 2), HYST2477, ICAM1 (молекула межклеточной адгезии 1), ICAM2 (молекула межклеточной адгезии 2), ICAM3 (молекула межклеточной адгезии 3), ICAM4 (молекула межклеточной адгезии 4 (группа крови Ландштейнер-Винер)), ICAM5 (молекула межклеточной адгезии 5), DCC (DCC нетрин-1 рецептор), NEO1 (неогенин1), IGHA1, IGHD, IGHE, IGDC4 (представитель надсемейства иммуноглобулина DCC 4), IGLON5 (представитель семейства IgLON 5), IGSF1 (представитель надсемейства иммуноглобулина 1), IGSF2 (представитель надсемейства иммуноглобулина 2), IGSF3 (представитель надсемейства иммуноглобулина 3), IGSF5 (представитель надсемейства иммуноглобулина 5), IGSF9 (представитель надсемейства иммуноглобулина 9), IGSF9B (представитель надсемейства иммуноглобулина 9B), IGSF10 (представитель надсемейства иммуноглобулина 10), IGSF11 (представитель надсемейства иммуноглобулина 11), IGSF21 (представитель надсемейства иммуноглобулина 21), IGSF23 (представитель надсемейства иммуноглобулина 23), IL1R1 (рецептор интерлейкина 1 типа 1), IL1R2 (рецептор интерлейкина 1 типа 2), IL1RAP (связанный с рецептором интерлейкина 1 белок), IL1RAPL1 (связанный с рецептором интерлейкина 1 белок - подобный белок 1), IL1RAPL2 (связанный с рецептором интерлейкина 1 белок - подобный белок 2), IL1RL1 (интерлейкин 1 рецептор - подобный белок 1), IL1RL2 (интерлейкин 1 рецептор - подобный белок 2), IL6R (рецептор интерлейкина 6), IL11RA (субъединица альфа рецептора интерлейкина 11), IL12B (интерлейкин 12B), IL18BP (интерлейкин 18 - связывающий белок), IL18R1 (рецептор 1 интерлейкина 18), IL18RAP (белок, связанный с рецептором интерлейкина 18), ISLR2 (надсемейство иммуноглобулинов, содержащих богатый лейцином повтор, 2), JAM2 (связывающая молекула адгезии 2), JAM3 (связывающая молекула адгезии 3), KDR (домен -вставка рецептора киназы), KIR-123FM, KIR2DL1 (иммуноглобулин-подобный рецептор клетки-киллера, два домена Ig и

длинный цитоплазматический хвост 1), KIR2DL2 (иммуноглобулин-подобный рецептор клетки-киллера, два домена Ig и длинный цитоплазматический хвост 2), KIR2DL3 (иммуноглобулин-подобный рецептор клетки-киллера, два домена Ig и длинный цитоплазматический хвост 3), KIR2DL4 (иммуноглобулин-подобный рецептор клетки-киллера, два домена Ig и длинный цитоплазматический хвост 4), KIR2DL5A (иммуноглобулин-подобный рецептор клетки-киллера, два домена Ig и длинный цитоплазматический хвост 5A), KIR2DL5B (иммуноглобулин-подобный рецептор клетки-киллера, два домена Ig и длинный цитоплазматический хвост 5B), KIR2DLX, KIR2DS1 (иммуноглобулин-подобный рецептор клетки-киллера, два домена Ig и короткий цитоплазматический хвост 1), KIR2DS2 (иммуноглобулин-подобный рецептор клетки-киллера, два домена Ig и короткий цитоплазматический хвост 2), KIR2DS3 (иммуноглобулин-подобный рецептор клетки-киллера, два домена Ig и короткий цитоплазматический хвост 3), KIR2DS4 (иммуноглобулин-подобный рецептор клетки-киллера, два домена Ig и короткий цитоплазматический хвост 4), KIR2DS5 (иммуноглобулин-подобный рецептор клетки-киллера, два домена Ig и короткий цитоплазматический хвост 5), kir3d, KIR3DL1 (иммуноглобулин-подобный рецептор клетки-киллера, три домена Ig и длинный цитоплазматический хвост 1), KIR3DL2 (иммуноглобулин-подобный рецептор клетки-киллера, три домена Ig и длинный цитоплазматический хвост 2), KIR3DL3 (иммуноглобулин-подобный рецептор клетки-киллера, три домена Ig и длинный цитоплазматический хвост 3), KIR3DP1 (иммуноглобулин-подобный рецептор клетки-киллера, три Ig-домена псевдогена 1), KIR3DS1 (иммуноглобулин-подобный рецептор клетки-киллера, три домена Ig и короткий цитоплазматический хвост 1), KIR3DX1 (иммуноглобулин-подобный рецептор клетки-киллера, три домена Ig X1), KIRREL1 (kirge-подобная из семейства нефрина молекула адгезии 1), KIRREL2 (kirge-подобная из семейства нефрина молекула адгезии 2), KIRREL3 (kirge-подобная из семейства нефрина молекула адгезии 3), KIT (KIT протоонкогенный рецептор тирозинкиназы), L1CAM, LAG3 (активатор лейкоцитов 3), LAIR1 (связанный с лейкоцитами иммуноглобулин-подобный рецептор 1), LAIR2 (связанный с лейкоцитами иммуноглобулин-подобный рецептор 2), LEPR (рецептор лептина), LILRA1 (лейкоцитарный иммуноглобулин-подобный рецептор A1), LILRA2 (лейкоцитарный иммуноглобулин-подобный рецептор A2), LILRA3 (лейкоцитарный иммуноглобулин-подобный рецептор A3), LILRA4 (лейкоцитарный иммуноглобулин-подобный рецептор A4), LILRA5 (лейкоцитарный иммуноглобулин-подобный рецептор A5), LILRA6 (лейкоцитарный иммуноглобулин-подобный рецептор A6), LILRB1 (лейкоцитарный иммуноглобулин-подобный рецептор B1), LILRB2 (лейкоцитарный иммуноглобулин-подобный рецептор B2), LILRB3 (лейкоцитарный иммуноглобулин-подобный рецептор B3), LILRB4 (лейкоцитарный иммуноглобулин-подобный рецептор B4), LILRB5 (лейкоцитарный иммуноглобулин-подобный рецептор B5), LILRP2, LRIG1, LRIG2, LRIG3, LRIT1, LRRC4, LSAMP, LSR (стимулированный липолизом рецептор липопротеинов), LY9 (лимфоцитарный антиген 9), MADCAM1 (молекула клеточной адгезии типа адресина в слизистой сосудов 1), MAG (миелин-ассоциированный гликопротеин), MALT1 (MALT1 паракаспаза), MCAM (молекула адгезии клеток меланомы), MDGA1 (MAM домен, содержащий гликозилфосфатидилинозитоловый якорь 1), MDGA2 (MAM домен, содержащий гликозилфосфатидилинозитоловый якорь 2), MERTK (MER протоонкоген, тирозинкиназа), MFAP3, MIR, MILR1 ((иммуноглобулин-подобный рецептор 1 тучных клеток), MMP23A (матричная металлопептидаза 23A (псевдоген)), MMP23B (матричная металлопептидаза 23B), MUSK (ассоциированная с мышечной тканью рецепторная тирозинкиназа), MXRA5 (ассоциированный с матричным ремоделированием 5), MYBPC3, MYOМ1 (миомезин 1), MYOМ2 (миомезин 2), MYOМ3 (миомезин 3), NCA, NCAM1, NCAM2, NCR1 (рецептор 1, запускающий естественную цитотоксичность, NEGR1, NEO1, NFASC, NOPE, NPHS1 (NPHS1, нефрин), NPTN (нейропластин), NRCAM (молекула адгезии нейрональных клеток), NTRK1 (нейротрофическая рецепторная тирозинкиназа 1), NRG1, NT, NTRK3, OBSCN, OBSL1 (обскурин-подобный белок 1), OPCML, OSCAR (остеокласты-ассоциированный иммуноглобулин-подобный рецептор), PAPLN, PDCD1LG2 (лиганд 2 белка запрограммированной гибели клеток 1), PDGFRA (рецептор альфа тромбоцитарного фактора роста), PDGFRB (рецептор бета тромбоцитарного фактора роста), PDGFRL (рецептор, подобный рецептору фактора роста тромбоцитов), PECAM1 (молекула адгезии тромбоцитов и клеток эндотелия 1), PRODH2, PSG1 (бета-1-гликопротеин беременности 1), PSG2 (бета-1-гликопротеин беременности 2), PSG3 (бета-1-гликопротеин беременности 3), PSG4 (бета-1-гликопротеин беременности 4), PSG5 (бета-1-гликопротеин беременности 5), PSG6 (бета-1-гликопротеин беременности 6), PSG7 (бета-1-гликопротеин беременности 7 (ген/псевдоген)), PSG8 (бета-1-гликопротеин беременности 8), PSG9 (бета-1-гликопротеин беременности 9), PSG10 (бета-1-гликопротеин беременности 10), PSG11 (бета-1-гликопротеин беременности 11), PSG11s' (бета-1-гликопротеин беременности 11s'), PTGFRN (ингибитор рецептора F2 постогландина), PTK7 (протеинтирозинкиназа 7 (неактивная)), PTPRD (протеинтирозинфосфатаза, тип рецептора D), PTPRK (протеинтирозинфосфатаза, тип рецептора K), PTPRM (протеинтирозинфосфатаза, тип рецептора M), PTPRS (протеинтирозинфосфатаза, тип рецептора S), PTPRT (протеинтирозинфосфатаза, тип рецептора T), PTPsigma, PUNC, PVR (рецептор вируса полиомиелита), PVRL1, PVRL2, PVRL4, NECTIN1 (молекула клеточной адгезии нектин 1), NECTIN2 (молекула клеточной адгезии нектин 2), NECTIN3 (молекула клеточной адгезии нектин 3), RAGE, ROBO3 (обходной рецептор 3), SCN1B (натриевого потенциала-зависимого канала бета-субъединица 1), SDK1 (молекула адгезии 1 сопутствующих клеток), SDK2 (молекула адгезии 2 сопутствующих клеток), SEMA3A (семафорин 3A), SEMA3B (семафорин 3B),

SEMA3E (семафорин 3E), SEMA3F (семафорин 3F), SEMA3G (семафорин 3G), SEMA4C (семафорин 4C), SEMA4D (семафорин 4D), SEMA4G (семафорин 4G), SEMA7A (семафорин 7A), (группа крови Джона Милтона Хагена)), SIGIRR (single Ig and TIR domain containing - содержащий один Ig и TIR домен), SIGLEC1 (сиаловая кислота-связывающий Ig-подобный лектин 1), SIGLEC5 (сиаловая кислота-связывающий Ig-подобный лектин 5), SIGLEC6 (сиаловая кислота-связывающий Ig-подобный лектин 6), SIGLEC7 (сиаловая кислота-связывающий Ig-подобный лектин 7), SIGLEC8 (сиаловая кислота-связывающий Ig-подобный лектин 8), SIGLEC9 (сиаловая кислота-связывающий Ig-подобный лектин 9), SIGLEC10 (сиаловая кислота-связывающий Ig-подобный лектин 10), SIGLEC11 (сиаловая кислота-связывающий Ig-подобный лектин 11), SIGLEC12 (сиаловая кислота-связывающий Ig-подобный лектин 12 (ген/псевдоген)), SIGLEC14 (сиаловая кислота-связывающий Ig-подобный лектин 14), SIGLEC15 (сиаловая кислота-связывающий Ig-подобный лектин 15), SLAMF1 (signaling lymphocytic activation molecule family member 1 - представитель семейства сигнальных молекул активации лимфоцитов 1), SLAMF6 (представитель 6 семейства SLAM), SLAMF8 (представитель 8 семейства SLAM), SIRPG; TARM1 (Т-клетки-взаимодействующий, активирующий рецептор на миелоидных клетках 1), ТЕК (ТЕК рецептор тирозинкиназы), THY1 (Thy-1 антиген на поверхности клеток), TIE1 (тирозинкиназа с иммуноглобулин-подобным и EGF-подобным доменами 1), TMEM81 (трансмембранный белок 81), TMIGD1 (трансмембранный и содержащий домен иммуноглобулина 1), TMIGD2 (трансмембранный и содержащий домен иммуноглобулина 2), TTN (титин), TYRO3 (TYRO3 протеинтирозинкиназа), UNC5D, VCAM1 (молекула адгезии 1 клеток сосудов), VSIG1 (V-set и домен иммуноглобулина- содержащий белок 1), VSIG2 (V-set и домен иммуноглобулина- содержащий белок 2), VSIG4 (V-set и домен иммуноглобулина-содержащий белок 4), VSIG10 (V-set и домен иммуноглобулина-содержащий белок 10), VSIG10L (подобный V-set и домен иммуноглобулина-содержащему белок 10), VSTM1 (V-set и трансмембранный домен-содержащий 1), VTCN1 (V-set домен, содержащий ингибитор активации Т-клеток 1), ZPBP (белок, связывающий прозрачную оболочку) и ZPBP2 (белок 2, связывающий прозрачную оболочку).

Более предпочтительно Ig-подобный домен является Ig-подобным доменом какого-либо из следующих белков: CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD22, CD33, CD80, CD86, особенно CD4.

Другими предпочтительными примерами Ig-подобных доменов описаны в настоящем изобретении ниже.

Также предпочтительно, чтобы (дополнительный) функциональный домен первой и/или второй полипептидной цепи включал или состоял из внеклеточного и/или внутриклеточного домена (известного) белка. Кроме того, (дополнительный) функциональный домен первой и/или второй полипептидной цепи может предпочтительно включать или состоять из домена (известного) растворимого глобулярного белка. Более предпочтительно (дополнительный) функциональный домен первой и/или второй полипептидной цепи содержит или состоит из внеклеточного домена (известного) белка или домена (известного) растворимого глобулярного белка.

Предпочтительно (дополнительный) функциональный домен первой и/или второй полипептидной цепи имеет длину до 1000 аминокислот, более предпочтительно до 750 аминокислот, еще более предпочтительно до 500 аминокислот, еще более предпочтительно до 400 аминокислот, особенно предпочтительно до 300 аминокислот и наиболее предпочтительно до 275 или 250 аминокислот. Кроме того, предпочтительно, чтобы (дополнительный) функциональный домен первой и/или второй полипептидной цепи имел длину от 5 до 1000 аминокислот, более предпочтительно от 10 до 750 аминокислот, еще более предпочтительно от 20 до 500 аминокислот еще более предпочтительно от 50 до 400 аминокислот, особенно предпочтительно от 70 до 300 аминокислот и наиболее предпочтительно от 75 до 275 или от 100 до 250 аминокислот.

Также предпочтительно, чтобы (дополнительный) функциональный домен первой и/или второй полипептидной цепи имел размер до 150 кДа, более предпочтительно до 100 кДа, еще более предпочтительно до 80 кДа, еще более предпочтительно до 70 кДа, особенно предпочтительно до 50 кДа и наиболее предпочтительно до 30 или 25 кДа. Кроме того, предпочтительно, чтобы (дополнительный) функциональный домен первой и/или второй полипептидной цепи имел размер от 0,5 кДа до 150 кДа, более предпочтительно от 1 кДа до 100 кДа, еще более предпочтительно от 2,5 кДа до 80 кДа еще более предпочтительно от 5 до 70 кДа, особенно предпочтительно от 7,5 до 50 кДа и наиболее предпочтительно от 10 до 30 или 25 кДа.

(Дополнительный) функциональный домен первой и/или второй полипептидной цепи может содержать мономерный домен или мультимерные домены. Мономерный домен - это домен, который опосредует функциональность без участия какого-либо еще (дополнительного) домена. Мультимерные домены, например два домена, образующих димер, или три домена, образующих тример, совместно опосредуют функциональные возможности, в частности, в виде мультимера, например, в виде димера или тримера. В случае мультимерных доменов (дополнительный) функциональный домен первой и/или второй полипептидной цепи может содержать линкеры, например, описанные в настоящем изобретении, для обеспечения достаточной гибкости для образования мультимера, в частности, линкер может быть расположен (непосредственно) рядом с одним или более мультимерным доменом (доменами), например, между двумя мультимерными доменами или на каждой стороне всех мультимерных доменов. Предпочти-

тельно (дополнительный) функциональный домен первой и/или второй полипептидной цепи содержит или состоит из одного или нескольких мономерных доменов.

Как правило, (дополнительный) функциональный домен первой и/или второй полипептидной цепи может содержать или состоять из единственного белкового домена или из нескольких белковых доменов. Понятие "несколько белковых доменов" может означать мультимерные домены, описанные выше, и/или один или несколько мономерных доменов, описанных выше. Например, (дополнительный) функциональный домен первой и/или второй полипептидной цепи может содержать или состоять из двух или трех мономерных доменов, которые могут опосредовать одинаковую или разную функциональность и/или которые могут быть необязательно связаны линкером. Например, (дополнительный) функциональный домен первой и/или второй полипептидной цепи может содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 (отдельных) белковых доменов.

Предпочтительно (дополнительный) функциональный домен является белком, пептидом или полипептидом человека, или его фрагментом (в частности, доменом) или его производным.

В частности, (дополнительный) функциональный домен не является линкером (пептидом), например, GS-линкером. Даже если (дополнительный) функциональный домен может необязательно содержать линкер (пептид), такой как GS-линкер, он предпочтительно не состоит из линкера (пептида), такого как GS-линкер. Иначе говоря, даже если (дополнительный) функциональный домен содержит линкер (пептид), такой как GS-линкер, он предпочтительно содержит дополнительную аминокислотную последовательность, опосредующую функцию, отличную от (исключительно) функции связывания двух пептидов друг с другом. Соответственно, (дополнительный) функциональный домен предпочтительно отличается от линкера (пептида), такого как GS-линкер. В частности, (дополнительный) функциональный домен может не содержать линкера (пептида), такого как GS-линкер. Как правило, функциональность, обеспечиваемая (дополнительным) функциональным доменом, предпочтительно не является простой связью двух (поли)пептидов. Даже если (дополнительный) функциональный домен может "связывать" два (поли)пептида, таких как соседний переменный и константный домены, и, необязательно, обеспечивает гибкость, (дополнительный) функциональный домен предпочтительно обеспечивает (дополнительную) функцию, отличную от (поли)пептидной связи и гибкости.

Предпочтительно вторая полипептидная цепь содержит (дополнительный) функциональный домен (v). В этом случае первая и вторая полипептидные цепи обе содержат (дополнительный) функциональный домен, что приводит к образованию антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с двумя различными (отдельными) (дополнительными) функциональными доменами. (Дополнительные) функциональные домены первой полипептидной цепи и второй полипептидной цепи могут быть одинаковыми или разными, то есть одинаковыми или разными функциональными доменами. То есть, даже если

(дополнительные) функциональные домены первой и второй полипептидных цепей имеют идентичную аминокислотную последовательность, эти (дополнительные) функциональные домены являются "независимыми", то есть они опосредуют свои функции независимо друг от друга. Например, (дополнительные) функциональные домены первой и второй полипептидной цепи связываются с отдельными мишенями (например, отдельными антигенами или отдельными эпитопами одного и того же антигена, отдельными молекулами или отдельными частями одной и той же молекулы), и ни одному из независимых сайтов связывания не требуется участия другого для связи с мишенью.

Однако более предпочтительно, если вторая полипептидная цепь не содержит (дополнительного) функционального домена (v) и С-конец крайнего С-концевого переменного домена второй полипептидной цепи предпочтительно непосредственно связан с N-концом крайнего N-конца концевого константного домена второй полипептидной цепи. Например, если вторая полипептидная цепь представляет собой легкую цепь, С-конец крайнего С-концевого домена VL (или единственного VL-домена) предпочтительно непосредственно связан с N-концом CL-домена. Например, если вторая полипептидная цепь представляет собой тяжелую цепь, С-конец крайнего С-концевого домена VH (или единственного домена VH) предпочтительно напрямую связан с N-концом домена CH1.

Таким образом, настоящее изобретение также предусматривает антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, включающее первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, причем первая полипептидная цепь включает в направлении от N- к С-концу

- (i) один или несколько переменных доменов,
- (ii) (дополнительный) функциональный домен, и
- (iii) один или несколько константных доменов, причем вторая полипептидная цепь включает в направлении от N- к С-концу,
- (iv) один или несколько переменных доменов, формирующих сайты связывания антигена, с одним или несколькими переменными доменами первой полипептидной цепи, и
- (v) один или несколько константных доменов, отличающееся тем, что С-конец крайнего С-концевого переменного домена второй полипептидной цепи непосредственно соединен с N-концом крайнего N-концевого константного домена второй полипептидной цепи.

Таким образом, понятие "функциональный домен" относится к функциональной единице, например, антитела или антигенсвязывающего фрагмента, согласно описанному выше. Вкратце, функциональ-

ный домен обычно представляет белок, например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, с (дополнительной) функциональностью, согласно описанному выше. Соответственно, (дополнительный) функциональный домен обычно содержит все аминокислоты/последовательности, необходимые для обеспечения (дополнительной) функции. В частности, (дополнительный) функциональный домен (ii) первой полипептидной цепи не содержит фрагмента второй полипептидной цепи, что подробнее описано выше.

Особенно предпочтительно, (дополнительный) функциональный домен первой полипептидной цепи содержит или состоит из Ig-подобного домена, согласно описанному выше. Предпочтительными примерами Ig-подобных доменов являются те, которые описаны выше, и те, которые описаны в настоящем изобретении ниже.

Также предпочтительно, чтобы (дополнительный) функциональный домен первой полипептидной цепи включал или состоял из внеклеточного и/или внутриклеточного домена (известного) белка. Кроме того, (дополнительный) функциональный домен первой полипептидной цепи может предпочтительно включать или состоять из домена (известного) растворимого глобулярного белка. Более предпочтительно (дополнительный) функциональный домен первой полипептидной цепи содержит или состоит из внеклеточного домена (известного) белка или домена (известного) растворимого глобулярного белка.

Предпочтительно (дополнительный) функциональный домен первой полипептидной цепи имеет длину до 1000 аминокислот, более предпочтительно, до 750 аминокислот, еще более предпочтительно, до 500 аминокислот, еще более предпочтительно, до 400 аминокислот, особенно предпочтительно до 300 аминокислот и наиболее предпочтительно до 275 или 250 аминокислот. Кроме того, предпочтительно, чтобы (дополнительный) функциональный домен первой полипептидной цепи имел длину от 5 до 1000 аминокислот, более предпочтительно от 10 до 750 аминокислот, еще более предпочтительно от 20 до 500 аминокислот, еще более предпочтительно из от 50 до 400 аминокислот, особенно предпочтительно от 70 до 300 аминокислот и наиболее предпочтительно от 75 до 275 или от 100 до 250 аминокислот.

Также предпочтительно, чтобы (дополнительный) функциональный домен первой полипептидной цепи имел размер до 150 кДа, более предпочтительно до 100 кДа, еще более предпочтительно до 80 кДа, еще более предпочтительно до 70 кДа, особенно предпочтительно до 50 кДа и наиболее предпочтительно до 30 или 25 кДа. Кроме того, предпочтительно, чтобы (дополнительный) функциональный домен первой полипептидной цепи имел размер от 0,5 кДа до 150 кДа, более предпочтительно от 1 кДа до 100 кДа, еще более предпочтительно от 2,5 кДа до 80 кДа, еще более предпочтительно от 5 до 70 кДа, особенно предпочтительно от 7,5 до 50 кДа и наиболее предпочтительно от 10 до 30 или 25 кДа.

(Дополнительный) функциональный домен первой полипептидной цепи может содержать мономерный домен или мультимерные домены, согласно описанному выше. Кроме того, (дополнительный) функциональный домен первой полипептидной цепи может содержать или состоять из единственного белкового домена или из более чем одного белкового домена, согласно описанному выше.

Кроме того, (дополнительный) функциональный домен первой полипептидной цепи может содержать или состоять из единственного белкового домена или из более чем одного белкового домена, согласно описанному выше.

Предпочтительно (дополнительный) функциональный домен представляет собой белок, пептид или полипептид человека или его фрагмент (в частности, домен) или его производное.

В частности, (дополнительный) функциональный домен не является линкером (пептидом), таким как GS-линкер, согласно описанному выше. Даже если (дополнительный) функциональный домен может необязательно содержать линкер (пептид), такой как GS-линкер, он предпочтительно не состоит из линкера (пептида), такого как GS-линкер. То есть, даже если (дополнительный) функциональный домен содержит линкер (пептид), такой как GS-линкер, он предпочтительно содержит дополнительную аминокислотную последовательность, опосредующую функцию, отличную от (исключительного) связывания двух пептидов друг с другом. Соответственно, (дополнительный) функциональный домен предпочтительно отличается от линкера (пептида), такого как GS-линкер. В частности, (дополнительный) функциональный домен может не содержать линкера (пептида), такого как GS-линкер. Обычно, функциональность, обеспечиваемая (дополнительным) функциональным доменом, предпочтительно не является простой связью двух (поли)пептидов. Даже если (дополнительный) функциональный домен может "связывать" два (поли)пептида, например, соседние переменный и константный домены, и, необязательно, обеспечивать гибкость, (дополнительный) функциональный домен предпочтительно обеспечивает (дополнительную) функцию, отличную от (поли)пептидной связи и гибкости.

Кроме того, С-конец крайнего С-концевого переменного домена второй полипептидной цепи предпочтительно непосредственно связан с N-концом крайнего N-концевого константного домена второй полипептидной цепи. Например, если вторая полипептидная цепь представляет собой легкую цепь, С-конец большей крайнего С-концевого домена VL (или единственного домена VL) предпочтительно непосредственно связан с N-концом домена CL. Например, если вторая полипептидная цепь представляет собой тяжелую цепь, С-конец крайнего С-концевого домена VH (или единственного домена VH) предпочтительно непосредственно связан с N-концом домена CH1.

В общем, предпочтительно в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте по настоящему изобретению

бретению один или несколько константных доменов первой полипептидной цепи являются константными доменами тяжелой цепи, предпочтительно содержащими по меньшей мере константный домен CH1, и константный домен второй полипептидной цепи представляет собой константный домен CL легкой цепи. Более предпочтительно, один или несколько константных доменов первой полипептидной цепи являются константными доменами тяжелой цепи, предпочтительно содержащими по меньшей мере константный домен CH1, один или несколько переменных доменов первой полипептидной цепи являются переменными доменами VH тяжелой цепи, константный домен второй полипептидной цепи является константным доменом CL легкой цепи, и один или несколько переменных доменов второй полипептидной цепи являются переменными доменами VL легкой цепи. Таким образом, предпочтительно, чтобы первая полипептидная цепь или была получена из тяжелой цепи, а вторая полипептидная цепь представляла собой или была получена из легкой цепи. Особенно предпочтительно, чтобы константная область первой полипептидной цепи содержала три константных домена, а именно CH1, CH2 и CH3 (в частности, в направлении от N- к C-концу CH1-CH2-CH3), наиболее предпочтительно с шарнирной областью между CH1 и CH2.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения также предпочтительно, чтобы в антигене или его антигенсвязывающем фрагменте константные домены первой полипептидной цепи были константными доменами CL легкой цепи и один или несколько константных доменов второй полипептидной цепи были константными доменами тяжелой цепи, предпочтительно включающими по меньшей мере константный домен CH1. Более предпочтительно, константные домены первой полипептидной цепи являются константным доменом CL легкой цепи, один или несколько переменных доменов первой полипептидной цепи являются переменными доменами VL легкой цепи, один или несколько константных доменов второй полипептидной цепи являются константными доменами тяжелой цепи, предпочтительно включающими по меньшей мере константный домен CH1, и один или несколько переменных доменов второй полипептидной цепи являются переменными доменами VH тяжелой цепи. Иначе говоря, предпочтительно, чтобы вторая полипептидная цепь являлась или была получена из тяжелой цепи, а первая полипептидная цепь являлась или была получена из легкой цепи. Особенно предпочтительно, чтобы константная область второй полипептидной цепи содержала три константных домена, а именно CH1, CH2 и CH3 (в частности, в направлении от N- к C-концу CH1-CH2-CH3), наиболее предпочтительно с шарнирной областью между CH1 и CH2.

Кроме того, предпочтительно, чтобы в первой и/или второй полипептидной цепи константные домены, непосредственно примыкающие к (дополнительному) функциональному домену (и/или переменной области, если второй полипептид не содержит (дополнительного) функционального домена), не входили в область Fc. В нативных антителах константная область, следующая за переменными доменами, CH1 и CL, обычно не входит в область Fc. Соответственно, предпочтительно, чтобы одна полипептидная цепь (первая или вторая) содержала константный домен CH1, а другая полипептидная цепь (отличная от первой или второй) содержала константный домен CL.

Предпочтительно константный домен тяжелой цепи, в частности CH1 или какой-либо другой константный домен тяжелой цепи, выбран из следующих классов: γ , α , μ , ϵ и δ , предпочтительно γ , например, от IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

Кроме того, предпочтительно, если константный домен легкой цепи, в частности CL, выбран из следующих классов: κ и λ .

Предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением представляет собой рекомбинантное антитело или антигенсвязывающий фрагмент. В контексте настоящего изобретения понятие "рекомбинантный" означает, что рекомбинантное антитело или фрагмент антитела не встречаются в природе.

Предпочтительно, функциональный домен (ii) первой полипептидной цепи и/или функциональный домен (v) второй полипептидной цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению содержит или состоит из несущего домена, репортерного домена, метки, домена локализации, (независимого) сайта связывания, фермента или ферментативного домена, рецептора или его функционального фрагмента, или лиганда или его функционального фрагмента.

Предпочтительно функциональный домен (ii) первой полипептидной цепи и/или функциональный домен (v) второй полипептидной цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с настоящим изобретением содержит или состоит из фермента или его ферментативного домена. "Фермент" представляет полипептидный или белковый катализатор, то есть фермент, который обычно ускоряет химическую реакцию. Молекулы, на которые могут действовать ферменты, называются субстратами, и фермент конвертирует субстраты в различные молекулы, называемые продуктами. Почти все метаболические процессы в клетке нуждаются в ферментах, чтобы протекать со скоростью, достаточно быстрой для поддержания жизни. Предпочтительные ферменты включают оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы и лигазы. Для ферментов, которые образуют димер, функциональный домен первой и/или второй полипептидной цепи может содержать два идентичных домена, связанных линкером. Например, ферменты могут быть полезны для активации пролекарства в конкретном месте, на-

пример, в опухоли. Примеры предпочтительных ферментов и применения антител, представляющих такие ферменты, описаны в статьях Andradý C. с соавт., *Immunotherapy*. 2011, 3(2): 193-211, и Boado R.J. с соавт., *Biotechnol Bioeng*. 2008, 99(2):475-484.

Предпочтительные ферменты выбирают из группы, в которую входят: дегидрогеназа, люцифераза, ДМСО-редуктаза, алкогольдегидрогеназа (NAD), алкогольдегидрогеназа (NADP), гомосериндегидрогеназа, аминопропанолоксидоредуктаза, диацетилредуктаза, глицеролдегидрогеназа, пропанедиолфосфатдегидрогеназа, пропандиол-фосфат-дегидрогеназа, глицерол-3-фосфатдегидрогеназа (NAD +), D-ксилозуоредуктаза, L-ксилозуоредуктаза, лактатдегидрогеназа, малатдегидрогеназа, изоцитратдегидрогеназа, НМГ-СоА редуктаза, глюкооксидаза, L-гулонолактонооксидаза, тиаминоксидаза, ксантинооксидаза, ацетальдегиддегидрогеназа, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, пируватдегидрогеназа, оксоглутаратдегидрогеназа, биливердинредуктаза, моноаминооксидаза, дигидрофолатредуктаза, метилентетрагидрофолатредуктаза, саркозиноксидаза, дигидробензофенантридиноксидаза, NADH дегидрогеназа, уратоксидаза, нитритредуктаза, нитратредуктаза, глутатионредуктаза, тиоредоксинредуктаза, сульфитоксидаза, цитохром с оксидаза, коэнзим Q - цитохром с редуктаза, катехолоксидаза, лакказы, цитохром с пероксидаза, каталаза, миелопероксидаза, тиреоидная пероксидаза, глутатионпероксидаза, 4-оксифенилпируватдиоксигеназа, Renilla-люциферин-2-монооксигеназа, Cypridina- люциферин-2-монооксигеназа, люцифераза светлячка, Watasenia-люциферин-2-монооксигеназа, Oplophorus- люциферин-2-монооксигеназа, ароматаза, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, цитохром-P450-оксидаза, диоксигеназа оксида азота, синтаза оксида азота, ароматаза, фенилаланин гидроксилаза, тирозиназа, супероксиддисмутаза, церулоплазмин, нитрогеназа, деиодиназа, глутатион-s-трансфераза, катехол-о-метил трансфераза, ДНК-метилтрансфераза, метилтрансфераза гистонов, аспартаткарбамоилтрансфераза (ATCase), орнитинтранскарбамоилаза, синтаза аминолевулиновой кислоты, холинацетилтрансфераза, XIII фактор, гамма-глутамилтранспептидаза, транслутаминаза, гипоксантингуанинфосфорибозилтрансфераза, тиаминаза, аланинтрансaminaза, аспартаттрансaminaза, бутираткиназа, нуклеаза, эндонуклеаза, экзонуклеаза, кислая гидролаза, фосфолипаза А, фосфолипаза С, ацетилхолинэстераза, холинэстераза, липопротеинлипаза, убиквитин карбокси-концевая гидролаза L1, фосфатаза, щелочная фосфатаза, фруктозабисфосфатаза, CGMP специфическая фосфодиэфираза тип 5, фосфолипаза D, фермент рестрикции тип 1, фермент рестрикции тип 2, фермент рестрикции тип 3, фермент рестрикции тип 4, дезоксирибонуклеаза I, РНаза H, рибонуклеаза, амилаза, сахараза, хитиназа, лизоцим, мальтаза, лактаза, бета-галактозидаза, гиалуронидаза, аденозинметитонингидролаза, S-аденозил-L-гомосерингидролаза, алкенилглицерофосфохолингидролаза, алкенилглицерофосфоэтанолламингидролаза, холестерин-5,6-оксидгидролаза, гепоксидгидролаза, изохорозматаза, лейкотриен-А4-гидролаза, лимонен-1,2-эпоксидгидролаза, микросомальная эпоксидгидролаза, транс-эпоксисукцинат гидролаза, аланинаминопептидаза, ангиотензин-конвертирующий фермент, сериновая протеаза, хемотрипсин, трипсин, тромбин, фактор X, плазмин, акрозин, фактор VII, фактор IX, пролил-олигопептидаза, фактор XI, эластаза, фактор XII, протеиназа K, активатор тканевого плазминогена, белок С, сепараза, пепсин, сычужный фермент, ренин, трипсиноген, плазмепсин, матричная металлопротеиназа, металлоэндопептидаза, уреаза, бета-лактамаза, аргиназа, аденозиндеаминаза, GTP-циклогидролаза I, нитриалаза, геликаза, DnaB геликаза, RecQ геликаза, АТФаза, NaK-АТФаза, АТФсинтаза, кинурениназа, галоацетат-дегалогеназа, лиаза, орнитин-декарбоксилаза, уридинмонофосфатсинтаза, Декарбоксилаза ароматических L-аминокислот, RubisCO (рибулозо-1,5-бифосфаткарбоксилаза/оксигеназа), карбоангидраза, триптофансинтаза, фенилаланинаммиаклиаза, цистатионин-гамма-лиаза, цистатионин-бета-лиаза, лейкотриен-С4-синтаза, дихлорметандегалогеназа, галогидриндегалогеназа, аденилатциклаза, гуанилатциклаза, рацемаза аминокислот, серинрацемаза, манделатрацемаза, УДФ-глюкоза-4-эпимераза, метилмалонил-СоА-эпимераза, FKBP: FKBP1A, FKBP1B, FKBP2, FKBP3, FKBP5, FKBP6, FKBP8, FKBP9, FKBP10, FKBP52, FKBP1, циклофилин, парвулин, пролизомераза, 2-хлор-4-карбоксиметилбут-2-ен-1,4-олид-изомераза, бета-каротин-изомераза, фарнезол-2-изомераза, фурилфурамид-изомераза, линолеат-изомераза, малеат-изомераза, малеилацетоацетат-изомераза, малеилпируват-изомераза, парвулин, фотоизомераза, проликопен-изомераза, пролил-изомераза, ретинал-изомераза, ретинол-изомераза, зета-каротин-изомераза, еноил-СоА-изомераза, протеиндимсульфид-изомераза, фосфоглюкомутаза, муконат-циклоизомераза, 3-карбокси-cis,cis-муконат-циклоизомераза, тетрагидроксиптеридин-циклоизомераза, инозитол-3-фосфат-синтаза, 3-карбокси-cis,cis-муконат-циклаза, халькон-изомераза, хлормуконат-циклоизомераза, (+)-борнилдифосфатсинтаза, циклоэукаленол-циклоизомераза, альфа-пинен-оксид дециклаза, дихлормуконат-циклоизомераза, копалил-дифосфат-синтаза, ент-копалил-дифосфат-синтаза, син-копалил-дифосфат-синтаза, терпентедиенилдифосфат-синтаза, галимаденилдифосфат-синтаза, (S)-бета-макрокарпен-синтаза, ликопен-эпсилонциклаза, ликопен-бета-циклаза, просоланапирон-III циклоизомераза, D-рибозопираназа, стероидная дельта изомераза, топоизомераза, 6-карбокситетрагидроптерин-синтаза, FARSB, глутамин-синтаза, ЦТФ-синтаза, аргинатосукцинат-синтаза, пируваткарбоксилаза, ацетил-СоА-карбоксилаза и ДНК-лигаза.

Более предпочтительные ферменты могут быть выбраны из группы, состоящей из карбоксипептидазы, β-лактамазы, цитозин-деаминазы, β-глюкуронидазы, пуриновой нуклеозидфосфорилазы, гранзима В, каспазы и РНКазы, например, HPR (РНКазы поджелудочной железы человека, барназы, семенной

РНКазы быка, онконазы) RapLR1, ангиогенина, дикера, DIS3-подобной экзонуклеазы 2, фосфодиэстеразы ELAC 2, РНКазы III, РНКазы T2 и тРНК сплайсинговой рибонуклеазы.

Функциональный фрагмент фермента может быть каким-либо фрагментом фермента, который обладает способностью опосредовать функциональность. Обычно такие фрагменты называют "доменами". Соответственно, функциональный фрагмент фермента может быть каким-либо доменом фермента. К предпочтительным примерам относят функциональные фрагменты (например, домены) (приведенных в качестве примера) ферментов, описанных выше. Предпочтительно, функциональный фрагмент фермента, который включает (дополнительный) функциональный домен, является каталитическим доменом фермента. Каталитический домен фермента представляет область фермента, которая взаимодействует с его субстратом и вызывает ферментативную реакцию. Например, (дополнительный) функциональный домен первой полипептидной цепи и/или второй полипептидной цепи может быть каталитическим доменом какого-либо из следующих ферментов: карбоксипептидазы, β -лактамазы, цитозиндезаминазы, β -глюкуронидазы, фосфорилазы пуринового нуклеозида, гранзима В, каспазы и РНКазы, например, HPR (РНКазы поджелудочной железы человека), барназы, бычьей семенной РНКазы, онконазы, RapLR1, ангиогенина, дайсера, DIS3-подобной экзонуклеазы 2, фосфодиэстеразы ELAC 2, РНКазы III, РНКазы T2, и рибонуклеаза сплайсинга тРНК.

Предпочтительно, функциональный домен (ii) первой полипептидной цепи и/или функциональный домен (v) второй полипептидной цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению содержит или состоит из домена-носителя. В контексте настоящего изобретения понятие "домен-носитель" относится к аминокислотной последовательности, которая обеспечивает конъюгацию антитела с другой молекулой. В предпочтительном примере осуществления настоящего изобретения домен-носитель обеспечивает конъюгацию антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, например, с лекарственным средством, визуализирующим агентом или с наночастицей. В общем, предпочтительные примеры конъюгатов, которые могут быть применимы в контексте настоящего изобретения, описаны в работе Wu A.M. и Senter P.D., *Nat. Biotechnol.* 2005, 23, 1137-1146.

Например, к лекарственным средствам, которые могут быть конъюгированы с антителом, относят противораковые лекарственные средства, например, описанные в публикации Thomas A. C соавт., *Lancet Oncol.* 2016 Jun;17(6):e254-62. doi: 10.1016/S1470-2045(16)30030-4. Например, визуализирующие агенты, которые могут быть конъюгированы с антителом, описаны в публикации Steve Knutson с соавт., *PLoS One* 2016; 11(6): e0157762. Такие лекарственные средства предпочтительно являются цитотоксическими агентами. К предпочтительным примерам лекарственных средств, которые могут быть конъюгированы с антителом или антигенсвязывающим фрагментом по настоящему изобретению, относят доксорубин, усеченный экзотоксин А синегнойной палочки, майтансиноид DM1.

К примерам визуализирующих агентов, которые могут быть конъюгированы с антителом или антигенсвязывающим фрагментом по настоящему изобретению, относят радиоизотопы, например, описанные в работах Schubert M. C соавт., *Bioconjug Chem.* 2017 Apr 19;28(4):1176-1188, и Bhusari P. C соавт., *Int J Cancer.* 140(4), 2017, 938-947. К предпочтительным примерам радиоизотопов относят ^{90}Y , ^{131}I и ^{177}Lu .

Дополнительные примеры визуализирующих агентов, которые могут быть конъюгированы с антителом или антигенсвязывающим фрагментом по настоящему изобретению, включают флуоресцентные красители, квантовые точки и оксид железа. Примеры флуоресцентных красителей включают те, которые описаны ниже как репортерные домены. Пример наночастиц оксида железа описан Hengyi Xu с соавт. в *Biomaterials.* 32(36), 2011, 9758-9765.

Конъюгаты антител (то есть антитела, конъюгированные с другими молекулами) известны в данной области. В частности, молекула, конъюгированная с антителом, может быть связана с антителом, расщепляемым или нерасщепляемым линкером (например, описанным Thomas H. Pillow в *Pharmaceutical Patent Analyst Vol. 6, No. 1, February 3rd, 2017*, <https://doi.org/10.4155/ppa-2016-0032>; или в публикации Beck A. с соавт. в *Nat Rev Drug Discov.* 2017 May;16(5):315-337). Примеры таких линкеров, которые можно использовать для связывания молекулы с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, описаны, например, в EP 2927227 и в публикации Thomas H. Pillow, *Pharmaceutical Patent Analyst Vol. 6, No. 1, February 3rd, 2017*, <https://doi.org/10.4155/ppa-2016-0032>. Однако в предшествующем уровне техники линкеры прикрепляют непосредственно к Ig-доменам антитела (а именно к переменным и/или константным доменам антитела), что может мешать функционированию Ig-доменов антитела. Поэтому (дополнительный) функциональный домен антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению можно использовать для присоединения линкера к антителу. Предпочтительные линкеры отличаются от "классических" линкеров тем, что они разработаны таким образом, чтобы содержать дополнительные цистеины или лизины. Предпочтительно домен-носитель содержит одну или несколько неканонических аминокислот, пригодных для сайт-специфической конъюгации, например, согласно описанию в публикации Link A.J. с соавт., *Curr Opin Biotechnol.* 2003 Dec;14(6):603-9. Кроме того, домен-носитель может быть разработан таким образом, чтобы он распознавался специфическими ферментами (например, ферментом, генерирующим формилглицин, сортазой и/или транслугтаминазой), модифицирующими специфические аминокислоты, которые затем можно использовать для конъюгации, согласно описанию в разделе 6 публикации Dennler P. с соавт., *Antibodies.* 2015, 4:197-224.

Другими предпочтительными доменами-носителями являются домены для конъюгации, например, генетически модифицированный перекрестно реагирующий материал (cross-reacting material - CRM) дифтерийного токсина, столбнячного анатоксина (Т), менингококкового белкового комплекса внешней мембраны (outer membrane protein complex - ОМРС), дифтерийного токсина (D) и белка D H. influenzae (HiD), например, согласно описанию Pichichero M.E. в Hum Vaccin Immunother. 2013 дек; 9 (12): 2505-23.

Предпочтительно, функциональный домен (ii) первой полипептидной цепи и/или функциональный домен (v) второй полипептидной цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению содержит или состоит из репортерного домена. Репортерный домен обычно кодируется репортерным геном. Репортерными называются такие домены, присутствие которых (например, в клетке, организме) можно легко установить. Репортерные домены включают, например, флуоресцентные белки, например, GFP/EGFP (зеленый флуоресцентный белок/усиленный зеленый флуоресцентный белок), YFP (желтый флуоресцентный белок), RFP (красный флуоресцентный белок) и CFP (голубой флуоресцентный белок), люциферазы и ферменты, например, бета-галактозидазу и пероксидазу. Репортерные домены могут быть полезны для применения *in vivo* и *ex vivo*. Например, флуоресцентные белки вызывают флуоресценцию клетки при возбуждении светом определенной длины волны, люциферазы вызывают в клетке реакцию, приводящую к испусканию света, и ферменты, например, бета-галактозидаза, трансформируют субстрат в окрашенный продукт. Существует несколько различных способов измерения или количественной оценки репортера в зависимости от конкретного репортера и того, какие свойства желателно определить. В целом, микроскопия полезна для получения как пространственной, так и временной информации о репортерной активности, особенно на уровне отдельных клеток. Жидкостные цитометры лучше всего подходят для измерения распределения активности репортера по большой популяции клеток. Считывающие устройства для планшетов обычно лучше всего подходят для измерения большого количества различных образцов на протяжении времени. Фермент, например, бета-галактозидаза и пероксидаза, которые могут вступать в реакцию с данным субстратом, может быть полезен, например, для окрашивания образцов от человека *ex-vivo*, например, при диагностике опухоли.

Предпочтительно репортерный домен содержит или состоит из аминокислотной последовательности, кодирующей GFP/EGFP, YFP, RFP, CFP, люциферазу, бета-галактозидазу или пероксидазу. Кроме того, флуоресцентные метки, описанные ниже, также полезны в качестве репортерных доменов.

Предпочтительно, функциональный домен (ii) первой полипептидной цепи и/или функциональный домен (v) второй полипептидной цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению содержит или состоит из домена локализации. Обычно домен локализации направляет белок к определенной мишени, например, на уровне организма или клетки. Домен локализации может направлять антитело или антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением в определенное местоположение в клетке, например, в ядро, мембрану, периплазму, секрецию вне клетки, в определенную часть тела или в другое место.

Например, чтобы направить антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению в клетку, (дополнительный) функциональный домен может содержать или состоять из проникающего в клетку пептида. Понятие "проникающие в клетку пептиды" (cell penetrating peptides - CPP", также называемые доменом белковой трансдукции (protein transduction domain -PTD)) обычно применяются для обозначения коротких пептидов, которые способны транспортировать различные типы грузовых молекул через плазматическую мембрану и, таким образом, способствуют поглощению клетками различных молекулярных грузов (от частиц наноразмеров до небольших химических молекул и крупных фрагментов ДНК). Проникающие в клетку пептиды обычно имеют аминокислотный состав, который либо содержит относительно большое содержание положительно заряженных аминокислот, например, лизина или аргинина, либо имеет последовательность, которая содержит перемежающийся набор полярных/заряженных аминокислот и неполярных гидрофобных аминокислот. Эти два типа структур называются поликатионными или амфипатическими, соответственно. Обычно, проникающие в клетку пептиды (cell penetrating peptides - CPP) представляют собой пептиды из 8-50 остатков, которые способны преодолевать клеточную мембрану и проникать в клетки большинства типов. В другом варианте их также называют доменом белковой трансдукции (protein transduction domain - PTD), отражая их происхождение в природных белках. Frankel и Pabo одновременно с Green и Lowenstein описали способность трансактивирующего активатора транскрипции вируса иммунодефицита человека 1 (ВИЧ-ТАТ) проникать в клетки (Frankel A.D., Pabo CO., Cell, 55(6), 1988, 1189-1193). В 1991 описана трансдукция в нервные клетки гомеодомена Antennapedia (ДНК-связывающего домена) из *Drosophila melanogaster* (Joliot A. с соавт., Proc Natl Acad Sci USA, 88(5), 1991, 1864-1868). В 1994 году установлено, что первый 16-членный пептид CPP, названный пенетратинном, отличался от третьей спирали гомеодомена Antennapedia (Derossi D. с соавт., J Biol Chem, 269(14), 1994, 10444-10450), описанный в 1998 путем идентификации минимального домена ТАТ, необходимого для трансдукции белка (Vives E., Brodin, P., Lebleu, B. J Biol Chem, 272(25), 1997, 16010-16017). За последние два десятилетия были описаны десятки пептидов различного происхождения, включая вирусные белки, например, VP22 (Elliott G., O'Hare P., Cell, 1997, 88(2), 223-233), или от ядов, например, мелиттин (Dempsey, C.E., Biochim Biophys Acta, 1990. 1031 (2), 143-161), мастопоран (Konno K. с соавт., Toxicon, 2000. 38(11), 1505-1515), маурокальцин (Esteve E., с соавт., J Biol

Chem, 2005, 280(13), 12833-12839), кротамин (Nascimento F.D. с соавт., J Biol Chem, 2007, 282(29), 21349-21360) или буфорин (Kobayashi S. с соавт., Biochemistry, 2004, 43(49), 15610-15616). Синтетические CPP также разработали, включив поли-аргинин (R8, R9, R10 и R12) (Futaki S. с соавт., J Biol Chem, 2001, 276(8): р. 5836-40) или транспортан (Rooga M. с соавт., FASEB J, 1998, 12(1), 67-77). Какой-либо описанный CPP может быть применен в качестве проникающего в клетки пептида в антителе или антигенсвязывающим фрагменте по настоящему изобретению. Различные CPP, которые можно использовать в качестве проникающего в клетку пептида, в антителе или антигенсвязывающим фрагменте по настоящему изобретению, также раскрыты в обзоре: Milletti F., Drug Discov Today, 2012, 17(15-16), 850-860.

Другим примером домена локализации, который может быть использован в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте по настоящему изобретению, является домен для преодоления гематоэнцефалитического барьера, например, согласно описанию в публикации Farrington G.K. с соавт., FASEB J, 2014, 28(11), 4764-4778.

Другим примером домена локализации является домен ядерной локализации. Домен ядерной локализации направляет белок, в частности антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением, в ядро клетки. Домен ядерной локализации может быть применен для антитела или антигенсвязывающего фрагмента для блокирования активности фактора транскрипции и модулирования экспрессию гена. Предпочтительные примеры доменов ядерной локализации описаны в публикациях Kalderon D. с соавт., Cell 1984, 39(3, часть 2), 499-509, и Lusk C.P., Blobel G., King M.C., Nature Reviews Molecular Cell Biology 2007, 8(5), 414-420.

Предпочтительно, функциональный домен (ii) первой полипептидной цепи и/или функциональный домен (v) второй полипептидной цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с настоящим изобретением содержит или состоит из метки. Более предпочтительно метка является аффинной меткой, меткой солиubilизации, хроматографической меткой, меткой эпитопа или флуоресцентной меткой.

Метка представляет пептидную последовательность, пересаженную в рекомбинантный белок. Примеры меток включают аффинные метки, метки солиubilизации, хроматографические метки, эпитопные метки, флуоресцентные метки и белковые метки. Аффинные метки могут быть применимы для очистки белков из сырьев биологического источника с использованием аффинной технологии. К примерам аффинных меток относят хитин-связывающий белок (CBP), мальтоза-связывающий белок (MBP), и глутатион-S-трансфераза (GST). Другим примером является поли(His) метка, которая связывается с металлическими матрицами. Можно применять метки солиubilизации, особенно для рекомбинантных белков, экспрессированных в шаперон-недостаточных видах, например, в *E. coli*, чтобы способствовать правильному сворачиванию белков и не препятствовать их осаждению. К примерам меток солиubilизации относятся тиредоксин (TRX) и поли(NANP). Хроматографические метки могут быть применены для изменения хроматографических свойств белка, чтобы обеспечить различное разрешение в зависимости от метода разделения. Хроматографические метки часто состоят из полианионных аминокислот, например, FLAG-метка.

Эпитопные метки представляют собой короткие пептидные последовательности, которые выбраны потому, что высокоаффинные антитела могут надежно вырабатываться у многих разных видов. Они обычно являются производными вирусных генов, что объясняет их высокую иммунореактивность.

К эпитопным меткам относят V5-метку, Мус-метку, HA-метку и NE-метку. Эти метки особенно полезны для экспериментов по вестерн-блоттингу, иммунофлуоресценции и иммунопреципитации, хотя они также находят применение при очистке антител. Флуоресцентные метки могут быть использованы для визуального считывания белка. GFP и его варианты являются наиболее часто используемыми флуоресцентными метками. GFP может использоваться как складывающийся репортер (флуоресцирующий в сложенном состоянии и не флуоресцирующий, если нет). Белковые метки могут обеспечивать специфическую ферментативную модификацию (например, биотинилирование биотинлигазой) или химическую модификацию (например, реакция с FAsH-EDT2 для флуоресцентной визуализации). Метки могут быть объединены, например, чтобы соединить белки со многими другими компонентами. Метка может быть удалена химическими агентами или ферментами, например, протеолизом или за счет интеинового сплайсинга.

К предпочтительным примерам меток относятся, но ими перечень не ограничивается, следующие метки: твин-Strep-tag (SAWSHPQFEKGGGSGGGSSGSAWSHPQFEK; SEQ ID NO: 20); AviTag, это пептид, обеспечивающий биотинилирование ферментом BirA, и белок может быть выделен стрептавидином (GLNDIFEAQKIEWHE; SEQ ID NO: 21); Кальмодулин-tag, это пептид, связанный белком кальмодулином (KRRWKKNFIAVSAANRFKISSSGAL; SEQ ID NO: 22); полиглутаматная метка, это пептид, эффективно связывающийся с анионообменной смолой, такой как Mono-Q (EEEEEE; SEQ ID NO: 23); E-tag, это пептид, распознаваемый антителом (GAPVPYPDPLEPR; SEQ ID NO: 24); FLAG-tag, это пептид, распознаваемый антителом (DYKDDDDK; SEQ ID NO: 25); HA-tag, это производный от гемоглобулина пептид, распознаваемый антителом (YPYDVPDYA; SEQ ID NO: 26); His-tag, это пептид из 5-10 гистидинов, связанных никелевым или кобальтовым хелатом (HHHHHH; SEQ ID NO: 27); Мус-tag, это пептид, производный от с-тус, распознаваемый антителом (EQKLISEEDL; SEQ ID NO: 28); NE-tag, синтетиче-

ский пептид из 18 аминокислот (TKENPRSNQEESYDDNES; SEQ ID NO: 29), распознаваемый моноклональным антителом IgG1, которое применимо в разных методах, включая вестерн-блоттинг, ELISA, точную цитометрию, иммуноцитохимию, иммунопреципитацию и аффинную очистку рекомбинантных белков; S-tag, пептид, производный от рибонуклеазы A (KETAAAKFERQHMD; SEQ ID NO: 30); SBP-tag, пептид, который связывается со стрептавидином (MDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLENNPQQGQREP; SEQ ID NO: 31); Softag 1, метка для экспрессии у млекопитающих (SLA-ELLNAGLGG; SEQ ID NO: 32); Softag 3, метка для экспрессии у прокариот (TQDPSRVG; SEQ ID NO: 33); Strep-tag, пептид, который связывается со стрептавидином или модифицированным стрептавидином, называемым стрептактином (Strep-tag II: WSHYPQFEK; SEQ ID NO: 34); TC tag, тетрацистеиновая метка, которая распознается бимышьяковистыми соединениями FIAsh и ReAsh (CCPGCC; SEQ ID NO: 35); V5 tag, пептид, распознаваемый антителом (GKPIPNLLGLDST; SEQ ID NO: 36); VSV-tag, пептид, распознаваемый антителом (YTDIEMNRLGK; SEQ ID NO: 37); Xpress tag (DLYDDDDK; SEQ ID NO: 38); Iso-reptag, пептид, который ковалентно связывается пилин-С белком (TDKDMTITFTNKDAE; SEQ ID NO: 39); SpyTag, пептид, который ковалентно связывается с белком SpyCatcher (AHIVMVDAYKPTK; SEQ ID NO: 40); SnoopTag, пептид, который ковалентно связывается с белком SnoopCatcher (KLGDIIEFIKVNK; SEQ ID NO: 41); Ty1 tag (EVHTNQDPLD; SEQ ID NO: 42); BCCP (белок-носитель карбоксибиотина), белковый домен, биотинилированный BirA, распознаваемый стрептавидином; глутатион-S-трансфераза (GST)-tag, белок, который связывается с иммобилизованным глутатионом; зеленый флуоресцентный белок-метка (green fluorescent protein-tag), спонтанно флуоресцирующий белок, который может связываться нанотелами; HaloTag, мутантная бактериальная галогеналкандегалогеназа, которая ковалентно присоединяется к взаимодействующему с ней галогеналкановому субстрату, что позволяет прикрепляться к широкому кругу субстратов; мальтоза-связывающий белок (MBP)-tag, белок, который связывается с амилозной агарозой; Nus (вещество N-утилизации)-tag; тиоредоксин (Trx)-tag; антиген 8-кДа *Fasciola hepatica* (Fh8)-tag; малая убиквитин модифицированная метка (SUMO)-tag; пептидные последовательности, повышающие растворимость (SET)-tag; IgG домен B1 белка G (GB1)-tag; Повтор домена IgG ZZ белка A (ZZ)-tag; повсеместно распространенная метка повышения растворимости (SNUT)-tag; белок массой 17 кДа (Skp)-tag; протеинкиназа фага T7 (T7PK)-tag; секретируемый *E. coli* белок A (EspA)-метка; мономерный белок бактериофага T7, кодируемый геном 0.3(Orc) (Orc белок)/Мосг-метка; ингибитор трипсина *E. coli* (Ecotin)-метка; кальций-связывающий белок (CaBP)-метка; стресс-ответа арсенатредуктаза (ArsC)-метка; N-концевой фрагмент фактора инициации трансляции IF2 (IF2-домен I)-метка; метка экспрессии (N-концевой фрагмент фактора инициации трансляции IF2); белки стресс-ответа RpoA, SlyD, Tsf, RpoS, PotD, Стг-метки; кислотные белки *E. coli* метки msyB, yjgD, rpoD (см., например, Costa S. с соавт., *Frontiers in Microbiology* 2014, (5), 63; особенно табл. 1 в публикации Costa с соавт., 2014).

Соответственно, предпочтительно, чтобы метка включала или состояла из какой-либо аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 20-42 или варианта такой последовательности. Наиболее предпочтительно, метка представляет собой Strep-метку, в частности, в соответствии с SEQ ID NO: 20 или 34.

Предпочтительно функциональный домен (ii) первой полипептидной цепи и/или функциональный домен (v) второй полипептидной цепи антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, в соответствии с настоящим изобретением содержит или состоит из рецептора или его функционального фрагмента. Понятие "рецептор" означает полипептид или белок, который связывает определенную (сигнальную) молекулу, его лиганд, и который может инициировать ответ, например, в клетке. В природе рецепторы, в частности, расположены на/в клеточной мембране (рецепторы клеточной поверхности) или внутриклеточно (внутриклеточные рецепторы). К предпочтительным рецепторам относятся рецепторы, связанные с ионными каналами (ионотропные), связанные с G-белками (метаботропные) рецепторы гормонов, связанные с ферментами рецепторы гормонов, цитоплазматические рецепторы и ядерные рецепторы. Для рецепторов, которые формируют димер, функциональный домен первой и/или второй полипептидной цепи может включать два идентичных домена, соединенных линкером.

Предпочтительными являются рецепторы, содержащие Ig-подобный домен. В частности, рецептор может быть ингибиторным рецептором, включающий Ig-подобный домен, или активирующим рецептором, содержащим Ig-подобный домен. Предпочтительные примеры ингибирующих рецепторов, содержащих Ig-подобный домен, включают: белок 1 запрограммированной смерти клеток (PD-1 или PD1), цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный белок 4 (CTLA4), B-и Т-лимфоцитарный аттенюатор (BTLA), Т-клеточный иммуноглобулин и муциновый домен-содержащий рецептор-3 (TIM-3; также называемый клеточным рецептором 2 вируса гепатита А (HAVCR2)), Т-клеточный рецептор с доменами Ig и ITIM (TIGIT), рецептор 1 гликопротеина на поверхности клеток CD200 (CD200R1), 2B4 (CD244; SLAMF4), Tmem(триггерный рецептор, экспрессированный на миелоидных клетках)-подобный транскрипт 2 (TLT2), лейкоцитарный иммуноглобулин-подобный рецептор надсемейства В представителя 4 (LILRB4), и иммуноглобулин-подобный рецептор клеток-киллеров, два Ig-домена и длинный цитоплазматический хвост 2 (KIR2DL2). К предпочтительным примерам активируемых рецепторов, содержащих Ig-подобный домен, относятся индуцируемый костимулятор Т-лимфоцитов (Inducible T-cell CoStimulator - ICOS) и CD28. В частности, рецептор является белком запрограммированной клеточной смерти 1 (pro-

grammed cell death protein 1 - PD-1 или PD1) или сигнальная лимфоцитарная молекула активации (Signaling lymphocytic activation molecule - SLAM).

Другими предпочтительными рецепторами являются растворимые рецепторы, например, описанные в публикации Heaney M.L., Golde D.W. *J Leukoc Biol.* 1998, 64(2), 135-146. Их примеры включают TNFR (рецептор фактора некроза опухоли), p55, p75, Fas (CD95), рецептор фактора роста нервов, CD27, CD30, рецептор гормона роста, рецептор GM-CSF, рецептор эритропоэтина (EpoR), рецептор тромбопоэтина, G-CSF рецептор, IL-1RI (рецептор интерлейкина 1), IL-1RII (рецептор интерлейкина 1), IL-2R α (рецептор интерлейкина 2, Tac, CD25), IL-4R (рецептор интерлейкина 4), IL-5R α (интерлейкин 5 рецептор α), IL-7R (рецептор интерлейкина 7), IL-6R α (рецептор интерлейкина 6), gp130, CNTFR (рецептор цилиарного нейротрофического фактора), LIFR (рецептор фактора, ингибирующего лейкоз), рецептор лептина, IL-11R (рецептор интерлейкина 11), IL-12 p40 (белок p40, способный связываться с рецептором интерлейкина 12), рецептор фактора стволовых клеток (c-kit), рецептор интерферона, рецептор липополисахарида (CD14), рецептор комплемента типа I (CD35), рецептор гиалуроната (CD44), CD58, рецептор IgE (Fc ϵ RII, CD23), рецептор IgG (Fc γ RII), ICAM-1 (CD54), ICAM-3 (CD50), рецептор III типа трансформирующего фактора роста β , рецептор эпидермального фактора роста (c-erb B), рецептор фактора роста эндотелия сосудов, рецептор тромбоцитарного фактора роста, фактора роста фибробластов, рецептор колониестимулирующего фактора-1 (MCFR, c-fms), ARK (киназа адренергического рецептора), Tie (рецептор ангиопоэтина), рецептор инсулина, рецептор инсулиноподобного фактора роста II и рецептор маннозы-6-фосфата.

Более предпочтительно растворимый рецептор является растворимым рецептором цитокинов, например, рецептором надсемейства рецепторов цитокинов класса I, рецептором надсемейства рецепторов цитокинов класса II, рецептором семейства IL-1/TLR, рецептор семейства рецепторов TGF- β , рецептором надсемейства TNFR или IL-17R. К предпочтительным рецепторам надсемейства рецепторов цитокинов класса I относят IL-4R α , IL-5R α , IL-6R α , IL-7R α , IL-9R α , EpoR, G-CSFR, GM-CSFR α , gp130 и LIFR α . Предпочтительные рецепторы надсемейства рецепторов цитокинов класса II включают IFNR типа I, например, IFNAR1 и IFNAR2 α . Предпочтительные рецепторы семейства IL-1/TLR включают IL-1RII и IL-1RacP. Предпочтительные рецепторы семейства рецепторов TGF- β включают T β R-I и киназу 7, подобную рецептору активина. К предпочтительным рецепторам надсемейства TNFR относят TNFRSF6/Fas/CD95 и TNFRSF9/4-1BB/CD137. Соответственно, к предпочтительным примерам рецепторов цитокинов относят IL-4R α , IL-5R α , IL-6R α , IL-7R α , IL-9R α , EpoR, G-CSFR, GM-CSFR α , gp130, LIFR α , IFNAR1, IFNAR2 α , IL-1RII, IL-1RacP, T β R-I, киназу 7, подобную рецептору активина, TNFRSF6/Fas/CD95, TNFRSF9/4-1BB/CD137 и IL-17R. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащий функциональный домен, включающий такой рецептор, или его функциональный фрагмент, могут модулировать воспалительный ответ, когда антитело достигает своей мишени. Например, растворимые рецепторы IL-1 типа II (sIL-1RII), которые вырабатываются главным образом путем протеолитического расщепления в ответ на различные стимулы, могут ослаблять избыточную биоактивность IL-1, преимущественно путем связывания IL-1 β . Например, растворимый IL-1RacP, который вырабатывается альтернативным сплайсингом, а не расщеплением эктодомена. Например, растворимые рецепторы IL-6 связывают IL-6 со сродством, сходным с мембранным IL-6R, тем самым продлевая период полужизни IL-6.

Функциональный фрагмент рецептора может быть каким-либо фрагментом рецептора, который обладает способностью опосредовать функциональность. Обычно такие фрагменты называют "доменами". Соответственно, функциональный фрагмент рецептора может быть каким-либо доменом рецептора. Предпочтительные примеры включают функциональные фрагменты (например, домены) рецепторов, описанных выше в качестве примеров. Предпочтительно, функциональный фрагмент рецептора, который состоит из (дополнительного) функционального домена, представляет внеклеточный домен рецептора. Например, (дополнительный) функциональный домен первой полипептидной цепи и/или второй полипептидной цепи может быть внеклеточным доменом какого-либо из следующих рецепторов: IL-4R α , IL-5R α , IL-6R α , IL-7R α , IL-9R α , EpoR, G-CSFR, GM-CSFR α , gp130, LIFR α , IFNAR1, IFNAR2 α , IL-1RII, IL-1RacP, T β R-I, киназы 7, подобной рецептору активина, TNFRSF6/Fas/CD95, TNFRSF9/4-1BB/CD137, IL-17R, p55, p75, рецептора фактора роста нервов, CD27, CD30, рецептора гормона роста, рецептора тромбопоэтина, IL-1RI (рецептора I интерлейкина 1), IL-2R α (рецептора интерлейкина 2 α , Tac, CD25), CNTFR (рецептора цилиарного нейротрофического фактора), рецептора лептина, IL-11R (рецептора интерлейкина 11), IL-12 p40 (белка p40, способного связываться с рецептором интерлейкина 12), рецептора фактора стволовых клеток (c-kit), рецептора интерферона, рецептора липополисахарида (CD14), рецептора комплемента типа I (CD35), рецептора гиалуроната (CD44), CD58, рецептора IgE (Fc ϵ RII, CD23), рецептора IgG (Fc γ RII), ICAM-1 (CD54), ICAM-3 (CD50), рецептора III типа трансформирующего фактора роста P, рецептора эпидермального фактора роста (c-erb B), рецептора фактора роста эндотелия сосудов, рецептора тромбоцитарного фактора роста, фактора роста фибробластов, рецептора колониестимулирующего фактора-1 (MCFR, c-fms), ARK (киназа адренергического рецептора), Tie (рецептор ангиопо-

этина), рецептора инсулина, рецептора инсулиноподобного фактора роста II и рецептора маннозы-6-фосфата.

Предпочтительно, функциональный фрагмент рецептора, который состоит из (дополнительного) функционального домена, является Ig-подобным доменом. Например, (дополнительный) функциональный домен первой полипептидной цепи и/или второй полипептидной цепи может быть Ig-подобным доменом любого из следующих рецепторов: PD1, SLAM, LAIR1, CTLA4, BTLA, TIM-3, TIGIT, CD200R1, 2B4 (CD244), TLT2, LILRB4, KIR2DL2, ICOS или CD28. Предпочтительно функциональный домен (ii) первой полипептидной цепи и/или функциональный домен (v) второй полипептидной цепи антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, в соответствии с настоящим изобретением не содержит трансмембранного домена. Наиболее предпочтительно, рецептор включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной ниже и являющейся какой-либо из последовательностей SEQ ID NO: 13-15 или функциональным вариантом такой последовательности.

Кроме того, особенно предпочтительно, чтобы функциональный домен первой полипептидной цепи и/или второй полипептидной цепи включал или состоял из мутантного фрагмента связанного с лейкоцитами иммуноглобулин-подобного рецептора 1 (LAIR1), согласно описанию WO 2016/207402 A1. Мутантный фрагмент LAIR1, представленный как SEQ ID NO: 13, или вариант его последовательности, который, по меньшей мере, на 70%, предпочтительно, по меньшей мере, на 75%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 80%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, на 85%, еще более предпочтительно на 90%, особенно предпочтительно на 95% и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 98% идентичен последовательности.

Особенно предпочтительно, функциональный домен первой полипептидной цепи и/или второй полипептидной цепи включает или состоит из Ig-подобного фрагмента PD1 или SLAM, например, аминокислотной последовательности, представленной как SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 15; или вариант его последовательности, который, по меньшей мере, на 70%, предпочтительно, по меньшей мере, на 75%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 80%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, на 85%, еще более предпочтительно на 90%, особенно предпочтительно на 95% и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 98% идентичен последовательности.

Предпочтительно функциональный домен (ii) первой полипептидной цепи и/или функциональный домен (v) второй полипептидной цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с настоящим изобретением включает или состоит из лиганда или его функционального фрагмента. Понятие "лиганд" означает молекулу, которая специфически связывается с конкретным сайтом белка или какой-либо другой молекулы. В контексте настоящего изобретения лиганд означает пептид, полипептид или белок, поскольку он содержится в полипептидной цепи. Связывание лиганда происходит, в частности, с помощью межмолекулярных сил, например, ионных связей, водородных связей и ван-дер-Ваальсовских сил. Предпочтительными примерами лигандов являются цитокины и лиганды какого-либо из описанных выше рецепторов, в частности рецепторов PD1, SLAM, LAIR1, CTLA4, BTLA, TIM-3, TIGIT, CD200R1, 2B4 (CD244), TLT2, LILRB4, KIR2DL2, ICOS или CD28, например, PD-L1, PD-L2, B7-1, B7-2, B7-H4 (гомолог B7), галектин-9, рецептор вируса полиомиелита (PVR), гликопротеин мембраны OX-2, CD48, B7-H3 (гомолог B7), MHCI и ICOS-L.

Предпочтительно лиганд является цитокином или его функциональным фрагментом. Цитокины обычно представляют собой небольшие белки (~ 5-20 кДа), которые важны для передачи клеточных сигналов. Они высвобождаются клетками и влияют на поведение других клеток, а иногда и на поведение самой высвобождающей клетки. Цитокин может быть выбран из хемокинов, например, из семейства цитокинов SIS, семейства цитокинов SIG, семейства цитокинов SCY, надсемейства тромбоцитарного фактора 4 и интеркринов, СС-хемокиновых лигандов с (CCL-1 по CCL-28, в частности, CCL12), CXCL1 - CXCL17, XCL1 (лимфотактина- α) и XCL2 (лимфотактина- β), фракталкина (или CX3CL1); интерферонов, например, IFN типа I, IFN типа II и IFN типа III, в частности IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IFN- ϵ , IFN-SSS, IFN- ω , IL10R2 (также называемого CRF2-4) и IFNLR1 (также называемого CRF2-12); интерлейкинов, например, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, Ил-13, Ил-14, Ил-15, Ил-16, Ил-17, Ил-18, Ил-19, Ил-20, Ил-21, Ил-22, Ил-23, Ил-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IL-34, IL-35 и IL-36; лимфокинов, например, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, GM-CSF и интерферона-гамма; факторов некроза опухоли, например, CD40LG (TNFSF5); CD70 (TNFSF7); EDA; FASLG (TNFSF6); LTA (TNFSF1); LTB (TNFSF3); TNF, TNF α , TNFSF4 (OX40L); TNFSF8 (CD153); TNFSF9; TNFSF10 (ТРЕЙЛ); TNFSF11 (RANKL); TNFSF12 (ТВЕАК); TNFSF13; TNFSF13B; TNFSF14; TNFSF15; и TNFSF18; и колониестимулирующих факторов, например, CSF1 (также известного как "макрофагальный колониестимулирующий фактор"), CSF2 (также известного как "гранулоцитарный макрофагальный колониестимулирующий фактор"; GM-CSF и сарграмостима), CSF3 (также известного как "гранулоцитарный колониестимулирующий фактор" (G-CSF и филграстим), а также из синтетических CSF, например, промегапозтина. Соответственно, предпочтительные примеры цитокинов включают IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IL-34, IL-35, IL-36,

CCL-1, CCL-2, CCL-3, CCL-4, CCL-5, CCL-6, CCL-7, CCL-8, CCL-9, CCL-10, CCL-11, CCL-12, CCL-13, CCL-14, CCL-15, CCL-16, CCL-17, CCL-18, CCL-19, CCL-20, CCL-21, CCL-22, CCL-23, CCL-24, CCL-25, CCL-26, CCL-27, CCL-28, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CXCL17, XCL1, XCL2, фракталкин, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IFN- ϵ , IFN- κ , IFN- ω , IL10R2, IFNLR1, CD40LG, CD70, EDA, FASLG (TNFSF6), LTA (TNFSF1), LTB (TNFSF3), TNF α , TNFSF4 (OX40L), TNFSF8 (CD153), TNFSF9, TNFSF10 (TRAIL), TNFSF11 (RANKL), TNFSF12 (TWEAK), TNFSF13, TNFSF13B, TNFSF14, TNFSF15, TNFSF18, CSF1, CSF2 (GM-CSF) и CSF3 (G-CSF). К более предпочтительным примерам цитокинов относят IL-2, IL6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17, интерфероны, GM-CSF и TNF. Цитокины продуцируются широким спектром клеток, включая иммунные клетки, например, макрофаги, В-лимфоциты, Т-лимфоциты и тучные клетки, а также эндотелиальные клетки, фибробласты и различные стромальные клетки, в результате чего данный цитокин может вырабатываться несколькими типами клеток. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, включающий функциональный домен, содержащий такой цитокин или его функциональный фрагмент, может вызывать провоспалительный иммуностимулирующий ответ или противовоспалительный иммуносупрессивный или цитотоксический ответ в зависимости от выбранного цитокина.

Другие предпочтительные лиганды включают, например, гормоны, которые являются пептидами, полипептидами или белками. Гормоны являются сигнальными молекулами, которые транспортируются системой кровообращения к удаленным целевым органам, в частности, для регулирования физиологии и поведения. Гормоны, как правило, вырабатываются железами многоклеточных организмов. Особенно предпочтительным гормоном является гормон роста (человека). Дополнительные примеры гормонов включают TRH, вазопрессин, инсулин, пролактин, АСТН, окситоцин, предсердный натрийуретический пептид (ANP), глюкагон, соматостатин, холецистокинин, гастрин, лептин, ангиотензин II, основной фактор роста фибробластов-2 и паратиреоидный гормон-родственный белок.

Функциональный фрагмент лиганда может быть каким-либо фрагментом лиганда, который обладает способностью опосредовать функциональность. Обычно такие фрагменты называют "доменами". Соответственно, функциональный фрагмент лиганда может быть каким-либо доменом лиганда. Предпочтительные примеры включают функциональные фрагменты (например, домены) (приведенных в качестве примеров) лигандов, описанных выше. Предпочтительно, функциональный фрагмент лиганда, который состоит из (дополнительного) функционального домена, является Ig-подобным доменом.

Предпочтительно, функциональный домен (ii) первой полипептидной цепи и/или функциональный домен (v) второй полипептидной цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению содержит или состоит из (независимого) сайта связывания. Соответственно, предпочтительно, чтобы первая и/или вторая полипептидная цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с настоящим изобретением содержали (независимый) сайт связывания.

В общем, понятие "(независимый) сайт связывания" означает область полипептидной цепи, с которой может связываться определенная мишень (например, молекула и/или ион), в частности, за счет образования химической связи, например, нековалентной связи. Нековалентная связь является относительно слабой химической связью, которая не предполагает плотного обмена электронами. Множественные нековалентные связи часто стабилизируют конформацию макромолекул и обеспечивают высокоспецифичные взаимодействия между молекулами. Соответственно, сайт связывания представляет функциональный домен первой и/или второй полипептидной цепи, который обеспечивает функциональность связывания. В частности, сайт связывания не является линкером, например, GS-линкером. Даже если сайт связывания может необязательно содержать линкер (пептид), например, GS-линкер, он предпочтительно не состоит из линкера (пептида), например, GS-линкера. То есть, даже если сайт связывания содержит линкер (пептид), например, GS-линкер, он предпочтительно содержит дополнительную аминокислотную последовательность, обеспечивающую функцию, отличную от (исключительного) связывания двух пептидов друг с другом. Соответственно, сайт связывания предпочтительно отличается от линкера (пептида), например, GS-линкера. В частности, сайт связывания может не содержать линкер (пептид), например, GS-линкер. Линкер обычно не обеспечивает связывающей функциональности.

Важно, что (независимый) сайт связывания (ii) первой полипептидной цепи не содержит фрагмента второй полипептидной цепи. Соответственно, необязательный независимый сайт связывания (v) второй полипептидной цепи не содержит фрагмента первой полипептидной цепи. То есть вторая полипептидная цепь (в частности, какой-либо ее фрагмент, даже одна аминокислота) не требуется или не участвует в независимом сайте связывания первой полипептидной цепи. Более того, если вторая полипептидная цепь также содержит независимый сайт связывания, первая полипептидная цепь (в частности, какой-либо ее фрагмент, даже одна аминокислота) не требуется или не участвует в независимом сайте связывания второй полипептидной цепи. Соответственно, независимый сайт связывания отличается от сайта связывания антигена, образованного варибельным доменом первой полипептидной цепи вместе с варибельным доменом второй полипептидной цепи. То есть, независимый сайт связывания отличается от сайта связывания антигена, образованного варибельными доменами двух разных полипептидных цепей (однако независимый сайт связывания может по-прежнему содержать сайт связывания антигена, при условии,

что переменные домены расположены в одной полипептидной цепи, что подробнее описано ниже).

Предпочтительно (независимый) сайт связывания выбирают из группы, состоящей из рецепторов и их функциональных фрагментов, лигандов и их функциональных фрагментов, молекул CD и их функциональных фрагментов, одноцепочечных антител и их антигенсвязывающих фрагментов, антигенов и их функциональных фрагментов и меток.

Более предпочтительно (независимый) сайт связывания содержит или состоит из рецептора или его функционального фрагмента. Рецепторы обычно способны связываться со (специфическим) лигандом. Соответственно, рецепторы могут также обозначаться как (независимые) сайты связывания. Различные рецепторы описаны выше, а также предпочтительные варианты осуществления и примеры их применения, соответственно.

В контексте сайта связывания функциональный фрагмент рецептора характеризуется тем, что сохраняет способность рецептора связываться с его лигандом. Поскольку сайт связывания может содержать рецептор или его функциональный фрагмент, понятие "функциональный" относится к функции связывания рецептора в контексте сайта связывания. Другие фрагменты/домены рецептора могут предпочтительно не входить в (независимый) сайт связывания. Например, рецептор может включать один или несколько трансмембранных доменов, которые обычно не участвуют в функции связывания рецептора и которые, таким образом, предпочтительно не включены в (независимый) сайт связывания. Соответственно, наиболее предпочтительно, чтобы фрагмент рецептора, который состоит из (независимого) сайта связывания, был просто сайтом связывания рецептора (особенно без каких-либо дополнительных доменов рецептора).

Также более предпочтительно, чтобы (независимый) сайт связывания содержал или состоял из лиганда или его функционального фрагмента. Лиганды обычно способны связываться со (специфическим) рецептором. Соответственно, лиганды могут также упоминаться в качестве (независимых) сайтов связывания. Выше описаны различные лиганды, предпочтительные варианты их осуществления и, соответственно, примеры их применения.

В контексте сайта связывания функциональный фрагмент лиганда является таким фрагментом лиганда, который сохраняет его связывающую способность. Поскольку сайт связывания может содержать лиганд или его функциональный фрагмент, понятие "функциональный" относится к функции связывания лиганда в контексте сайта связывания. Другие фрагменты/домены лиганда могут предпочтительно не входить в (независимый) сайт связывания. Соответственно, наиболее предпочтительно, чтобы фрагмент лиганда, который состоит из (независимого) сайта связывания, был просто сайтом связывания лиганда (особенно без каких-либо дополнительных доменов лиганда).

Предпочтительно (независимый) сайт связывания первой полипептидной цепи и/или второй полипептидной цепи представляет собой молекулу CD (cluster of differentiation - кластер дифференциации) или ее функциональный фрагмент. Молекула CD (кластер дифференциации) является маркером на клеточной поверхности. Молекулы CD часто действуют как рецепторы, или лиганды, или участвуют в адгезии клеток. Номенклатура CD была разработана и поддерживается в рамках рабочей группы HLDA (Human Leukocyte Differentiation Antigens - Антигены дифференциации лейкоцитов человека), созданной в 1982 году. Примеры молекул CD, которые могут служить сайтами связывания в контексте настоящего изобретения, могут быть получены, например, из разных источников, известных специалисту в данной области, например, по адресу <http://www.ebioscience.com/resources/human-cd-chart.htm>, в справочнике "Human and Mouse CD Marker Handbook" BD Bioscience (с которым можно ознакомиться по адресу https://www.bdbiosciences.com/documents/cd_marker_handbook.pdf) или www.hcdm.org. Соответственно, (независимый) сайт связывания первой полипептидной цепи и/или второй полипептидной цепи может быть маркером CD или его функциональным фрагментом, например маркером CD (человека), описанным в справочнике BD Bioscience "Human and Mouse CD Marker Handbook" (доступен по адресу https://www.bdbiosciences.com/documents/cd_marker_handbook.pdf) или в других источниках "CD marker charts", которые обычно также указывают на партнеров по связыванию, так что соответствующий сайт связывания может быть выбран.

Функциональный фрагмент молекулы CD представляет собой такой фрагмент молекулы CD, который сохраняет связывающую способность молекулы CD. В контексте настоящего изобретения сайт связывания может содержать молекулу CD или ее функциональный фрагмент, и, соответственно, это функция связывания молекулы CD, к которой относится понятие "функциональный". Другие фрагменты/домены молекулы CD могут предпочтительно не содержать (независимый) сайт связывания. Соответственно, наиболее предпочтительно, чтобы фрагмент молекулы CD, который состоит из (независимого) сайта связывания, был просто сайтом связывания молекулы CD (особенно без каких-либо дополнительных доменов молекулы CD). Предпочтительно, функциональный фрагмент молекулы CD, который состоит из (независимого) сайта связывания, представляет собой Ig-подобный домен.

Предпочтительно (независимый) сайт связывания первой полипептидной цепи и/или второй полипептидной цепи представляет собой одноцепочечное антитело (например, scFv или VHH) или его антигенсвязывающий фрагмент. Также предпочтительно, чтобы (независимый) сайт связывания первой полипептидной цепи и/или второй полипептидной цепи представлял собой антиген или его функциональ-

ный фрагмент, например, эпитоп.

Предпочтительно, (независимый) сайт связывания первой полипептидной цепи и/или второй полипептидной цепи является одноцепочечным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. Одноцепочечное антитело представляет собой рекомбинантное антитело, состоящее только из единственной полипептидной цепи. К предпочтительным примерам одноцепочечных антител относят одноцепочечные антитела без константных доменов, например, однодоменные антитела, одноцепочечные антитела на основе одноцепочечных переменных фрагментов (scFv) и одноцепочечные диатела (scDb), а также одноцепочечные антитела с константными доменами, например, одноцепочечные Fab-фрагменты (scFab; Hust M. с соавт., BMC Biotechnol 2007, 8(7), 14).

Предпочтительные примеры одноцепочечных антител, основанных на одноцепочечных переменных фрагментах (scFv), включают scFv (единственный домен VH и единственный домен VL) и tandem-ные scFv, например, tandem-ди-scFv (BiTE), tandem-три-scFv и tandem-тетра-ScFv.

Однодоменное антитело (также называемое "нанотелом") является фрагментом антитела, содержащим/состоящим только из одного (мономерного) переменного домена. Как и целое антитело, однодоменное антитело способно избирательно связываться со специфическим антигеном. Первые однодоменные антитела были сконструированы из антител с тяжелой цепью, обнаруженных у верблюдов; эти антитела обозначают "VHH" или "VHH фрагменты". Хрящевые рыбы также имеют антитела с тяжелой цепью (IgNAR, "immunoglobulin new antigen receptor - новый антигенный рецептор иммуноглобулина"), из которых могут быть получены однодоменные антитела, называемые "V_{NAR}" или "фрагменты V_{NAR}" - Другой подход заключается в разделении димерных переменных доменов из общего иммуноглобулина G (IgG) человека или мыши на мономеры. Соответственно, однодоменные антитела могут быть получены из переменных доменов тяжелой или легкой цепи (VH или VL). Предпочтительные примеры однодоменных антител включают VHH, VNAR, а также VH, производный от IgG, и VL, производный от IgG.

Наиболее предпочтительно, функциональным доменом первой полипептидной цепи и/или второй полипептидной цепи является VHH или scFv. Наиболее предпочтительным примером VHH является T3-VHH или F4-VHH. Например, однодоменное антитело предпочтительно содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16 или 18, или варианта этой последовательности, который, по меньшей мере, на 70%, по меньшей мере, на 75%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 80%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, на 85%, еще более предпочтительно на 90%, особенно предпочтительно на 95%, и наиболее предпочтительно, по меньшей мере, на 98% идентичен последовательности. Наиболее предпочтительным примером scFv является TT39.7-scFv или MPE8-scFv. Например, однодоменное антитело содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17 или 19, или варианта этой последовательности, который, по меньшей мере, на 70%, по меньшей мере, на 75%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 80%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, на 85%, еще более предпочтительно на 90%, особенно предпочтительно на 95%, и наиболее предпочтительно, по меньшей мере, на 98% идентичен последовательности.

Предпочтительно, (независимый) сайт связывания первой полипептидной цепи и/или второй полипептидной цепи представляет собой антиген или его функциональный фрагмент, в частности эпитоп. Антиген является молекулой или частью молекулы, которая может быть связана антителом. Поскольку антиген или его функциональный фрагмент состоит из полипептидной цепи, следует отметить, что в контексте настоящего изобретения, если сайт связывания является антигеном или его функциональным фрагментом, указанный антиген или его функциональный фрагмент являются пептидом или полипептидом. Антиген обычно содержит один или несколько эпитопов. Эпитоп является той частью антигена, которая связывается антителом ("распознается" антителом). Предпочтительные примеры антигенов включают, но ими не ограничиваются, сывороточные белки, например цитокины, такие как IL4, IL5, IL9 и IL13, биоактивные пептиды, молекулы клеточной поверхности, например, рецепторы, транспортеры, ионные каналы, вирусные и бактериальные белки, RAGE (Receptor for Advanced Glycosylation End Products - рецептор усиленного гликозилирования конечных продуктов), GPVI и коллаген.

Функциональный фрагмент антигена является фрагментом антигена, сохраняющим связывающую способность антигена. Соответственно, фрагмент антигена предпочтительно является эпитопом или содержит один или несколько эпитопов. Другие фрагменты/домены антигена предпочтительно могут быть не включены в (независимый) сайт связывания. Соответственно, наиболее предпочтительно, чтобы фрагмент антигена, который включен в (независимый) сайт связывания, был эпитопом или включал более одного эпитопа (в частности, без каких-либо дополнительных доменов антигена).

Также предпочтительно, чтобы (независимый) сайт связывания первой полипептидной цепи и/или второй полипептидной цепи представлял собой метку, содержащую сайт связывания. Большинство меток могут связываться, например, метки сродства. Соответственно, те метки, которые обладают способностью связываться с другой молекулой, также могут называться (независимыми) сайтами связывания. Различные метки, включая те метки, которые содержат сайт связывания, описаны выше, и предпочтительные варианты их осуществления и примеры, соответственно, применяются.

В большинстве случаев (дополнительный) функциональный домен первой полипептидной цепи и/или второй полипептидной цепи представляет собой Ig-подобный домен, scFv, VHH или Strep-tag. В

частности, (дополнительный) функциональный домен первой полипептидной цепи и/или второй полипептидной цепи предпочтительно включает или состоит из какой-либо аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13-20 из представленного ниже перечня, или из функционального варианта такой последовательности, которая, по меньшей мере, на 80%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 85%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 90%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, на 95% и, наиболее предпочтительно, по меньшей мере, на 98% идентичности последовательности.

Предпочтительно, первая полипептидная цепь содержит единственный вариабельный домен (i) N-концевого (дополнительного) функционального домена (ii), а вторая полипептидная цепь содержит единственный вариабельный домен (iv) N-концевого необязательного (дополнительного) функционального домена (v) или N-концевого одного или нескольких константных доменов (vi), причем единственный вариабельный домен (iv) второй полипептидной цепи образует антигенсвязывающий сайт с вариабельным доменом (i) первой полипептидной цепи. Предпочтительные примеры таких антител и антигенсвязывающих фрагментов, согласно настоящему изобретению, показаны на фиг. 1B и 1B (все форматы на фиг. 1B и 1C, кроме антител на основе DVD-Ig, показаны в самой нижней панели на фиг. 1B).

В другом варианте, первая полипептидная цепь может содержать два или более вариабельных доменов (i) N-концевого (дополнительного) функционального домена (ii), а вторая полипептидная цепь может содержать два или более вариабельных домена (iv) N-концевого необязательного (дополнительного) функционального домена (v) или N-конец одного или нескольких константных доменов (vi), два или более вариабельных доменов (iv) второй полипептидной цепи, образующие сайты связывания антигена с двумя или более вариабельными доменами (i) первая полипептидная цепь. Например, каркасное антитело, в область изгиба которого вставлен (дополнительный) функциональный домен, может быть биспецифическим антителом формата DVD-Ig, например, как показано на фиг. 1B, самая нижняя панель "DVD-Ig".

Также предпочтительно, чтобы первая полипептидная цепь содержала одноцепочечное антитело, например, scFv или однодоменное антитело, например V_HH, N-конец крайнего N-концевого вариабельного домена (i) и/или C-конец крайнего C-концевого константного домена (iii). Альтернативно или дополнительно, вторая полипептидная цепь может содержать одноцепочечное антитело, например, scFv или однодоменное антитело, например, V_HH, N-конец крайнего N-концевого вариабельного домена (i) или C-конец крайнего C-концевого константного домена (vi). Их предпочтительные примеры показаны на фиг. 1B и включают scFv- (H) IgG, IgG (H) -scFv, scFv- (L) IgG, IgG (L) -scFv, V-(H) IgG, IgG (H) -V, V- (L) IgG и IgG (L) -V антитела с одним или несколькими (дополнительными) функциональными доменами, вставленными в область изгиба тяжелой и/или легкой цепи (цепей).

Предпочтительно, каждая первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь содержат единственный константный домен, в частности домен CL и домен CH1 соответственно. Их предпочтительные примеры показаны на фиг. 1B и включают фрагменты антитела F(ab)₂ и Fab с одним или несколькими (дополнительными) функциональными доменами, вставленными в область изгиба тяжелой и/или легкой цепи (цепей).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения также предпочтительно, чтобы первая полипептидная цепь или вторая полипептидная цепь содержали единственный константный домен, в частности домен CL; и другая, первая полипептидная цепь или вторая полипептидная цепь, содержит домен CH1 и один или несколько дополнительных константных доменов, например, домен CH2 и/или домен CH3. Предпочтительные примеры таких антител и антигенсвязывающих фрагментов, согласно настоящему изобретению, показаны на фиг. 1B и 1B (все форматы фиг. 1B и 1B, кроме фрагментов антител на основе F(ab)₂ и Fab, показанных на верхних панелях на фиг. 1B).

Предпочтительно, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением содержит фрагмент Fc, в частности область Fc. Более предпочтительно, фрагмент Fc происходит от антитела человека, например от IgG1, IgG2, IgG3 и/или IgG4 человека, причем IgG1 человека является особенно предпочтительным.

В контексте настоящего изобретения понятие "фрагмент Fc" относится к последовательности, производной от части тяжелой цепи иммуноглобулина, начинающейся в шарнирной области непосредственно перед сайтом расщепления папаином (например, остаток 216 в нативном IgG, причем первый остаток константной области тяжелой цепи находится в положении 114) и заканчиваясь на C-конце тяжелой цепи иммуноглобулина. Соответственно, фрагмент Fc может быть полным фрагментом Fc или его частью (например, доменом). Полный фрагмент Fc содержит, по меньшей мере, шарнирный домен, домен CH2 и домен CH3 (например, положения аминокислот EU 216-446). Дополнительный остаток лизина (K) иногда присутствует на крайнем C-конце фрагмента Fc, но часто отщепляется от зрелого антитела. Каждое из аминокислотных положений во фрагменте Fc было пронумеровано в соответствии с принятой в EU системой нумерации Kabat, см., например, публикацию Kabat с соавт., в кн.: "Sequences of Proteins of Immunological Interest", U.S. Dept. Health and Human Services, 1983 и 1987.

Предпочтительно, в контексте настоящего изобретения фрагмент Fc включает, по меньшей мере, одну из следующих последовательностей: шарнирного (например, верхнего, среднего и/или нижнего шарнирного региона) домена, домена CH2, домена CH3, или их варианта, части, или фрагмента. В пред-

почтительных вариантах осуществления настоящего изобретения фрагмент Fc содержит, по меньшей мере, шарнирный домен, домен CH2 или домен CH3. Более предпочтительно, фрагмент Fc представляет собой полный фрагмент Fc. Фрагмент Fc также может содержать одну или несколько аминокислотных инсерций, делеций или замещений относительно природного фрагмента Fc. Например, может быть удален, по меньшей мере, один из шарнирных доменов домена, домен CH2 или домен CH3 (или их части). Например, фрагмент Fc может содержать или состоять из: (i) шарнирного домена (или его части), гибридного с доменом CH2 (или его частью), (ii) шарнирного домена (или его части), гибридного с доменом CH3 (или его частью), (iii) домена CH2 (или его части), гибридного с доменом CH3 (или его частью), (iv) шарнирного домена (или его части), (v) домен CH2 (или его части) или (vi) домен CH3 или его части.

Специалисту в данной области будет очевидно, что фрагмент Fc может быть модифицирован таким образом, чтобы он отличался по аминокислотной последовательности от полного фрагмента Fc природной молекулы иммуноглобулина, сохраняя при этом, по меньшей мере, одну желательную функцию, присущую природному фрагменту Fc. Такие функции включают связывание с рецептором Fc (FcR), модуляцию периода полужизни антитела, функцию ADCC, связывание белка А, связывание белка G и связывание комплемента. Части встречающихся в природе фрагментов Fc, которые ответственны и/или необходимы для таких функций, хорошо известны специалистам в данной области.

Например, для активации комплемента каскад C1q связывается по меньшей мере с двумя молекулами IgG1 или одной молекулой IgM, присоединенными к мишени антигена (Ward E.S., Ghetie V. *Ther. Immunol.* 2, 1995, 77-94). Burton D.R. (*Mol. Immunol.* 22, 1985, 161-206) описал, что область тяжелой цепи, содержащая аминокислотные остатки с 318 по 337, участвует в фиксации комплемента. Duncan A.R., Winter G. (*Nature* 332, 1988, 738-740) сообщили, что используя сайт-направленный мутагенез Glu318, Lys320 и Lys322 образуют сайт связывания с C1q. Роль остатков Glu318, Lys320 и Lys 322 в связывании C1q подтверждена способностью короткого синтетического пептида, содержащего эти остатки, ингибировать опосредованный комплементом лизис.

Например, связывание FcR может быть опосредовано взаимодействием фрагмента Fc (антитела) с рецепторами Fc (FcR), которые являются специализированными рецепторами клеточной поверхности на кровяных тельцах. Рецепторы Fc, принадлежащие к надсемейству иммуноглобулинов, и было показано, что они опосредуют как удаление покрытых антителом патогенов путем фагоцитоза иммунных комплексов, так и лизис эритроцитов и различных других клеточных мишеней (например, опухолевых клеток), покрытых соответствующим антителом, через антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (ADCC; Van de Winkel J.G., Anderson C.L., *J. Leukoc. Biol.* 49, 1991, 511-524). Рецепторы FcR определяют по их специфичности в отношении классов иммуноглобулинов; рецепторы Fc для антител IgG обозначают FcγR, для IgE - как FcεR, для IgA - как FcαR, и так далее, а неонатальные рецепторы Fc - как FcRn. Связывание с рецептором Fc описано, например, в публикациях Ravetch J.V., Kinet J.P., *Annu. Rev. Immunol.* 9, 1991, 457-492; Capel P. J. с соавт., *Immunomethods*, 4, 1994, 25-34; de Haas M. с соавт. *J Lab. Clin. Med.* 126, 1995, 330-341; Gessner J. E. с соавт. *Ann. Hematol.* 76, 1998, 231-248.

Перекрестное связывание рецепторов доменом Fc нативных антител IgG (FcγR) запускает широкий спектр эффекторных функций, включая фагоцитоз, антителозависимую клеточную цитотоксичность и высвобождение медиаторов воспаления, а также клиренс иммунных комплексов и регуляцию выработки антител. Следовательно, фрагменты Fc, обеспечивающие перекрестное сшивание рецепторов (FcγR), являются предпочтительными. У людей были охарактеризованы три класса FcγR, а именно: (i) FcγRI (CD64), который связывает мономерный IgG с высокой аффинностью и экспрессируется на макрофагах, моноцитах, нейтрофилах и эозинофилах; (ii) FcγRII (CD32), который связывает комплексный IgG со средней или низкой аффинностью, широко экспрессируется, в частности, на лейкоцитах, является центральным игроком в опосредованном антителами иммунитете и который можно разделить на FcγRIIA, FcγRIIB и FcγRIIC, выполняющие различные функции в иммунной системе, но связывающиеся со сходным низким родством к IgG-Fc, и эктодомены этих рецепторов являются высоко гомологичными; и (iii) FcγRIII (CD16), который связывает IgG со средним или низким родством и существует в виде двух типов: FcγRIIIA, обнаруженный на клетках NK, макрофагах, эозинофилах и некоторых моноцитах и Т-клетках, и опосредующий ADCC и FcγRIIIB, который высоко экспрессируется на нейтрофилах, FcγRIIA обнаруживаются во многих клетках, участвующих в уничтожении (например, макрофагах, моноцитах, нейтрофилах) и, по-видимому, способен активировать процесс уничтожения. FcγRIIIB, по-видимому, играет роль в ингибирующих процессах и обнаруживается на В-клетках, макрофагах, тучных клетках и эозинофилах.

Что касается связывания FcγRI, модификация нативного IgG по меньшей мере одного из E233-G236, P238, D265, N297, A327 и P329, снижает связывание с FcγRI. Остатки IgG2 в положениях 233-236, замещенные на IgG1 и IgG4, снижают связывание с FcγRI в 10 раз и устраняют ответ моноцитов человека на сенсibilизированные антителами эритроциты (Armog K.L. с соавт. *Eur. J. Immunol.* 29, 1999, 2613-2624). Что касается связывания FcγRII, обнаружено пониженное связывание с FcγRIIA, например, для мутации IgG по меньшей мере в одном из положений E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270,

Q295, A327, R292 или K414. Что касается связывания FcγRIII, обнаружено пониженное связывание с FcγRIIIA, например для мутации по меньшей мере в одном из положений E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, S239, E269, E293, Y296, V303, A327, K338 и D376. Картирование сайтов связывания на IgG1 человека для рецепторов Fc, вышеупомянутые сайты мутаций и способы измерения связывания с FcγRI и FcγRIIA описаны в работе Shields R.L. с соавт. *J. Biol. Chem* 276, 2001, 6591-6604.

Что касается связывания с критическим FcγRII, две области нативного Fc IgG, по-видимому, являются критическими для взаимодействий FcγRII и IgG, а именно: (i) нижний шарнирный сайт IgG Fc, в частности аминокислотные остатки L, L, G, G (234 - 237, нумерация EU) и (ii) смежная область домена CH2 в Fc IgG, в частности петля и нити в верхнем домене CH2, смежные с нижней шарнирной областью, например в области P331 (Wines, B.D. с соавт. *J. Immunol.* 164, 2000, 5313-5318). Кроме того, FcγRI, по-видимому, связывается с одним и тем же сайтом на Fc IgG, тогда как FcRn и белок A связываются с другим сайтом на Fc IgG, который, по-видимому, находится на границе раздела CH2-CH3 (Wines, BD с соавт. *J. Immunol.* 164, 2000, 5313-5318).

Например, фрагмент Fc может содержать или состоять, по меньшей мере, из части фрагмента Fc, которая известна в данной области техники как необходимая для связывания FcRn или увеличенного периода полужизни. В другом варианте или дополнительно, фрагмент Fc антитела по настоящему изобретению содержит, по меньшей мере, часть, известную в данной области, которая требуется для связывания с белком A, и/или фрагмент Fc антитела по настоящему изобретению содержит, по меньшей мере, часть молекулы Fc, известную в данной области и необходимую для связывания белка G. Соответственно, предпочтительный фрагмент Fc содержит, по меньшей мере, часть, известную в данной области, которая требуется для связывания FcγR. Как указано выше, предпочтительный фрагмент Fc, таким образом, может включать, по меньшей мере, (i) нижний шарнирный сайт нативного Fc IgG, в частности аминокислотные остатки L, L, G, G (234 - 237, нумерация EU) и (ii) смежную область домена CH2 нативного Fc IgG, в частности петлю и нити в верхнем домене CH2, смежные с областью нижней петли, например в области P331, например области по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательных аминокислот в верхнем домене CH2 нативного Fc IgG вокруг P331, например, между аминокислотами 320 и 340 (нумерация EU) нативного IgG Fc.

Предпочтительно, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению включает область Fc. В контексте настоящего изобретения понятие "область Fc" означает часть иммуноглобулина, сформированную двумя или несколькими частями молекулы Fc тяжелых цепей антитела. Например, область Fc может быть мономерной или "одноцепочечной" областью Fc (т.е., область scFc). Одноцепочечные области Fc состоят из фрагментов Fc, связанных внутри одной полипептидной цепи (например, кодируемых в одной непрерывной последовательности нуклеиновой кислоты). Примеры области scFc описаны в WO 2008/143954 A2. Предпочтительно, область Fc является димерной областью Fc. Понятие "димерная область Fc" или "dcFc" относится к димеру, образованному фрагментами Fc двух отдельных тяжелых цепей иммуноглобулина. Димерная область Fc может быть гомодимером двух идентичных фрагментов Fc (например, области Fc природного иммуноглобулина) или гетеродимером двух неидентичных фрагментов Fc.

Фрагменты Fc области Fc могут быть одного и или разных классов и/или подклассов. Например, фрагменты Fc могут быть получены из иммуноглобулина (например, иммуноглобулина человека) подкласса IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Предпочтительно, фрагменты Fc области Fc одного и того же класса и подкласса. Однако область Fc (или одна или несколько Fc-частей Fc-области) также может быть химерной, при этом химерная Fc-область может содержать Fc-фрагменты, полученные из разных классов и/или подклассов иммуноглобулинов. Однако область Fc (или одна или несколько фрагментов Fc области Fc) также может быть химерной, при этом химерная область Fc может содержать фрагменты Fc, производные от разных классов и/или подклассов иммуноглобулинов. Например, по крайней мере два из фрагментов Fc димерной или одноцепочечной области Fc могут быть от разных классов и/или подклассов иммуноглобулина. Дополнительно, или, в другом варианте, химерные области Fc могут содержать один или несколько химерных фрагментов Fc. Например, химерная область или фрагмент Fc может содержать одну или несколько частей, производных от иммуноглобулина первого подкласса (например, подкласса IgG1, IgG2 или IgG3), хотя остальная часть области или фрагмента Fc относится к другому подклассу. Например, область Fc или фрагмент полипептида Fc может содержать домен CH2 и/или CH3, производный от иммуноглобулина первого подкласса (например, подкласса IgG1, IgG2 или IgG4), и шарнирную область от иммуноглобулина второго подкласса (например, подкласса IgG3). Например, область или фрагмент Fc может содержать шарнирную область и/или домен CH2, производный от иммуноглобулина первого подкласса (например, подкласса IgG4), и домен CH3, производный от иммуноглобулина второго подкласса (например, IgG1, IgG2, или подкласс IgG3). Например, химерная область Fc может содержать фрагмент Fc (например, полную часть молекулы Fc) от иммуноглобулина для первого подкласса (например, подкласса IgG4) и группу Fc от иммуноглобулина второго подкласса (например, подкласса IgG1, IgG2 или IgG3). Например, область или фрагмент Fc может содержать домен CH2 от иммуноглобулина IgG4 и домен CH3 от иммуноглобулина IgG1. Например, область или фрагмент Fc может содержать до-

мен CH1 и домен CH2 от молекулы IgG4 и домен CH3 от молекулы IgG1. Например, область или фрагмент Fc может содержать часть домена CH2 от определенного подкласса антитела, например, положения EU 292-340 домена CH2. Например, область или фрагмент Fc может содержать аминокислоты в положениях 292-340 CH2, производных от фрагмента IgG4, и остаток CH2, производный от фрагмента IgG1 (в другом случае, 292-340 домена CH2 могут быть получены от фрагмента IgG1 и остаток CH2, производный от фрагмента IgG4).

Кроме того, область или фрагмент Fc может (дополнительно или альтернативно), например, содержать химерную шарнирную область. Например, химерный шарнир может быть получен, например, частично, от молекулы IgG1, IgG2 или IgG4 (например, последовательности верхней и нижней средней петли) и частично, от молекулы IgG3 (например, последовательности средней петли). В другом примере область или фрагмент Fc может содержать химерный шарнир, частично производный от молекулы IgG1 и частично от молекулы IgG4. В другом примере химерный шарнир может содержать верхний и нижний шарнирные домены из молекулы IgG4 и средний шарнирный домен из молекулы IgG1. Такой химерный шарнир может быть получен, например, путем введения замены пролина (Ser228Pro) в положении EC 228 в среднем шарнирном домене шарнирной области IgG4. В другом варианте осуществления настоящего изобретения химерный шарнир может содержать аминокислоты в положениях EU 233-236 от антитела IgG2 и/или мутации Ser228Pro, где остальные аминокислоты шарнира происходят от антитела IgG4. Химерные петли, которые можно использовать во фрагменте Fc антитела согласно настоящему изобретению, описаны в US 2005/0163783 A1.

В настоящем изобретении предпочтительно, чтобы фрагмент Fc или область Fc содержал или состоял из аминокислотной последовательности, производной от последовательности иммуноглобулина человека (например, от области Fc или фрагмента Fc из молекулы IgG человека). Однако полипептиды могут содержать одну или несколько аминокислот от млекопитающего другого вида. Например, фрагмент Fc приматов или сайт связывания приматов могут быть включены в полипептиды по настоящему изобретению. В другом варианте одна или несколько аминокислот мыши могут присутствовать в группе Fc или в области Fc.

Предпочтительно, антитело по настоящему изобретению включает, в частности, в дополнение к Fc-фрагменту, как описано выше, другие части, производные от константной области, в частности от константной области IgG, от константной области IgG1, более предпочтительно от константной области IgG1 человека. Более предпочтительно, антитело по настоящему изобретению включает, в частности, в дополнение к фрагменту Fc, как описано выше, все другие части константных областей, в частности все другие части константных областей IgG, предпочтительно все другие части константных областей IgG1, более предпочтительно все другие части константных областей IgG1 человека.

Особенно предпочтительными последовательностями константных областей являются аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3, 4 или 7. Предпочтительно, константная область тяжелой цепи содержит или состоит из IgG1 CH1-CH2-CH3, в частности, включающая или состоящая из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3 или ее варианта функциональной последовательности согласно описанию настоящего изобретения. Предпочтительно, константная область легкой цепи содержит или состоит из CL IgG1, в частности, содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4 или ее варианта функциональной последовательности согласно описанию настоящего изобретения.

Также предпочтительно, чтобы антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением не содержали область Fc или фрагмент Fc. В частности, константные домены, необходимые для области изгиба (CH1 и CL), обычно не участвуют во фрагменте Fc или области Fc. Следовательно, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением не содержат фрагмент Fc или область Fc. Примеры таких антител (или фрагментов антител) включают антитела на основе Fab или F(ab)₂ (IEI-Fab или IEI-F(ab)₂).

Предпочтительно, первая полипептидная цепь и/или вторая полипептидная цепь антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению включает один или несколько линкеров. Например, первая полипептидная цепь и/или вторая полипептидная цепь антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению может включать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 линкеров. Более предпочтительно, первая полипептидная цепь и/или вторая полипептидная цепь антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению включает один или два линкера. Также предпочтительно, чтобы первая полипептидная цепь и/или вторая полипептидная цепь антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению содержит три или четыре линкера. Обычно линкер может обеспечить большую гибкость полипептидной цепи. Предпочтительно, первая полипептидная цепь и/или вторая полипептидная цепь содержит линкер между константной областью и (дополнительным) функциональным доменом. В другом варианте первая полипептидная цепь и/или вторая полипептидная цепь могут не содержать линкер между константной областью и (дополнительным) функциональным доменом. Если второй полипептид не содержит (дополнительного) функционального домена, вторая полипептидная цепь может содержать линкер между константной областью и вариабельной областью. В другом варианте вторая полипептидная цепь может не содержать линкера между константной

областью и вариабельной областью. Предпочтительно первая полипептидная цепь и/или вторая полипептидная цепь содержат линкер между (дополнительным) функциональным доменом и вариабельным доменом, в частности, самым С-концевым вариабельным доменом. В другом варианте первая полипептидная цепь и/или вторая полипептидная цепь могут не содержать линкер между (дополнительным) функциональным доменом и вариабельным доменом, в частности самым С-концевым вариабельным доменом. Если первая полипептидная цепь и/или вторая полипептидная цепь содержит более одного вариабельного домена, также предпочтительно, чтобы первая полипептидная цепь и/или вторая полипептидная цепь содержит один или несколько линкеров между вариабельными доменами. В другом варианте первая полипептидная цепь и/или вторая полипептидная цепь могут не содержать один или несколько линкеров между вариабельными доменами. Более предпочтительно, первая полипептидная цепь и/или вторая полипептидная цепь содержит линкер между константной областью и (дополнительным) функциональным доменом и линкер между (дополнительным) функциональным доменом и вариабельным доменом, в частности самым С-концевым вариабельным доменом. В другом варианте первая полипептидная цепь и/или вторая полипептидная цепь могут не содержать ни линкера между константной областью и (дополнительным) функциональным доменом, ни линкера между (дополнительным) функциональным доменом и вариабельным доменом, в частности самым С-концевым вариабельным доменом. Кроме того, первая полипептидная цепь может содержать линкер между константной областью и (дополнительным) функциональным доменом и линкер между (дополнительным) функциональным доменом и вариабельным доменом, в частности самым С-концевым вариабельным доменом, хотя вторая полипептидная цепь может не содержать ни (дополнительного) функционального домена, ни линкера между константной областью и вариабельной областью. Также предпочтительно, если первая полипептидная цепь и/или вторая полипептидная цепь содержит более одного вариабельного домена, чтобы первая полипептидная цепь и/или вторая полипептидная цепь содержали линкер между константной областью и (дополнительным) функциональным доменом; линкер между (дополнительным) функциональным доменом и вариабельным доменом, в частности, самым С-концевым вариабельным доменом; и один или несколько линкеров между вариабельными доменами.

Если первая полипептидная цепь и/или вторая полипептидная цепь содержит более одного линкера, линкеры могут быть одинаковыми или разными.

Предпочтительно линкер включает до 20 аминокислот, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот, более предпочтительно до 15 аминокислот, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот, еще более предпочтительно до 10 аминокислот, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот, и еще более предпочтительно до 5 аминокислот, например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот. Линкер может быть производным от природной аминокислотной последовательности, например, от фланкирующих областей, или от искусственных аминокислотных последовательностей. Предпочтительно, (дополнительный) функциональный домен соответствует одному экзону или более чем одному экзону, и аминокислотная последовательность линкера извлекается из интронных последовательностей, фланкирующих данный единственный экзон или более одного экзона. Например, (i) линкер между вариабельной областью и (дополнительным) функциональным доменом (который кодируется экзоном или вариантом его последовательности) может кодироваться фланкирующей интронной последовательностью непосредственно перед (в направлении 5'-3') экзоном или вариантом его последовательности используют в качестве "(дополнительного) функционального домена" и/или (ii) линкера между (дополнительным) функциональным доменом (который кодируется экзоном или вариантом его последовательности) и константной областью может быть закодирован фланкирующей интронной последовательностью сразу после (в направлении 5'-3') экзона или варианта его последовательности для использования в качестве "(дополнительного) функционального домена". Предпочтительно, линкер не содержит сколько-нибудь остатков Cys (C). Предпочтительно, линкер содержит или состоит из одного или нескольких остатков глицина (Gly) и/или одного или нескольких остатков серина (Ser) ("GS линкер"). Предпочтительные примеры GS-линкеров являются аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 43-48, наиболее предпочтительно, линкер является последовательностью SEQ ID NO: 45. Предпочтительные примеры линкеров интронных последовательностей представляют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 49-52. Наиболее предпочтительно, линкер содержит или состоит из аминокислотной последовательности, а именно какой-либо из представленных ниже последовательностей SEQ ID NO: 43-52.

Например, первая полипептидная цепь и/или вторая полипептидная цепь может содержать (в направлении от N- к С-концу) линкер с последовательностью SEQ ID NO: 49, или его функциональный вариант последовательности, за которым непосредственно следует (дополнительный) функциональный домен с последовательностью SEQ ID NO: 14, или функциональный вариант его последовательности. Кроме того, первая полипептидная цепь и/или вторая полипептидная цепь может содержать (в направлении от N- к С-концу) (дополнительный) функциональный домен с последовательностью SEQ ID NO: 14, или функциональный вариант его последовательности с непосредственно следующим за ним линкером с последовательностью SEQ ID NO: 50, или функциональный вариант его последовательности. Наиболее предпочтительно первая полипептидная цепь и/или вторая полипептидная цепь могут содержать (в на-

правлении от N- к С-концу) (вариабельный домен с непосредственно следующим за ним) линкер с последовательностью SEQ ID NO: 49, или функциональный вариант его последовательности, за которым непосредственно следует (дополнительный) функциональный домен последовательности SEQ ID NO: 14, или функциональный вариант его последовательности, с непосредственно следующим за ним линкером с последовательностью SEQ ID NO: 50, или функциональный вариант его последовательности (за которым непосредственно следует константный домен).

Например, первая полипептидная цепь и/или вторая полипептидная цепь может содержать (в направлении от N- к С-концу) линкер с последовательностью SEQ ID NO: 51, или функциональный вариант его последовательности, за которым непосредственно следует (дополнительный) функциональный домен с последовательностью SEQ ID NO: 15, или функциональный вариант его последовательности. Кроме того, первая полипептидная цепь и/или вторая полипептидная цепь может содержать (в направлении от N- к С-концу) (дополнительный) функциональный домен с последовательностью SEQ ID NO: 15, или функциональный вариант его последовательности с непосредственно следующим за ним линкером с последовательностью SEQ ID NO: 52, или функциональный вариант его последовательности. Наиболее предпочтительно первая полипептидная цепь и/или вторая полипептидная цепь могут содержать (в направлении от N- к С-концу) (вариабельный домен с непосредственно следующим за ним) линкер с последовательностью SEQ ID NO: 51, или функциональный вариант его последовательности, за которым непосредственно следует (дополнительный) функциональный домен с последовательностью SEQ ID NO: 15, или функциональный вариант его последовательности, с непосредственно следующим за ним линкером с последовательностью SEQ ID NO: 52, или функциональный вариант его последовательности (за которым непосредственно следует константный домен).

В другом варианте, также предпочтительно, чтобы первая полипептидная цепь и/или второй полипептид не содержали каких-либо линкеров.

Предпочтительно, первая полипептидная цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с настоящим изобретением содержит или состоит из (в направлении от N- к С-концу): V-D-CH1, где

V обозначает вариабельный домен (i);

D обозначает (дополнительный) функциональный домен (ii); и CH1 обозначает константный домен CH1 (iii).

V и D и/или D и CH1 могут быть соединены через линкер, согласно описанному выше, или могут быть непосредственно соединены друг с другом.

Более предпочтительно, первая полипептидная цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с настоящим изобретением содержит или состоит из (в направлении от N- к С-концу): V-D-CH1-CH2-CH3, где обозначение V-D-CH1 такое же, как описанное выше, и CH2 и CH3 являются константным доменом CH2 и константным доменом CH3, соответственно.

Также предпочтительно, если первая полипептидная цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с настоящим изобретением содержит или состоит из (в направлении от N- к С-концу): (V)_A-D-CH1, где обозначение V-D-CH1 такое же, как описанное выше, и A означает целое число от 1 до 5, предпочтительно от 1 до 4, более предпочтительно от 1 до 3 и еще более предпочтительно 1 или 2, и вариабельные домены V могут быть соединены друг с другом непосредственно или через линкер.

Предпочтительно, вторая полипептидная цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с настоящим изобретением содержит или состоит из (в направлении от N- к С-концу): V-CL, где

V обозначает вариабельный домен (iv), и CL обозначает константный домен (vi).

V и CL могут быть соединены через линкер, как описано выше, или могут быть соединены друг с другом непосредственно.

Также предпочтительно, если вторая полипептидная цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с настоящим изобретением содержит или состоит из (в направлении от N- к С-концу): (V)_A-CL, где обозначение V-CL такое же, как описанное выше, и

A означает целое число от 1 до 5, предпочтительно от 1 до 4, более предпочтительно от 1 до 3 и еще более предпочтительно 1 или 2, и вариабельные домены V могут быть соединены друг с другом непосредственно или через линкер.

Например, вариабельный домен (i) первой полипептидной цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с настоящим изобретением может содержать или состоять из аминокислотной последовательности из числа последовательностей SEQ ID NO: 1, 5, 8 или 10, или из функционального варианта такой последовательности, которая, по меньшей мере, на 80%, предпочтительно, по меньшей мере, на 85%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 90%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, на 95% и, наиболее предпочтительно, по меньшей мере, на 98% идентична последовательности.

Например, вариабельный домен (iv) второй полипептидной цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с настоящим изобретением может содержать или состоять из аминокислотной последовательности из числа последовательностей SEQ ID NO: 1, 5, 8 или 10, или из функционального варианта такой последовательности, которая, по меньшей мере, на 80%, предпочтительно, по меньшей мере, на 85%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 90%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, на 95% и, наиболее предпочтительно, по меньшей мере, на 98% идентична последовательности.

кислотной последовательности из числа последовательностей SEQ ID NO 2, 6, 9 или 11, или из функционального варианта такой последовательности, которая, по меньшей мере, на 80%, предпочтительно, по меньшей мере, на 85%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 90%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, на 95% и, наиболее предпочтительно, по меньшей мере, на 98% идентична последовательности.

Предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением содержит одну или две первые полипептидные цепи и одну или две вторые полипептидные цепи. Примеры таких антител или их антигенсвязывающих фрагментов показаны на фиг. 1Б и 1В. Также предпочтительно, чтобы первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь были связаны дисульфидной связью, образуя тем самым пару. В частности, тяжелая цепь и легкая цепь антитела или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением могут быть связаны дисульфидной связью, образуя тем самым пару. Кроме того, также предпочтительно, чтобы антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержали две первые полипептидные цепи и две вторые полипептидные цепи, и чтобы две первые полипептидные цепи и/или две вторые полипептидные цепи были связаны одной или несколькими, например, двумя, дисульфидными связями. В частности, две тяжелые цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента могут быть связаны одной или несколькими связями, например, двумя дисульфидными связями.

Предпочтительно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением является двухвалентным для каждой специфичности/антигена. В частности, предпочтительно, чтобы (дополнительный) функциональный домен (домены) содержал или состоял из (независимых) сайта (сайтов) связывания и (1) (независимого) сайта (сайтов) связывания и (2) антигенсвязывающего сайта (сайтов), образованных одним или несколькими переменными доменами первой пары первой и второй полипептидных цепей, соответствует (1) (независимому) сайту (сайтам) связывания и (2) антиген связывающий сайт (сайты), образованный одним или несколькими переменными доменами второй пары первой и второй полипептидных цепей. В другом варианте осуществления настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть одновалентными для каждой специфичности (антигена).

Соответственно, предпочтительно, чтобы антигенсвязывающий сайт (сайты), образованный одним или несколькими переменными доменами первой пары первой и второй полипептидных цепей, и антигенсвязывающий сайт (сайты), образованный одним или несколькими переменными доменами второй пары первой и второй полипептидных цепей, были одинаковыми или различными.

Кроме того, предпочтительно, чтобы антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением содержало по меньшей мере два (дополнительных) функциональных домена, которые могут быть одинаковыми или разными. Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением может содержать 2 или 4 (дополнительных) функциональных доменов, которые могут быть одинаковыми или разными.

Если антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению содержат более одного (дополнительного) функционального домена, например, в одной и той же или в разных полипептидных цепях, (дополнительные) функциональные домены могут быть одинаковыми или разными. Предпочтительно, они могут принадлежать к той же или отдельной группе функциональных доменов. Например, по меньшей мере два или все (дополнительные) функциональные домены могут содержать или состоять из (независимых) сайтов связывания. Например, по меньшей мере два или все (дополнительные) функциональные домены могут содержать или состоять из несущих доменов. Например, по меньшей мере два или все (дополнительные) функциональные домены могут содержать или состоять из репортерных доменов. Например, по меньшей мере два или все (дополнительные) функциональные домены могут содержать или состоять из меток. Например, по меньшей мере два или все (дополнительные) функциональные домены могут содержать или состоять из доменов локализации. Даже если (дополнительные) функциональные домены принадлежат к одной и той же группе функциональных доменов, подгруппа и, в частности, их аминокислотная последовательность, по-прежнему могут быть одинаковыми или разными. Например, по меньшей мере два или все (дополнительные) функциональные домены могут содержать или состоять из одинаковых аминокислотных последовательностей. В другом варианте осуществления настоящего изобретения также предпочтительно, чтобы (дополнительные) функциональные домены принадлежали к определенной группе функциональных доменов. Например, один (дополнительный) функциональный домен может содержать или состоять из (независимого) сайта связывания, тогда как другой (дополнительный) функциональный домен антитела или антигенсвязывающего фрагмента может содержать или состоять из несущего домена. Например, один (дополнительный) функциональный домен может содержать или состоять из (независимого) сайта связывания, тогда как другой (дополнительный) функциональный домен антитела или антигенсвязывающего фрагмента может содержать или состоять из репортерного домена. Например, один (дополнительный) функциональный домен может содержать или состоять из (независимого) сайта связывания, тогда как другой (дополнительный) функциональный домен антитела или антигенсвязывающего фрагмента может содержать или состоять из метки. Например, один (дополнительный) функциональный домен может содержать или состоять из (независи-

мого) сайта связывания, тогда как другой (дополнительный) функциональный домен антитела или антигенсвязывающего фрагмента может содержать или состоять из домена локализации. Например, один (дополнительный) функциональный домен может содержать или состоять из несущего домена, тогда как другой (дополнительный) функциональный домен антитела или антигенсвязывающего фрагмента может содержать или состоять из репортерного домена. Например, один (дополнительный) функциональный домен может содержать или состоять из домена-носителя, тогда как другой (дополнительный) функциональный домен антитела или антигенсвязывающего фрагмента может содержать или состоять из метки. Например, один (дополнительный) функциональный домен может содержать или состоять из домена-носителя, тогда как другой (дополнительный) функциональный домен антитела или антигенсвязывающего фрагмента может содержать или состоять из домена локализации. Например, один (дополнительный) функциональный домен может включать или состоять из репортерного домена, тогда как другой (дополнительный) функциональный домен антитела или антигенсвязывающего фрагмента может содержать или состоять из метки. Например, один (дополнительный) функциональный домен может содержать или состоять из репортерного домена, тогда как другой (дополнительный) функциональный домен антитела или антигенсвязывающего фрагмента может содержать или состоять из домена локализации. Например, один (дополнительный) функциональный домен может содержать или состоять из домена локализации, тогда как другой (дополнительный) функциональный домен антитела или антигенсвязывающего фрагмента может содержать или состоять из метки.

Кроме того, предпочтительно, чтобы антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением содержали две первые полипептидные цепи и две вторые полипептидные цепи, образующие первую и вторую пару первой и второй полипептидных цепей, и где первая пара первой и второй полипептидных цепей содержит, по меньшей мере, один (дополнительный) функциональный домен (домены) и/или вторая пара первой и второй полипептидных цепей содержит, по меньшей мере, один (дополнительный) функциональный домен (домены). Например, первая пара первой и второй полипептидных цепей может содержать, по меньшей мере, один (дополнительный) функциональный домен (домены), тогда как вторая пара первой и второй полипептидных цепей может не содержать (дополнительного) функционального домена. Например, первая пара первой и второй полипептидных цепей может не содержать (дополнительного) функционального домена, тогда как вторая пара первой и второй полипептидных цепей может содержать по меньшей мере один (дополнительный) функциональный домен (ы). В большинстве случаев первая пара первой и второй полипептидных цепей содержит, по меньшей мере, один (дополнительный) функциональный домен (домены), а вторая пара первой и второй полипептидных цепей содержит, по меньшей мере, один (дополнительный) функциональный домен (домены).

Предпочтительно, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением является производным IgG-подобного антитела, Fab или F(ab)₂. То есть, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит все переменные и константные области IgG-подобного антитела, Fab или F(ab)₂. В частности, IgG-подобное антитело, Fab или F(ab)₂, могут быть использованы в качестве "каркасных" антител, в область изгиба которых инсертирован (дополнительный) функциональный домен.

Предпочтительно, два или более переменных домена (i) и (iv) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с настоящим изобретением являются производными от моноклонального антитела. В частности, два или более переменных домена (i) и (iv) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению являются (соответствуют) двум или более переменным доменам моноклонального антитела.

Также предпочтительно, чтобы переменные домены и/или константные домены антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению были от антитела человека или были гуманизированными. В частности, переменные домены и/или константные домены антитела или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением соответствуют переменным доменам и/или константным доменам антитела человека, или гуманизированного антитела, или их антигенсвязывающего фрагмента.

Предпочтительно (дополнительный) функциональный домен (домены) антитела или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением содержат или состоят из аминокислотной последовательности, которая является последовательностью антитела человека или гуманизированной.

Предпочтительно, первая полипептидная цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с настоящим изобретением содержит или состоит из какой-либо аминокислотной последовательности из числа последовательностей SEQ ID NO: 53, 55, 56, 58, 59, 60, 61, 62, 64, 65, 66, 68, 69 или 70, который, по меньшей мере, на 80%, предпочтительно, по меньшей мере, на 85%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 90%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, на 95% и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 98% идентичен последовательности, и/или вторая полипептидная цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с настоящим изобретением содержит или состоит из какой-либо аминокислотной последовательности из числа последовательностей

SEQ ID NO 54 57, 63 или 67, или функционального варианта последовательности, который, по меньшей мере, на 80%, предпочтительно, по меньшей мере, на 85%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 90%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, на 95% и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 98% идентичен последовательности.

Предпочтительно, первая и/или вторая полипептидная цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с настоящим изобретением могут не содержать или не состоять из какой-либо аминокислотной последовательности из числа последовательностей SEQ ID NO: 75-92. Также предпочтительно, чтобы первая и/или вторая полипептидная цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с настоящим изобретением не могли содержать или состоять из какой-либо аминокислотной последовательности из числа последовательностей SEQ ID NO 96-112. Более предпочтительно, первая и/или вторая полипептидная цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению не могли содержать или состоять из какой-либо аминокислотной последовательности из числа последовательностей SEQ ID № 75-95. Еще более предпочтительно, (дополнительный) функциональный домен, состоящий из первой и/или второй полипептидной цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, согласно настоящему изобретению может не содержать или не состоять из какой-либо аминокислотной последовательности из числа последовательностей SEQ ID NO: 113-130. Еще более предпочтительно, (дополнительный) функциональный домен, включенный в первую и/или вторую полипептидную цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, в соответствии с настоящим изобретением может не содержать или не состоять из какой-либо аминокислотной последовательности из числа последовательностей SEQ ID NO: 113-133. Наиболее предпочтительно, первая и/или вторая полипептидная цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению могут не содержать или не состоять из какой-либо аминокислотной последовательности из числа последовательностей SEQ ID NO: 75 - 133. Необязательно, (дополнительный) функциональный домен, состоящий из первой и/или второй полипептидной цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, по настоящему изобретению может не содержать или не состоять из (мутированного) фрагмента LAIR1.

Молекула нуклеиновой кислоты.

Другой объект настоящего изобретения относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей первый полинуклеотид, кодирующий первую полипептидную цепь антитела или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению, и/или второй полипептид, кодирующий вторую полипептидную цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с настоящим изобретением.

Молекула нуклеиновой кислоты является молекулой, предпочтительно состоящей из компонентов нуклеиновой кислоты. Понятие "молекула нуклеиновой кислоты" предпочтительно относится к молекулам ДНК или РНК. В частности, его используют в качестве синонима понятия "полинуклеотид". Предпочтительно молекула нуклеиновой кислоты представляет собой полимер, содержащий или состоящий из нуклеотидных мономеров, которые ковалентно связаны друг с другом фосфодиэфирными связями сахара/фосфатного каркаса молекулы. Понятие "молекула нуклеиновой кислоты" также охватывает модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты, например, с модифицированными основаниями, модифицированными сахарами, с модифицированным каркасом и т.д., молекул ДНК или РНК.

Предпочтительно, молекула нуклеиновой кислоты является молекулой ДНК или РНК. К примерам молекул нуклеиновой кислоты и/или полинуклеотидов относятся, например, рекомбинантный полинуклеотид, вектор, олигонуклеотид, молекулы РНК, например, рРНК, мРНК, микроРНК, миРНК или тРНК, или молекулы ДНК, например, кДНК. Предпочтительными являются последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие полностью или частично первую и/или вторую полипептидную цепь. Таким образом, в настоящем изобретении предпочтительно предусматривают последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие полностью или частично легкие и тяжелые цепи, в частности последовательности VH и VL и/или (дополнительные) функциональные домены типичных антител или антигенсвязывающих фрагментов по изобретению.

Также предпочтительно, чтобы молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению включала последовательность нуклеиновой кислоты, которая, по меньшей мере, на 70%, по меньшей мере, на 75%, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 88%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 92%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 96%, по меньшей мере, на 97%, по меньшей мере, на 98% или, по меньшей мере, на 99% идентична с нуклеиновой кислотой, кодирующей (дополнительный) функциональный домен, используемую последовательность VH и/или последовательность VL, используемую в (типичном) антителе или его антигенсвязывающем фрагменте в соответствии с настоящим изобретением.

В общем, молекула нуклеиновой кислоты может быть изменена путем инсерции, делеции или замены определенных последовательностей нуклеиновой кислоты.

Изменения вследствие таких изменений включают, но ими не ограничиваются, изменения для введения сайтов рестрикции, изменения кодонов, добавления или оптимизация регуляторных последовательностей транскрипции и/или трансляции и т.д. Также можно изменить нуклеиновую кислоту, чтобы

изменить закодированные аминокислоты. Например, может быть полезно ввести одну или несколько (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 и т. д.) аминокислотных замещений, делеций и/или вставок в аминокислотные последовательности антител. Такие точечные мутации могут модифицировать эффекторные функции, антигенсвязывающую аффинность, посттрансляционные модификации, иммуногенность и т. д., могут интродуцировать аминокислоты для присоединения ковалентных групп (например, меток) или могут вводить метки (например, для целей очистки). Мутации могут быть введены в конкретные сайты или могут быть введены случайным образом с последующим отбором (например, молекулярная эволюция). Например, одна или несколько нуклеиновых кислот, кодирующих любой из (дополнительных) функциональных доменов, последовательность VH и/или последовательность VL (типичного) антитела по настоящему изобретению, могут быть случайно или направленно мутированы для внедрения различных свойств в кодируемые аминокислоты. Такие изменения могут быть результатом повторяющегося процесса, в котором первоначальные изменения сохраняются и вводятся новые изменения в других положениях нуклеотидов. Кроме того, изменения, достигнутые на независимых этапах, могут быть объединены. Различные свойства, вводимые в кодируемые аминокислоты, могут привести к повышенной аффинности, но этим свойства не ограничиваются.

Вектор.

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает векторы, например векторы экспрессии, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением. Предпочтительно, вектор содержит молекулу нуклеиновой кислоты, соответствующую приведенному выше описанию.

Понятие "вектор" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, предпочтительно к рекомбинантной молекуле нуклеиновой кислоты, то есть молекуле нуклеиновой кислоты, которая не встречается в природе. Вектор в контексте настоящего изобретения пригоден для инкорпорации или хранения требуемой последовательности нуклеиновой кислоты. Такие векторы могут быть векторами хранения, векторами экспрессии, векторами клонирования, векторами переноса и т.д. Вектором хранения является вектор, который обеспечивает удобное хранение молекулы нуклеиновой кислоты. Например, вектор может содержать последовательность, соответствующую, например, требуемому антителу или фрагменту этого антитела по настоящему изобретению. Вектор экспрессии может быть использован для получения продуктов экспрессии, таких как РНК, например, мРНК или пептидов, полипептидов или белков. Например, вектор экспрессии может содержать последовательности, необходимые для транскрипции последовательности участка вектора, например, последовательность промотора. Вектором клонирования обычно является вектор, включающий сайт клонирования, который можно применять для включения последовательностей нуклеиновых кислот в вектор. Клонированием вектором может быть, например, плазмидный вектор или вектор бактериофага. Вектором переноса может быть вектор, который пригоден для переноса молекул нуклеиновой кислоты в клетки или организмы, например, вирусные векторы. Вектор в контексте настоящего изобретения может быть, например, вектором РНК или вектором ДНК. Предпочтительно, вектор является молекулой ДНК. Например, вектор в контексте настоящего изобретения содержит сайт клонирования, маркер отбора, например, фактор устойчивости к антибиотикам, и последовательность, пригодную для размножения вектора, например, начало репликации. Предпочтительно вектор в контексте настоящего изобретения представляет собой плазмидный вектор.

Клетки.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусматривают клетки, экспрессирующие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением, и/или содержащие молекулу нуклеиновой кислоты или вектор в соответствии с настоящим изобретением.

К примерам таких клеток относят, но ими перечень не ограничивается, эукариотические клетки, например дрожжевые клетки, клетки животных или растительные клетки. Предпочтительно, клетки являются клетками млекопитающих, более предпочтительно линией клеток млекопитающих. Предпочтительными примерами являются клетки CHO, клетки HEK293T, клетки PER.C6, клетки NS0, клетки печени человека, клетки миеломы или клетки гибридомы.

В частности, клетка может быть трансфицирована вектором по настоящему изобретению, предпочтительно вектором экспрессии. Понятие "трансфекция" относится к интродукции молекул нуклеиновой кислоты, например, молекул ДНК или РНК (например, мРНК), в клетки, предпочтительно в эукариотические клетки. В контексте настоящего изобретения понятие "трансфекция" охватывает какой-либо метод, известный специалисту, для интродукции молекул нуклеиновой кислоты в клетки, предпочтительно в эукариотические клетки, например, в клетки млекопитающих. Такие методы включают, например, электропорацию, липофекцию, например, методы на основе катионных липидов и/или липосом, осаждения фосфатом кальция, трансфекции на основе наночастиц, трансфекции на основе вируса или трансфекции на основе катионных полимеров, например, DEAE-декстрана или полиэтиленимина и т. д. Предпочтительно, интродукция не является вирусной.

Кроме того, клетки по настоящему изобретению могут стабильно или временно трансфицироваться вектором по настоящему изобретению, например, для экспрессии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с настоящим изобретением. Предпочтительно клетки стабильно трансфици-

руют вектором согласно настоящему изобретению, кодирующим антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, по настоящему изобретению. В другом варианте осуществления настоящего изобретения также предпочтительно, чтобы клетки временно трансфицировали вектором по настоящему изобретению, кодирующим антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, согласно настоящему изобретению.

Композиция.

Настоящее изобретение также предусматривает композицию, включающую один или несколько из следующих компонентов:

- (i) антитело или его фрагмент по настоящему изобретению,
- (ii) молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению,
- (iii) вектор, включающий нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению, и/или
- (iv) клетки, экспрессирующие антитело по настоящему изобретению, и/или включающие вектор или молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению.

Таким образом, настоящее изобретение также предусматривает композицию, содержащую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в соответствии с настоящим изобретением, нуклеиновую кислоту, в соответствии с настоящим изобретением, вектор, в соответствии с настоящим изобретением, и/или клетку в соответствии с настоящим изобретением.

Предпочтительно, композиция является фармацевтической композицией. Фармацевтическая композиция также предпочтительно может содержать фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель и/или эксципиент. Хотя эксципиент может облегчать введение, сам по себе он не должен вызывать выработку антител, вредных для индивидуума, которому вводят композицию. Также не должно быть токсичности от введения. Подходящими носителями могут быть крупные медленно метаболизируемые макромолекулы, такие как белки, полипептиды, липосомы, полисахариды, полимолочные кислоты, полиглицолевые кислоты, полимерные аминокислоты, аминокислотные сополимеры и неактивные вирусные частицы. В общем, фармацевтически приемлемые носители в фармацевтической композиции по настоящему изобретению могут быть активными компонентами или неактивными компонентами.

Можно использовать фармацевтически приемлемые соли, например, соли минеральных кислот, такие как гидрохлориды, гидробромиды, фосфаты и сульфаты, или соли органических кислот, такие как ацетаты, пропионаты, малонаты и бензоаты.

Фармацевтически приемлемые носители в фармацевтической композиции могут дополнительно содержать жидкости, например, воду, физиологический раствор, глицерин и этанол. Кроме того, в таких композициях могут присутствовать вспомогательные вещества, например, увлажняющие или эмульгирующие агенты, или pH-буферные вещества. Такие эксципиенты позволяют составлять фармацевтические композиции в виде таблеток, пилюль, драже, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, суспензий и суспензий для приема внутрь субъектом.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть приготовлены в различных формах. Например, композиции могут быть приготовлены в виде инъекционных препаратов, либо в виде жидких растворов, либо в виде суспензий. Также могут быть приготовлены твердые формы, пригодные для растворения или суспендирования в жидких носителях перед инъекцией, (например, лиофилизованная композиция, такая как Synagis™ и Herceptin™, для разведения стерильной водой, содержащей консервант). Композиция может быть приготовлена, например, в виде мази, крема или порошка. Композиция может быть приготовлена, например, в виде таблетки или капсулы, в виде спрея или в виде сиропа (необязательно ароматизированного). Композиция может быть приготовлена, например, в виде ингалятора с использованием мелко измельченного порошка или спрея. Композиция может быть приготовлена, например, в виде капель. Композиция может быть в форме набора, составленного таким образом, что комбинированная композиция могла быть восстановлена, например, непосредственно перед введением. Например, лиофилизованное антитело может быть предусмотрено в наборе со стерильной водой или стерильным буфером.

Предпочтительно, чтобы активный ингредиент в композиции был молекулами антитела, фрагментом антитела или его вариантами и производными, в частности, чтобы активный ингредиент в композиции был антителом, фрагментом антитела или его вариантами и производными в соответствии с настоящим изобретением. Композиция может содержать агенты, которые защищают антитело от разрушения в желудочно-кишечном тракте, но которые высвобождают антитело после его абсорбции из желудочно-кишечного тракта.

Подробное обсуждение фармацевтически приемлемых носителей приведено в книге: Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20e изд., ISBN: 0683306472.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению обычно имеют pH 5,5-8,5, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения pH может быть 6-8, а в других вариантах осуществления настоящего изобретения pH около 7. pH может поддерживаться за счет применения буфера. Композиция может быть стерильной и/или апиrogenной. Композиция может быть изотонической по отношению к человеку. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения фармацевтические композиции изобретения по настоящему изобретению поставляют в герметично закупоренных контейнерах.

Композиция может быть в форме суспензии, раствора или эмульсии в масляном или водном носи-

теле и, в частности, она может содержать вспомогательные вещества, например, суспендирующие, консервирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. В другом варианте осуществления настоящего изобретения молекула антитела может быть в сухой форме для восстановления соответствующей стерильной жидкостью перед применением.

Композиция может содержать разбавитель, например, воду или физиологический раствор. Понятие "разбавитель" обычно означает материал, который пригоден для хранения, транспортировки и/или введения соединения, например, фармацевтически активного соединения, в частности антитела по настоящему изобретению. Например, разбавитель может быть физиологически приемлемой жидкостью, которая пригодна для хранения, транспортировки и/или введения фармацевтически активного соединения, в частности антител по настоящему изобретению.

Композиция может быть водным раствором, который не содержит пирогенов и имеет подходящий pH, изотоничен и стабилен. Специалисты в данной области техники могут приготовить пригодные растворы, используя, например, изотонические разбавители, например, инъекционный раствор хлорида натрия, инъекционный раствор Рингера, инъекционный раствор Рингера лактат. При необходимости могут быть включены консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки. Композиция по настоящему изобретению может быть предоставлена, например, в предварительно заполненном шприце.

Композиция, согласно приведенному выше описанию, также может быть в дозированной форме, включая, но не ограничиваясь ими, капсулы, таблетки, водные суспензии или растворы. В случае таблеток также обычно добавляют такие используемые носители, как лактозу и кукурузный крахмал. Также обычно добавляют смазывающие агенты, например, стеарат магния. Для капсул полезные разбавители включают лактозу и высушенный кукурузный крахмал.

Когда требуются водные суспензии, активный ингредиент может быть объединен с эмульгирующими и суспендирующими агентами. При желании также могут быть добавлены определенные подсластители, ароматизаторы или красители.

Дополнительные примеры носителей, входящих в состав композиции, включают, но ими не ограничиваются, минеральное масло, жидкий вазелин, белый вазелин, пропиленгликоль, полиоксиэтилен, соединение полиоксипропилена, эмульгирующий воск и воду. В другом варианте композиции может быть переработана в виде подходящего лосьона или крема. В контексте настоящего изобретения к подходящим носителям относят, но ими перечень не ограничивают, минеральное масло, моностеарат сорбитана, полисорбат 60, воск цетиловых эфиров, цетеариловый спирт, 2-октилдодеканол, бензиловый спирт и воду.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения композиция по настоящему изобретению может включать антитела по настоящему изобретению, где антитела могут составлять, по меньшей мере, 50 мас.% (например, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% или более) от общего белка в композиции. В такой композиции антитела предпочтительно находятся в очищенной форме.

Фармацевтические композиции могут включать антимикробное средство, особенно если оно упаковано в формате многократных доз. Они могут содержать детергент, например, твин (полисорбат), например, твин-80. Детергенты обычно включают в низкой концентрации, например менее 0,01%. Композиции могут также включать соли натрия (например, хлорид натрия) для обеспечения тоничности. Например, концентрация NaCl 10 ± 2 мг/мл является обычно применяемой.

Дополнительно фармацевтические композиции могут содержать сахарный спирт (например, маннит) или дисахарид (например, сахарозу или трегалозу), например, в количестве примерно 15-30 мг/мл (например, 25 мг/мл), особенно, если они должны быть лиофилизированы. или если они включают материал, который был восстановлен из лиофилизованного материала. pH композиции для лиофилизации может быть доведен до 5-8, или от 5,5 до 7, или быть примерно равным 6,1 до лиофилизации.

Композиции по настоящему изобретению также могут содержать один или несколько иммунорегулирующих агентов. В одном варианте осуществления настоящего изобретения один или несколько иммунорегулирующих агентов содержат адьювант.

Выработка антител.

Антитела по настоящему изобретению могут быть получены каким-либо методом, известным в данной области. Например, каркасное антитело может быть предусмотрено и генетически сконструировано в области (в областях) изгиба. Для получения каркасного антитела, например, хорошо известна общая методология получения моноклональных антител с использованием гибридной технологии (Kohler G., Milstein C, 1975; Kozbar с соавт., 1983). В частности, может использоваться другой метод, а именно метод иммортализации EBV, описанный в WO 2004/076677.

Предпочтительный метод описан в WO 2004/076677. В этом методе В-клетки, вырабатывающие антитело по настоящему изобретению, трансформируют вирусом Эпштейна-Барра (EBV) и активатором поликлональных В-клеток. Дополнительные стимуляторы клеточного роста и дифференциации могут быть необязательно добавлены во время стадии трансформации для дополнительного повышения эффективности. Этими стимуляторами могут быть цитокины, например, IL-2 и IL-15. Другой объект настоящего

го изобретения предусматривает добавление П-2 при проведении иммортализации для дополнительного повышения, но его использование не является обязательным. Иммортализованные В-клетки, полученные с использованием этих методов, затем можно культивировать с использованием методов, известных в данной области, использовать выделенные из них антитела.

Другой предпочтительный метод описан в WO 2010/046775. В этом методе клетки плазмы культивируют в ограниченном количестве или в виде отдельных плазматических клеток в микропланшетах для культивирования. Антитела могут быть выделены из культур клеток плазмы. Кроме того, из культур клеток плазмы можно выделить РНК и провести ПЦР методами, известными в данной области. Области VH и VL антител могут быть амплифицированы с помощью ОТ-ПЦР (ПЦР с обратной транскриптазой), секвенированы и клонированы в векторе экспрессии, который затем трансфицируют в клетки HEK293T или другие клетки-хозяева. Клонирование нуклеиновой кислоты в векторах экспрессии, трансфекцию клеток-хозяев, культивирование трансфицированных клеток-хозяев и выделение наработанного антитела можно проводить с использованием каких-либо методов, известных специалистам в данной области.

Фрагменты антител по настоящему изобретению могут быть получены из антител методами, которые включают расщепление ферментами, например, пепсином или папаином, и/или расщеплением дисульфидных связей путем химического восстановления. В другом варианте осуществления настоящего изобретения фрагменты антител могут быть получены путем клонирования и экспрессии части последовательностей тяжелых или легких цепей. К понятию "фрагменты" антител относят фрагменты Fab, Fab' и F(ab')₂.

Например, настоящее изобретение также предусматривает метод получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, включающий:

трансформацию эукариотической клетки-хозяина методом (например, описанным выше) включения одной или нескольких молекул нуклеиновой кислоты, например, описанных выше, кодирующих первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, например, в вектор по настоящему изобретению, как описано выше,

культивирование клетки-хозяина в подходящих условиях, обеспечивающих экспрессию указанных молекул нуклеиновой кислоты,

вызывая или допуская указанным первым и вторым полипептидным цепям объединиться с образованием антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и

необязательно, очистку антитела или его антигенсвязывающего фрагмента от культуральной среды.

Стандартные методы молекулярной биологии могут быть использованы для получения последовательностей ДНК, кодирующих антитела или фрагменты антител по настоящему изобретению. Необходимые последовательности ДНК могут быть синтезированы полностью или частично методами синтеза олигонуклеотидов. При необходимости могут быть использованы методы сайт-направленного мутагенеза и полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Какая-либо подходящая система клеток-хозяев/векторов может быть применима для экспрессии последовательностей ДНК, кодирующих молекулы антител по настоящему изобретению или их фрагменты. Бактериальные, например, E.coli, и другие микробные системы могут быть частично применимы для экспрессии фрагментов антител, например, фрагменты Fab и F(ab')₂, и особенно фрагментов Fv и фрагментов одноцепочечных антител, например одноцепочечных Fvs. Эукариотические системы экспрессии в клетках-хозяевах, например, млекопитающих, могут быть использованы для выработки более крупных молекул антител, включая полные молекулы антител. Пригодные для этой цели клетки-хозяева млекопитающих включают, но не ограничиваются ими, клетки CHO, HEK293T, PER.C6, NS0, миеломы или гибридомы.

Например, линия клеток может быть трансфицирована двумя векторами, первым вектором, кодирующим первую полипептидную цепь, например, полипептид тяжелой цепи, и вторым вектором, кодирующим вторую полипептидную цепь, например полипептид легкой цепи. В другом варианте осуществления настоящего изобретения может быть применен один вектор, включающий последовательности, кодирующие первую и вторую полипептидные цепи, например, полипептиды легкой цепи и тяжелой цепи.

При желании антитела могут быть дополнительно очищены, используя фильтрацию, центрифугирование и различные хроматографические методы, например, ВЭЖХ или аффинную хроматографию. Методы очистки антител, например, моноклональных антител, включая методы получения антител фармацевтического качества, хорошо известны в данной области.

Методы и применения.

Другой объект настоящего изобретения предусматривает антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектора по настоящему изобретению, клетки по настоящему изобретению или (фармацевтической) композиции по настоящему изобретению для применения в медицине.

Соответственно, настоящее изобретение также предусматривает метод предотвращения или лечения заболевания или расстройства у субъекта, включающий стадию введения субъекту антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, нуклеиновой кислоты по настоящему

изобретению, вектора по настоящему изобретению, клетки по настоящему изобретению или (фармацевтической) композиции по настоящему изобретению.

Очевидно, что одну или более специфичностей/специфичностей антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с настоящим изобретением можно выбирать в соответствии с заболеванием или расстройством, которое необходимо предотвратить и/или лечить. Например, для профилактики и/или лечения малярии антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может содержать специфичность в отношении малярийного антигена, например, сайт связывания антигена (образованный вариабельными доменами) и/или (дополнительный) функциональный домен в области изгиба, который специфически связывается с антигеном малярии. Примером является мутировавший фрагмент LAIR1, описанный в настоящем изобретении, в частности мутировавший фрагмент LAIR1, описанный в WO 2016/207402 A1, например, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 или вариант ее последовательности, которая, по меньшей мере, на 70%, предпочтительно, по меньшей мере, на 75%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 80%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, на 85%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, на 88%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 92%, по меньшей мере, на 95%, и еще более предпочтительно, по меньшей мере, на 98% идентична последовательности. Антитело, обладающее такой специфичностью (такой (антигенный) сайт связывания), может быть особенно полезным для обеспечения иммунитета к малярийным паразитам в крови (в частности, к *Plasmodium falciparum*).

К заболеваниям, подлежащим лечению и/или профилактике с использованием антитела/антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектора по настоящему изобретению, клеток по настоящему изобретению, или композиции по настоящему изобретению относятся рак, инфекционные заболевания и аутоиммунные расстройства. Причем лечение и/или профилактика рака и/или инфекционных заболеваний является предпочтительным.

Предпочтительно, антитело/антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектор по настоящему изобретению, клетка по настоящему изобретению или композиция по настоящему изобретению могут быть применимы для (приготовления лекарственного средства) для профилактики, лечения и/или облегчения состояния при раке или опухолевых заболеваниях. В целом, понятие "рак" означает солидные опухоли, в частности злокачественные солидные опухоли, например, саркомы, карциномы и лимфомы, и рак крови, такой как лейкоз. К раку относят карциномы, саркомы, лимфомы, лейкозы, опухоли половых клеток и бластомы.

Предпочтительно, антитело/антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектор по настоящему изобретению, клетка по настоящему изобретению или композиция по настоящему изобретению могут быть применимы для (приготовления лекарственного средства) для профилактики, лечения и/или облегчения состояния при инфекционных заболеваниях. К инфекционным заболеваниям относят вирусные, ретровирусные, бактериальные и протозойные инфекционные заболевания.

Более того, антитело/антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, вектор по настоящему изобретению, клетка по настоящему изобретению или композиция по настоящему изобретению могут быть применимы для (приготовления лекарственного средства) для профилактики, лечения и/или облегчения состояния при аутоиммунных заболеваниях. Обычно аутоиммунные заболевания возникают из-за ненормального иммунного ответа организма на вещества и ткани, в норме присутствующие в организме (аутоиммунитет). Это может быть ограничено определенными органами или может включать определенную ткань, локализованную в разных местах. Аутоиммунные заболевания могут быть классифицированы по соответствующему типу гиперчувствительности: тип I (то есть крапивница, вызванная аутологичной сывороткой), тип II, тип III или тип IV.

Кроме того, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, нуклеиновая кислоты по настоящему изобретению, вектор по настоящему изобретению, клетка по настоящему изобретению или (фармацевтическая) композиция по настоящему изобретению также могут быть применимы для (in vitro) диагностики. Методы диагностики могут включать контактирование антитела или фрагмента антитела с образцом. Такие образцы могут быть выделены от субъекта, например, из изолированного образца ткани, взятого, например, из носовых ходов, синусовых пазух, слюнных желез, легких, печени, поджелудочной железы, почек, ушей, глаз, плаценты, пищеварительного тракта, сердца, яичников, гипофиза, надпочечников, щитовидной железы, мозга, кожи или крови, плазмы или сыворотки. Методы диагностики могут также включать обнаружение комплекса антиген/антитело, в частности, после контакта антитела или фрагмента антитела с образцом. Такой этап обнаружения обычно выполняется на стенде, то есть без какого-либо контакта с телом человека или животного. Примеры методов детектирования хорошо известны специалисту в данной области и включают, например, метод ELISA (иммуноферментный анализ).

Также для диагностики следует учитывать, что одну или более специфичности/специфичностей антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с настоящим изобретением можно выби-

рять в соответствии с заболеванием или расстройством, которое необходимо предотвратить и/или лечить, по существу, как это описано выше для профилактики и/или лечения заболеваний.

Кроме того, настоящее изобретение также предусматривает анализ для обнаружения антигена или количественного определения связывания антигена, включающий:

инкубирование антигена с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом в соответствии с настоящим изобретением в условиях, которые позволяют связывать антиген с поливалентным антителом, и

обнаружение связывания антигена с антителом.

Например, такой анализ может быть полезен в контексте диагностики, как описано выше.

Краткое описание фигур

Далее будет дано краткое описание прилагаемых фигур. Фигуры предназначены для более подробной иллюстрации настоящего изобретения. Однако они никоим образом не предназначены для ограничения рамок охвата настоящего изобретения.

Фиг. 1(A). Классическое моноспецифическое антитело, содержащее две тяжелые цепи (серого цвета), каждая с одним переменным доменом VH и тремя константными доменами CH1, CH2 и CH3, и две легкие цепи (белого цвета), каждая с одним переменным доменом VL и одной константной областью CL. Область изгиба обозначена стрелками.

Фиг. 1(B). Предпочтительные примеры антител по настоящему изобретению (молекулы Ig "с инсерцией в область изгиба; IЕI-Ig"), полученных из классического моноспецифического антитела, показанного на фиг. 1A): антитело, содержащее один (дополнительный) функциональный домен в области изгиба каждой тяжелой цепи, но не содержит инсерцию в области изгиба легкой цепи; антитело, содержащее один (дополнительный) функциональный домен в области изгиба каждой легкой цепи, но не содержит инсерцию в тяжелой цепи; антитело, содержащее один (дополнительный) функциональный домен в области изгиба каждой тяжелой цепи и каждой легкой цепи; антитело, содержащее два (дополнительных) функциональных домена в области изгиба каждой тяжелой цепи, но без инсерции в область изгиба в легкой цепи; и антитело, содержащее два (дополнительных) функциональных домена в области изгиба каждой легкой цепи, но без инсерции в область изгиба тяжелой цепи.

Фиг. 1(B). Предпочтительные примеры антигенсвязывающих фрагментов и антител по настоящему изобретению (молекулы Ig "с инсерцией в область изгиба; IЕI-Ig"), полученных из классического моноспецифического антитела, показанного на фиг. 1A): производных от фрагментов антител или от биспецифических антител: фрагмент F(ab)₂, включающий один (дополнительный) функциональный домен в области изгиба каждой тяжелой цепи, но без инсерции в область изгиба в легкой цепи; фрагмент Fab, включающий один (дополнительный) функциональный домен в области изгиба каждой легкой цепи, но без инсерции в область изгиба в тяжелой цепи; антитела с заменами CrossMab/Knobs-in-holes/orthogonal Fab/Fab-arm, содержащие один (дополнительный) функциональный домен в области изгиба одной тяжелой цепи, но без инсерции в область изгиба в легких цепях и в другой тяжелой цепи; scFv-(H)IgG, содержащее один (дополнительный) функциональный домен в области изгиба каждой тяжелой цепи, но без инсерции в область изгиба в легкой цепи; IgG(H)-scFv, содержащее один (дополнительный) функциональный домен в области изгиба каждой тяжелой цепи, но без инсерции в область изгиба в легкой цепи; scFv-(L)IgG, содержащее один (дополнительный) функциональный домен в области изгиба каждой тяжелой цепи, но без инсерции в область изгиба в легкой цепи; IgG(L)-scFv, содержащее один (дополнительный) функциональный домен в области изгиба каждой тяжелой цепи, но без инсерции в область изгиба в легкой цепи; и DVD-Ig, содержащее один (дополнительный) функциональный домен в области изгиба каждой тяжелой цепи, но без инсерции в область изгиба в легкой цепи.

Фиг. 2. Схема из примера 1 семи конструкций антител по настоящему изобретению (с C2 по C8) и сравнение с каркасными антителами (GCE536, C1).

Фиг. 3. Величины EC₅₀ из примера 2, определенные с помощью нелинейного регрессионного анализа значений связывания (OD) и относительных концентраций антител в тестах ELISA, выполненных с использованием набора антигенов или антител против домена. Конструкции также тестировали на связывание с IЕ (изolat 9215), и показаны значения связывания (%) для концентрации 1 мкг/мл.

Фиг. 4. Пример 3. Показаны кривые SPR-связывания (методом поверхностного плазмонного резонанса - surface plasmon resonance - SPR) C4 и различные контроли к GM-CSF и коллаген. C4 и C5, которые используют GCE536 в качестве каркаса, связываются с GM-CSF, но только C4 затем связывается с коллагеном. Неспецифические антитела к FI174 и коллаген-специфические антитела MGD^{UCA} не показывают какого-либо специфического сигнала связывания.

Фиг. 5. Пример 3. Показаны кривые SPR-связывания C4 и различных контролей к GM-CSF и коллагену. C4 и GCE536 связываются с GM-CSF, но только C4 потом распознается коллагеном. Коллаген-специфическое антитело MGD^{UCA} связывается только с коллагеном. Контрольное антитело TT107 представляет собой TT-специфическое моноклональное антитело, которое не показывает какого-либо специфического сигнала связывания в эксперименте SPR.

Фиг. 6. Пример 4. Кривые ELISA связывания конструкций C5, C5b, C6 и C6b с GM-CSF или анти-PD1 или анти-SLAM антителами по сравнению с каркасным антителом (GCE536). PD1-содержащие C5 и

C5b и SLAM-содержащие C6 и C6b-конструкции распознаются анти-PD1 или анти-SLAM антителами, соответственно. Все конструкции связываются с GM-CSF как GCE536. Наличие линкеров в C5b и C6 не влияет на связывание.

Фиг. 7. Пример 6. Кривые ELISA связывания антитела Strep-tactin с конструкцией C9 по сравнению с каркасом C1b. Двойная Strep-tag, инsertированная в область изгиба конструкции C9, специфически распознается антителом к Strep-tactin.

Фиг. 8. Пример 7. Схема четырех дополнительных конструкций (с C9 по C12) и их сравнение с каркасным антителом (FI174).

Фиг. 9. Пример 8. Кривые SPR связывания C9 и C10 и различных контролей для H1 и TT. C9 и C10 показывают двойное связывание как с H1, так и с TT. TT107 является TT-специфическим моноклональным антителом.

Фиг. 10. Пример 8. Кривые SPR связывания C11 и C12 и различных контролей для белка H1 и RSV F. C11 и C12 демонстрируют двойное связывание с белками F H1 и RSV. MPE8 представляет собой белок-специфичное моноклональное антитело к F RSV.

Примеры.

Ниже представлены конкретные примеры, иллюстрирующие различные варианты осуществления и объекты настоящего изобретения. Однако настоящее изобретение не ограничено в рамках своего охвата приводимыми примерами его осуществления. Приводимые ниже препараты и примеры даны для того, чтобы дать возможность специалистам в данной области техники более четко понять и применить настоящее изобретение. Приводимые ниже варианты осуществления настоящего изобретения предназначены только для иллюстрации отдельных объектов и способов настоящего изобретения, которые являются функционально эквивалентными и находятся в рамках охвата настоящего изобретения. В самом деле, различные модификации изобретения в дополнение к тем, которые описаны здесь, станут очевидными для специалистов в данной области техники из предшествующего описания, приводимых фигур и примеров. Все такие модификации соответствуют прилагаемой формуле настоящего изобретения.

Пример 1. Разработка и конструирование вариантов антител путем инсерции различных Ig-подобных функциональных доменов в область изгиба каркасных антител.

Чтобы исследовать воздействие различных (дополнительных) функциональных доменов, инsertированных в область изгиба антитела, на специфичность антитела, конструируют семь различных конструкций (названных "C2-C8"), в которых в область изгиба антитела, используемого в качестве каркаса, инsertируют немутантный LAIR1 (SEQ ID NO: 12), мутантный LAIR1 (SEQ ID NO: 13) или другие Ig-подобные домены. Конструкции C2-C3 имеют такую же полную константную область тяжелой цепи, что и конструкция C1 (VH: SEQ ID NO: 5, VL: SEQ ID NO: 6, константная область тяжелой цепи: SEQ ID NO: 3, константная область легкой цепи: SEQ ID NO: 7). Конструкции C4-C6 имеют такую же полную константную область тяжелой цепи, что и антитело GCE536 (VH: SEQ ID NO: 1, VL: SEQ ID NO: 2, константная область тяжелой цепи: SEQ ID NO: 3, константная область легкой цепи каппа: SEQ ID NO: 4; Piccoli L. с соавт., Nature messages 6, 2015, 7375). Конструкции C7-C8 имеют ту же полную константную область тяжелой цепи, что и конструкция C1b (VH: SEQ ID NO: 8, VL: SEQ ID NO: 9, константная область тяжелой цепи: SEQ ID NO: 3, константная область легкой цепи: SEQ ID NO: 4). Легкая цепь конструкций не была модифицирована по сравнению с каркасными антителами. Все конструкции окончательно экспрессируют в виде моноклональных антител (тяжелые и легкие цепи).

Приводимые ниже полученные конструкции схематично показаны на фиг. 2.

1. Обозначение "C1" (VH: SEQ ID NO: 5, VL: SEQ ID NO: 6, константная область тяжелой цепи: SEQ ID NO: 3, константная область лямбда легкой цепи: SEQ ID NO: 7) означает рекомбинантное моноспецифическое антитело, предназначенное для контроля. C1 сформировано следующим образом (в направлении от N- к C-концу): продукт экспрессии генного сегмента V (варибельного) варибельного домена тяжелой цепи ("VH3-30"); продукт экспрессии генного сегмента D (разнообразного) варибельного домена тяжелой цепи ("D"); продукт экспрессии генного сегмента J (соединяющего) элемента варибельного домена тяжелой цепи ("JH6"); продукт экспрессии генного сегмента C (константного) константной области тяжелой цепи (изотип IgG1); и на отдельной цепи: продукт экспрессии генного сегмента V (варибельного) варибельного домена легкой цепи и продукт экспрессии генного сегмента J (соединяющегося) элемента варибельного домена легкой цепи; продукт экспрессии генного сегмента C (константного) константной области лямбда легкой цепи.

2. Обозначение "C1b" (VH: SEQ ID NO: 8, VL: SEQ ID NO: 9, константная область тяжелой цепи: SEQ ID NO: 3, константная область лямбда легкой цепи:

SEQ ID NO: 4) означает рекомбинантное моноспецифическое антитело с целями контроля. C1 сформировано следующим образом (в направлении от N- к C-концу): продукт экспрессии генного сегмента V (варибельного) варибельного домена тяжелой цепи ("VH3-20"); продукт экспрессии генного сегмента D (разнообразного) варибельного домена тяжелой цепи ("D"); продукт экспрессии элемента генного сегмента J (соединяющего) элемента варибельного домена тяжелой цепи C1 ("JH3"); продукт экспрессии генного сегмента C (константного) константной области тяжелой цепи (изотип IgG1); и на отдельной цепи: продукт экспрессии генного сегмента V (варибельного) варибельного домена легкой

цепи и продукт экспрессии элемента генного сегмента J (соединяющегося) переменного домена легкой цепи; продукт экспрессии генного сегмента C (константного) константной области легкой цепи.

3. В конструкцию "C2" мутантный фрагмент LAIR-1 ("LAIR1^{gen}"; SEQ ID NO: 13) инсертируют в область изгиба рекомбинантного моноспецифического антитела "C1" (см. выше). В мутантном фрагменте LAIR1 связывание LAIR1 с коллагеном отменено, но мутантный фрагмент LAIR1 сильно связывается с эритроцитами, инфицированными *P. falciparum* (Tan J. с соавт. Nature 529, 2016, 105-109; WO 2016/207402 A1). Конструкцию "C2" (полная тяжелая цепь: SEQ ID NO: 53, полная легкая цепь: SEQ ID NO: 54) формируют следующим образом (в направлении от N- к C-концу): продукт экспрессии генного сегмента V (переменного) переменного домена тяжелой цепи C1 ("VH3-30"); продукт экспрессии генного сегмента D (разнообразного) переменного домена тяжелой цепи C1 ("D"); продукт экспрессии генного сегмента J (соединяющего) элемента переменного домена тяжелой цепи C1 ("JH6"); продукт экспрессии мутантного фрагмента LAIR-1 MGD21 ("LAIR1^{D21}"); продукт экспрессии генного сегмента C (константного) константной области тяжелой цепи (изотип IgG1); и на отдельной цепи: продукт экспрессии генного сегмента V (переменного) переменного домена легкой цепи C1 и продукт экспрессии генного сегмента J (соединяющегося) элемента переменного домена легкой цепи C1; продукт экспрессии генного сегмента C (константного) константной области легкой цепи.

4. В конструкции "C3" немутантный фрагмент LAIR-1 ("LAIR1^{gen}"; SEQ ID NO: 12) инсертируют в область изгиба рекомбинантного моноспецифического антитела "C1" (см. выше). Конструкцию "C3" (полная тяжелая цепь: SEQ ID NO: 55, полная легкая цепь: SEQ ID NO: 54) формируют следующим образом (в направлении от N- к C-концу): продукт экспрессии генного сегмента V (переменного) переменного домена тяжелой цепи C1 ("VH3-30"); продукт экспрессии генного сегмента D (разнообразного) переменного домена тяжелой цепи C1 ("D"); продукт экспрессии генного сегмента J (соединяющего) элемента переменного домена тяжелой цепи C1 ("JH6"); продукт экспрессии немутантного фрагмента LAIR-1 ("LAIR1^{gen}"); продукт экспрессии генного сегмента C (константного) константной области тяжелой цепи (изотип IgG1); и на отдельной цепи: продукт экспрессии генного сегмента V (переменного) переменного домена легкой цепи C1 и продукт экспрессии генного сегмента J (соединяющегося) элемента переменного домена легкой цепи C1; продукт экспрессии генного сегмента C (константного) константной области легкой цепи.

5. В конструкции "C4" немутантный фрагмент LAIR-1 ("LAIR1^{gen}"; SEQ ID NO: 13) инсертируют в область изгиба антитела GCE536.

Конструкцию "C4" (полная тяжелая цепь: SEQ ID NO: 56, полная легкая цепь: SEQ ID NO: 54) формируют следующим образом (в направлении от N- к C-концу): продукт экспрессии генного сегмента V (переменного) переменного домена тяжелой цепи GCE536 ("VH1-46"); продукт экспрессии генного сегмента D (разнообразного) переменного домена тяжелой цепи GCE536 ("D"); продукт экспрессии генного сегмента J (соединяющего) элемента переменного домена тяжелой цепи GCE536 ("JH6"); продукт экспрессии немутантного фрагмента LAIR-1 ("LAIR1^{gen}"); продукт экспрессии генного сегмента C (константного) константной области тяжелой цепи (изотип IgG1); и на отдельной цепи: продукт экспрессии генного сегмента V (переменного) переменного домена легкой цепи GCE536 и продукт экспрессии генного сегмента J (соединяющегося) элемента переменного домена легкой цепи GCE536; продукт экспрессии генного сегмента C (константного) константной области легкой цепи.

6. В конструкции "C5" внеклеточный Ig-подобный домен молекулы PD1 ("PD1"; SEQ ID NO: 14) инсертируют в область изгиба антитела GCE536.

Конструкцию "C5" (полная тяжелая цепь: SEQ ID NO: 58, полная легкая цепь: SEQ ID NO: 57) формируют (в направлении от N- к C-концу): продукт экспрессии генного сегмента V (переменного) переменного домена тяжелой цепи GCE536 ("VH1-46"); продукт экспрессии генного сегмента D (разнообразного) переменного домена тяжелой цепи GCE536 ("D"); продукт экспрессии генного сегмента J (соединяющего) элемента переменного домена тяжелой цепи GCE536 ("JH6"); продукт экспрессии внеклеточного Ig-подобного домена молекулы PD1 ("PD1"); продукт экспрессии генного сегмента C (константного) константной области тяжелой цепи (изотип IgG1); и на отдельной цепи: продукт экспрессии генного сегмента V (переменного) переменного домена легкой цепи GCE536 и продукт экспрессии генного сегмента J (соединяющегося) элемента переменного домена легкой цепи GCE536; продукт экспрессии генного сегмента C (константного) константной области легкой цепи.

7. В конструкции "C5b" внеклеточный Ig-подобный домен молекулы PD1 ("PD1"; SEQ ID NO: 14) с фланкирующими интронными последовательностями ("15-mer JH-PD1"; SEQ ID NO: 49 и "15-mer PD1-CH1" линкеры; SEQ ID NO: 50) инсертируют в область изгиба антитела GCE536. Конструкцию "C5" (полная тяжелая цепь: SEQ ID NO: 59, полная легкая цепь: SEQ ID NO: 57) формируют (в направлении от N- к C-концу): продукт экспрессии генного сегмента V (переменного) переменного домена тяжелой цепи GCE536 ("VH1-46"); продукт экспрессии генного сегмента D (разнообразного) переменного домена тяжелой цепи GCE536 ("D"); продукт экспрессии генного сегмента J (соединяющего) переменного домена тяжелой цепи GCE536 ("JH6"); продукт экспрессии линкера ("15-mer JH-PD1"); продукт экспрессии внеклеточного Ig-подобного домена молекулы PD1 ("PD1"); продукт экспрессии линкера ("15-mer PD1-CH1"); продукт экспрессии генного сегмента C (константного) константной области тяжелой

цепи (изотип IgG1); и на отдельной цепи: продукт экспрессии генного сегмента V (варибельного) варибельного домена легкой цепи GCE536 и продукт экспрессии генного сегмента J (соединяющегося) элемента варибельного домена легкой цепи GCE536; продукт экспрессии генного сегмента C (константного) константной области легкой цепи каппа.

8. В конструкции "C6" внеклеточный Ig-подобный домен молекулы SLAM ("SLAM"; SEQ ID NO: 15) инсертируют в область изгиба антитела GCE536.

Конструкцию "C6" (полная тяжелая цепь: SEQ ID NO: 60, полная легкая цепь: SEQ ID NO: 57) формируют (в направлении от N- к C-концу): продукт экспрессии генного сегмента V (варибельного) варибельного домена тяжелой цепи GCE536 ("VH1-46"); продукт экспрессии генного сегмента D (разнообразного) варибельного домена тяжелой цепи GCE536 ("D"); продукт экспрессии генного сегмента J (соединяющегося) варибельного домена тяжелой цепи GCE536 ("JH6"); продукт экспрессии внеклеточного Ig-подобного домена молекулы SLAM ("SLAM"); продукт экспрессии генного сегмента C (константного) константной области тяжелой цепи (изотип IgG1); и на отдельной цепи: продукт экспрессии генного сегмента V (варибельного) варибельного домена легкой цепи GCE536 и продукт экспрессии генного сегмента J (соединяющегося) варибельного домена легкой цепи GCE536; продукт экспрессии генного сегмента C (константного) константной области легкой цепи.

9. В конструкции "C6" внеклеточный Ig-подобный домен молекулы SLAM ("SLAM"; SEQ ID NO: 15) с фланкирующими интронными последовательностями ("15-мерный JH-SLAM"; SEQ ID NO: 51 и "15-мерный SLAM-CH1" линкеры; SEQ ID NO: 52) инсертируют в область изгиба антитела GCE536. Конструкцию "C6" (полная тяжелая цепь: SEQ ID NO: 61, полная легкая цепь: SEQ ID NO: 57) формируют (в порядке от N- к C-концу): продукт экспрессии генного сегмента V (варибельного) варибельного домена тяжелой цепи GCE536 ("VH1-46"); продукт экспрессии генного сегмента D (разнообразного) варибельного домена тяжелой цепи GCE536 ("D"); продукт экспрессии генного сегмента J (соединяющегося) варибельного домена тяжелой цепи GCE536 ("JH6"); продукт экспрессии линкера ("15-мерный JH-SLAM"); продукт экспрессии внеклеточного Ig-подобного домена молекулы SLAM ("SLAM"); продукт экспрессии генного сегмента C (константного) константной области тяжелой цепи (изотип IgG1); и на отдельной цепи: продукт экспрессии генного сегмента V (варибельного) варибельного домена легкой цепи GCE536 и продукт экспрессии генного сегмента J (соединяющегося) варибельного домена легкой цепи GCE536; продукт экспрессии генного сегмента C (константного) константной области легкой цепи.

10. В конструкции "C7" внеклеточный Ig-подобный домен молекулы PD1 ("PD1"; SEQ ID NO: 14) инсертируют в область изгиба рекомбинантного моноспецифического антитела "C1b" (см. выше). Конструкцию "C7" (полная тяжелая цепь: SEQ ID NO: 62, полная легкая цепь: SEQ ID NO: 63) формируют (в направлении от N- к C-концу): продукт экспрессии генного сегмента V (варибельного) варибельного домена тяжелой цепи ("VH3-20"); продукт экспрессии сегмента гена D (разнообразии) варибельного домена тяжелой цепи ("D"); продукт экспрессии элемента сегмента гена J (Joining) варибельного домена тяжелой цепи ("JH3"); продукт экспрессии внеклеточного Ig-подобного домена молекулы PD1 ("PD1"); продукт экспрессии генного сегмента C (константного) константной области тяжелой цепи (изотип IgG1); и на отдельной цепи: продукт экспрессии генного сегмента V (варибельного) варибельного домена легкой цепи и продукт экспрессии элемента генного сегмента J (соединяющегося) варибельного домена легкой цепи; продукт экспрессии генного сегмента C (константного) константной области легкой цепи.

11. В конструкции "C8" внеклеточный Ig-подобный домен молекулы SLAM ("SLAM"; SEQ ID NO: 15) инсертируют в область изгиба рекомбинантного моноспецифического антитела "C1b" (см. выше). Конструкцию "C8" (полная тяжелая цепь: SEQ ID NO: 64, полная легкая цепь: SEQ ID NO: 63) формируют (в направлении от N- к C-концу): продукт экспрессии генного сегмента V (варибельного) варибельного домена тяжелой цепи ("VH3-20"); продукт экспрессии сегмента гена D (разнообразии) варибельного домена тяжелой цепи ("D"); продукт экспрессии элемента сегмента гена J (Joining) варибельного домена тяжелой цепи ("JH3"); продукт экспрессии внеклеточного Ig-подобного домена молекулы SLAM ("SLAM"); продукт экспрессии генного сегмента C (константного) константной области тяжелой цепи (изотип IgG1); и на отдельной цепи: продукт экспрессии генного сегмента V (варибельного) варибельного домена легкой цепи и продукт экспрессии генного сегмента J (соединяющегося) варибельного домена легкой цепи; продукт экспрессии генного сегмента C (константного) константной области легкой цепи.

Пример 2. Ig-подобные домены могут быть инсертированы в область изгиба антител, в результате чего формируются функциональные антитела.

Восемь конструкций антител, описанных в примере 1, получают рекомбинантно методом временной трансфекции. Для этого тяжелые и легкие цепи антител клонируют в экспрессирующие векторы IgG1, IgK и Igλ человека и экспрессируют путем временной трансфекции клеток Expi293F (фирма ThermoFisher Scientific) с использованием полиэтиленимина (PEI). Клеточные линии регулярно тестируют на загрязнение микоплазмой.

Затем конструкции антител C1-C8 и контрольное антитело GCE536 (см. пример 1) тестируют методом окрашивания 9215 IE (инфицированные эритроциты), и значения связывания (%) при концентрации

антитела 1 мкг/мл рассчитывают путем интерполяции кривых связывания, подобранных для модели сигмоидальной кривой (программа Graphpad Prism 6). Кроме того, методом ELISA исследуют связывание с рекомбинантным коллагеном человека, антителом против LAIR1 человека, рекомбинантным GM-CSF человека, анти-PD1 и анти-SLAM антителами. Вкратце, общее количество IgG определяют количественно, используя 96-луночные планшеты MaxiSorp (фирма Nunc), покрытые козьим антителом против IgG человека (фирма SouthernBiotech, номер в каталоге 2040-01), используя сертифицированный эталонный материал 470 (продукт ERM-DA470, фирма Sigma-Aldrich) в качестве стандарта. Для тестирования специфического связывания конструкций антител планшеты для ELISA покрывают 2 мкг/мл рекомбинантного коллагена человека типа I (фирма Millipore, номер в каталоге CC050), 2 мкг/мл антитела против LAIR1 человека (клон DX26, BD фирма Biosciences, номер в каталоге 550810) 1 мкг/мл рекомбинантного GM-CSF человека (фирма Gentauro), 2 мкг/мл анти-PD1 или анти-SLAM антитела (фирма R & D Systems, номера в каталоге AF1086 и AF164, соответственно). Планшеты блокируют 1% бычьим сывороточным альбумином (BSA), и инкубируют с оттитрованными антителами, затем с козьим антителом против IgG человека, конъюгированный с AP, специфичным для фрагмента Fcγ (Jackson Immuno Research, 109-056-098). Затем планшеты промывают, добавляют субстрат (p-NPP, фирма Sigma) и планшеты считывают при 405 нм.

Результаты различных исследований связывания показаны на фиг. 3. Конструкции антител, несущие окрашенные LAIR1 IE, распознают антителом против LAIR1. Вставка Ig-подобных доменов LAIR1, PD1 или SLAM в область изгиба антитела против GM-CSF не влияет на связывание с GM-CSF (конструкции C4-C6), следовательно, этот сайт допускает инсерции различных доменов без влияния на специфичность исходного антитела. Напротив, инсерция LAIR1 в CDR3 отменяет связывание с GM-CSF (данные не представлены).

Соответственно, в область изгиба могут быть инsertированы разные домены, не влияя на специфичность исходного антитела.

Пример 3. Конструкции, содержащие Ig-подобный домен в области изгиба, могут одновременно связываться с двумя разными антигенами.

Чтобы проверить, способны ли биспецифические конструкции, несущие сайт связывания в области изгиба, одновременно связываться с обеими специфичностями, было исследовано одновременное связывание методом поверхностного плазмонного резонанса (surface plasmon resonance - SPR). С этой целью биспецифическую конструкцию C4, которая имеет область V(D)J, специфичную для GM-CSF и несущую немутированный LAIR1 (сайт связывания для коллагена) в области изгиба, тестируют на одновременное связывание с GM-CSF и коллагеном методом SPR.

В одном эксперименте GM-CSF иммобилизуют на поверхности сенсорного чипа, и конструкции впрыскивают с последующим впрыскиванием коллагена.

Антитела C5 и GCE536 (см. выше), антитело MGD^{UCA} (содержит немутантный LAIR1 и, таким образом, способно связывать коллаген; Tan J. с соавт., Nature 529, 2016, 105-109; VH: SEQ ID NO: 71, VL: SEQ ID NO: 72, константная область тяжелой цепи: SEQ ID NO: 3, константная область легкой цепи: SEQ ID NO: 4) и антитело FI174 (специфичное к гемагглютинирующему гриппу H1; Pappas L. с соавт., Nature 516, 2014, 418-422; (VH: SEQ ID NO: 10, VL: SEQ ID NO: 11, константная область тяжелой цепи: SEQ ID NO: 3, константная область легкой цепи: SEQ ID NO: 4) используют в качестве контролей. Вкратце, GM-CSF (200 нМ) стабилизируют в 10 мМ ацетатном буфере, pH 4,5 и иммобилизуют на предварительно активированном этил(диметиламинопропил) карбодиимиде/N-гидроксисукцинимиде (EDC/NHS) чипе pre-activatedProteOnsensor chip (фирма Bio-Rad) путем аминного связывания, непрореагировавшие группы блокируют впрыскиванием 1 М этаноламина HCl. Буферный солевой раствор HEPES (HBS) (10 мМ HEPES, pH 7,4, 150 мМ NaCl, 3 мМ EDTA, 0,005% сурфактант Твин-20) используют в качестве подвижного буфера. Все впрыскивания производят при скорости потока 100 мкл/мин. Моноклональные антитела разбавляли в HBS до 10 нМ и вносили на чип в течение 240 с на чип, покрытый GM-CSF, с последующей инъекцией коллагена (50 нМ) в течение 120 с. В один канал чипа впрыскивают HBS и используют в качестве контроля. Каждое связывание моноклональных антител с GM-CSF и коллагеном оценивают с использованием прибора ProteONXPR36 (фирма Bio-Rad) и данные обрабатывают с помощью программного обеспечения ProteOn Manager.

Результаты показаны на фиг. 4. Обе конструкции C4 и C5, которые используют GCE536 в качестве каркаса (см. пример 1), связываются с GM-CSF. Из C4 и C5 только C4 (который несет LAIR1 в области изгиба, тогда как C5 несет Ig-подобный домен PD1 в области изгиба) затем связывается коллагеном. Моноспецифическое анти-GM-CSF антитело GCE536 связывается только с GM-CSF, но не с коллагеном. Антитело FI174 против H1 и коллаген-специфическое антитело MGD^{UCA} не проявляют какого-либо специфического сигнала связывания. Таким образом, полученные данные показывают, что биспецифическая конструкция C4 связывается с GM-CSF, а затем коллаген связывается с доменом LAIR1 в C4.

Во втором эксперименте белок А применяют для захвата конструкции с последующим совместным впрыскиванием исследуемых материалов (GM-CSF с последующим добавлением коллагена). В этом эксперименте антитела GCE536 и MGD^{UCA} (все описаны в примерах 1 и 2) и антитело TT107 (специфичное

для столбнячного анатоксина (ТТ); VH: SEQ ID NO: 73, VL: SEQ ID NO: 74, константная область тяжелой цепи: SEQ ID NO: 3, константная область легкой цепи: SEQ ID NO: 4) используют в качестве контролей. Вкратце, белок А (25 мкг/мл) стабилизируют в 10 мМ ацетатном буфере, pH 4,5, и иммобилизуют на предварительно активированном чипе ProOontSnsensor (Bio-Rad) с этил(диметиламинопропил)карбодимид/N-гидроксисукцинимидом (EDC/NHS) через аминное связывание; непрореагировавшие группы блокируют инъекцией 1 М этаноламина HCl. Буферный солевой раствор HEPES (HBS) (10 мМ HEPES, pH 7,4, 150 мМ NaCl, 3 мМ EDTA, 0,005% сурфактант Твин-20) используют в качестве подвижного буфера. Все впрыскивания производят при скорости потока 100 мкл/мин. Моноклональные антитела разводят в HBS до 10 нМ и впрыскивают в течение 240 сек на чип с покрытием из белка А для захвата с последующим одновременным впрыскиванием GM-CSF коллаген (50 нМ), сразу после которого вводят коллаген (50 нМ) в общей сложности в течение 110 сек. В один канал чипа впрыскивают HBS в качестве контроля. Каждое связывание моноклональных антител с GM-CSF и коллагеном оценивают с помощью прибора ProteONXPR36 (фирма Bio-Rad) и данные обрабатывают по программе ProteOn Manager.

Результаты показаны на рисунке 5. Конструкция C4 и GCE536 связываются с GM-CSF. Однако затем только C4 распознается коллагеном. Коллаген-специфическое антитело MGD^{UCA} связывается только с коллагеном. Контрольное антитело TT107 является моноклональным антителом, специфичным для ТТ (столбнячного анатоксина), которое не проявляет какого-либо сигнала специфического связывания в SPR эксперименте. Таким образом, эти результаты показывают, что конструкции, содержащие (дополнительный) функциональный домен, такой как Ig-подобный домен, в области изгиба, могут одновременно связываться с (i) партнером связывания сайта в области изгиба и (ii) антигеном, распознаваемого вариabельными доменами каркасного антитела.

Пример 4. Ig-подобные домены могут быть инсертированы вместе с фланкирующими линкерами в область изгиба антител, в результате чего формируются функциональные антитела

Конструкции антител C5b и C6b содержат один и тот же домен (либо PD1, либо SLAM), инсертированный в область изгиба в конструкциях C5 и C6, соответственно, с двумя дополнительными 15-мерными аминокислотными линкерами, вставленными между JH и доменом, а также между доменом и CH1. Методом ELISA исследуют связывание с рекомбинантным GM-CSF человека, анти-PD1 и анти-SLAM антителами. Вкратце, общее количество IgG определяют количественно, используя 96-луночные планшеты MaxiSorp (фирма Nunc), покрытые козьим антителом против IgG человека (фирма Southern-Biotech, номер в каталоге 2040-01), используя сертифицированный эталонный материал 470 (продукт ERM5-DA470, фирма Sigma-Aldrich) в качестве стандарта. Для тестирования специфического связывания конструкций антител планшеты для ELISA покрывают 1 мкг/мл рекомбинантного GM-CSF человека (фирма Gentaug), 2 мкг/мл анти-PD1 или анти-SLAM антитела (R & D Systems, AF1086 и AF164). Планшеты блокируют 1% бычьим сывороточным альбумином (BSA), и инкубируют с оттитрованными антителами, затем с козьим антителом против IgG человека, конъюгированным с AP, специфичным для фрагмента Fcγ (фирма Jackson Immuno Research, 109-056-098). Затем планшеты промывают, добавляют субстрат (p-NPP, фирма Sigma) и планшеты считывают при 405 нм.

Результаты различного связывания показаны на фиг. 6. Инсерция Ig-подобных доменов PD1 или SLAM с фланкирующими линкерами в область изгиба GM-CSF антитела не влияет на связывание GM-CSF, следовательно, в этот сайт можно инсертировать также разные домены с фланкирующими линкерами, не влияя на специфичность исходного антитела. Кроме того, присутствие линкеров не изменяло Ig-подобный домен, поскольку ант-PD1 антитело одинаково распознавало как C5, так и C5b. Аналогичные результаты были получены для C6 и C6b, распознаваемых анти-SLAM антителом. Обобщая полученные результаты, можно предположить, что домены могут быть вставлены в область изгиба с дополнительными линкерами, которые удаляют такие домены от основного каркаса антител. Не ограничиваясь какой-либо теорией, предполагают, что линкеры могут обеспечить повышенную гибкость инсера.

Пример 5. Конструирование антитела, содержащего молекулярную метку, инсертированную в область изгиба.

Чтобы исследовать возможность использования метки, инсертированной в область изгиба антитела для обнаружения антител, разработана конструкция (названная "C9"), в которой твин-Strep-tag инсертируют в область изгиба тяжелой цепи каркасного антитела C1b (сравните с примером 1). Легкую цепь конструкции не модифицируют по сравнению с каркасным антителом. В итоге конструкцию экспрессируют в качестве моноклонального антитела (тяжелую и легкую цепи).

Конструкция "C9" схематически показана на фиг. 2. В конструкции "C9" двойная метка Strep-tag ("2XST"; SEQ ID NO: 20) была инсертирована в область изгиба рекомбинантного моноспецифического антитела "C1b" (см. выше). Конструкция "C9" (полная тяжелая цепь: SEQ ID NO: 65, полная легкая цепь: SEQ ID NO: 63) образована следующим образом (в направлении от N- к C-концу): продукт экспрессии (вариабельного) генного сегмента V вариабельного домена тяжелой цепи ("VH3-20"); продукт экспрессии сегмента гена D (разнообразия) вариабельного домена тяжелой цепи ("D"); продукт экспрессии элемента генного сегмента J (соединяющего) вариабельного домена тяжелой цепи ("JH3"); продукт экспрес-

сии двойной метки Strep-tag ("2XST"); продукт экспрессии генного сегмента С (константного) константной области тяжелой цепи (изотип IgG1); и на отдельной цепи: продукт экспрессии генного сегмента V (вариабельного) вариабельного домена легкой цепи и продукт экспрессии генного сегмента J (соединяющего) вариабельного домена легкой цепи; продукт экспрессии генного сегмента С (константного) константной области легкой цепи каппа.

Пример 6. Молекулярные метки могут быть инсертированы в область изгиба антител, в результате чего образуются функциональные антитела.

Конструкцию антитела "C9", описанную в примере 5, получают методом рекомбинации путем временной трансфекции. Для этого тяжелые и легкие цепи антител клонируют в векторах экспрессии IgG1 и IgK человека и экспрессируют путем временной трансфекции в клетках Expi293F (фирма ThermoFisher Scientific), используя полиэтиленимин (PEI). Клеточные линии ежедневно тестируют на заражение микоплазмой.

Затем конструкцию антитела C9 и контрольное антитело C1b (см. пример 1) тестируют для распознавания с помощью Strep-tag-специфической молекулы Strep-tactin методом ELISA. Вкратце, суммарные IgG подсчитывают, используя 96-луночные планшеты MaxiSorp (фирма Nunc) с покрытием козьим антителом против IgG человека (goat anti-human IgG) (фирма SouthernBiotech, 2040-01), используя в качестве стандарта Certified Reference Material 470 (ERMs-DA470, фирма Sigma-Aldrich). Для специфического распознавания конструкции антитела планшеты ELISA покрывают 10 мкг/мл антитела против IgG человека (anti-human IgG) (фирма SouthernBiotech), планшеты блокируют 1% бычьим сывороточным альбумином (BSA) и инкубируют с оттитрованными антителами, а затем с AP-конъюгированным реактивом Strep-tactin (фирма Iba Lifesciences). Затем планшеты промывают, вносят субстрат (p-NPP, фирма Sigma) и планшеты считывают при длине волны 405 нм.

Результаты показаны на фиг. 7. Конструкция антитела "C9", несущая Strep-tag, эффективно и специфически распознается Strep-tag-специфичным Strep-тактином, тогда как контрольное антитело "C1b", которое не несет Strep-метку, не распознается. Эти результаты показывают, что в область изгиба можно инсертировать молекулярные метки, которые позволяют распознавать и отслеживать антитела.

Пример 7. Конструирование антител, содержащих вариабельный домен одноцепочечного антитела (VHH) или одноцепочечный вариабельный фрагмент (ScFv), инсертированный в область изгиба.

Чтобы исследовать, приводит ли инсерция (дополнительных) функциональных доменов, отличных от Ig-подобных доменов, в область изгиба к получению функциональных мультиспецифических антител, были разработаны четыре новые конструкции (C9-C12). В четырех новых конструкциях C9-C12 - вариабельный домен одноцепочечного антитела (VHH) или вариабельный одноцепочечный фрагмент (ScFv), специфичный для анатоксина столбняка (TT) или белка гибридизации (F) респираторного синцитиального вируса (RSV), соответственно, были вставлены в область изгиба антител, специфичных для гемагглютинаина гриппа H1 (FI174; Pappas, L. с соавт., Nature 516, 2014, 418-422; VH: SEQ ID NO: 10, VL: SEQ ID NO: 11, константная область тяжелой цепи: SEQ ID NO: 3, константная область легкой цепи каппа: SEQ ID NO: 12/SEQ ID NO: 4). Легкую цепь конструкций не модифицируют по сравнению с каркасным антителом FI174. В итоге все конструкции экспрессируют в качестве моноклональных антител (тяжелые и легкие цепи). Были получены следующие варианты, схематически показанные на фиг. 8:

1. В конструкции "C10" анти-TT VHH ("T3-VHH"; Rossotti M.A. с соавт., mAbs 7, 2015, 820-828; SEQ ID NO: 16) инсертируют в область изгиба FI174. Конструкцию "C10" (полная тяжелая цепь: SEQ ID NO: 66, полная легкая цепь: SEQ ID NO: 67) формируют следующим образом (в направлении от N- к C-концу): продукт экспрессии генного сегмента V (вариабельного) вариабельного домена тяжелой цепи FI174 ("VH"); продукт экспрессии генного сегмента D (разнообразия) вариабельного домена тяжелой цепи FI174 ("D"); продукт экспрессии элемента генного сегмента J (соединяющего) вариабельного домена тяжелой цепи FI174 ("JH"); продукт экспрессии анти-TT VHH ("T3-VHH"; Rossotti M.A. с соавт., mAbs 7, 2015, 820-828); продукт экспрессии генного сегмента С (константного) константной области тяжелой цепи (изотип IgG1); и на отдельной цепи: продукт экспрессии генного сегмента V (вариабельного) вариабельного домена легкой цепи FI174 и продукт экспрессии элемента генного сегмента J (Joining) вариабельного домена легкой цепи FI174; продукт экспрессии генного сегмента С (константного) константной области легкой цепи.

2. В конструкции "C11" анти-TT ScFv ("TT39.7-ScFv"; SEQ ID NO: 17) был вставлен в область изгиба FI174. Конструкция "C11" (полная тяжелая цепь: SEQ ID NO: 68, полная легкая цепь: SEQ ID NO: 67) образована следующим образом (в направлении от N- к C-концу): продукт экспрессии генного сегмента V (вариабельного) вариабельного домена тяжелой цепи FI174 ("VH"); продукт экспрессии генного сегмента D (разнообразия) вариабельного домена тяжелой цепи FI174 ("D"); продукт экспрессии элемента генного сегмента J (соединяющего) вариабельного домена тяжелой цепи FI174 ("JH"); продукт экспрессии анти-TT ScFv ("TT39.7-ScFv"); продукт экспрессии генного сегмента С (константного) константной области тяжелой цепи (изотип IgG1); и в отдельной цепи: продукт экспрессии генного сегмента V (вариабельного) вариабельного домена легкой цепи FI174 и продукт экспрессии генного сегмента J (соединяющего) вариабельного домена легкой цепи FI174; продукт экспрессии генного сегмента С (константного) константной области легкой цепи.

3. В конструкции "C12" анти-RSV белок F VHH ("F4-VHH"; Rossey I. С соавт., Nature communications 8, 2017, 14158; SEQ ID NO: 18) инсертирован в область изгиба F1174. Конструкция "C12" (полная тяжелая цепь: SEQ ID NO: 69, полная легкая цепь: SEQ ID NO: 67) образована следующим образом (в направлении от N- к С-концу): продукт экспрессии генного сегмента V (вариабельного) вариабельного домена тяжелой цепи F1174 ("VH"); продукт экспрессии генного сегмента D (разнообразия) вариабельного домена тяжелой цепи F1174 ("D"); продукт экспрессии элемента генного сегмента J (соединяющего) вариабельного домена тяжелой цепи F1174 ("JH"); продукт экспрессии белка F анти-RSV VHH ("F4-VHH"; Rossey I. С соавт., Nature communications 8, 2017, 14158; продукт экспрессии генного сегмента С (константного) константной области тяжелой цепи (изотип IgG1); и в отдельной цепи: продукт экспрессии генного сегмента V (вариабельного) вариабельного домена легкой цепи F1174 и продукт экспрессии элемента генного сегмента J (соединяющего) вариабельного домена легкой цепи F1174; продукт экспрессии генного сегмента С (константного) константной области легкой цепи.

4. В конструкции "C13" анти-RSV белок F ScFv ("MPE8-ScFv"; Corti D. с соавт., Nature 501, 2013, 439-443; SEQ ID NO: 19) инсертирован в область изгиба F1174. Конструкция "C13" (полная тяжелая цепь: SEQ ID NO: 70, полная легкая цепь: SEQ ID NO: 67) образована следующим образом (в направлении от N- к С-концу): продукт экспрессии генного сегмента V (вариабельного) вариабельного домена тяжелой цепи F1174 ("VH"); продукт экспрессии генного сегмента D (разнообразия) вариабельного домена тяжелой цепи F1174 ("D"); продукт экспрессии элемента генного сегмента J (соединяющего) вариабельного домена тяжелой цепи F1174 ("JH"); продукт экспрессии анти-RSV белка ScFv ("MPE8-ScFv"; Corti D. с соавт., Nature 501, 2013, 439-443; продукт экспрессии генного сегмента С (константного) константной области тяжелой цепи (изотип IgG1); и в отдельной цепи: продукт экспрессии генного сегмента V (вариабельного) вариабельного домена легкой цепи F1174 и продукт экспрессии элемента генного сегмента J (соединяющего) вариабельного домена легкой цепи F1174; продукт экспрессии генного сегмента С (константного) константной области легкой цепи.

Пример 8. VHH и ScFv могут быть инсертированы в шарнирную область, в результате чего образуются функциональные биспецифичные антитела.

Четыре новые конструкции антител, описанные в примере 4, получают методом рекомбинации с помощью временной трансфекции. Для этого тяжелые и легкие цепи антител клонируют в векторы экспрессии IgG1, IgK и Igλ человека и экспрессируют с помощью временной трансфекции клеток Expi293F (фирма ThermoFisher Scientific) с использованием полиэтиленimina (PEI). Конструкции тестируют на двойное связывание с (i) H1 и (ii) TT или RSV F белком с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

В первом эксперименте анализируют конструкции C10 и C11 (с TT-специфичным VHH или scFv в области изгиба F1174). С этой целью белок А применяют для захвата конструкций с последующим одно-временным впрыскиванием исследуемого материала (H1 в качестве первого исследуемого материала, сразу после которого следует TT). В качестве контроля используют TT-специфическое антитело TT107 и H1-специфическое антитело F1174. Вкратце, белок А (25 мкг/мл) стабилизируют в 10 mM ацетатном буфере, pH 4,5, и иммобилизуют на предварительно активированном этил(диметиламинопропил) карбодимиде/N-гидроксисукцинимиде (EDC/NHS) чипе pre-activatedProteOnsensor chip (фирма Bio-Rad) путем аминного связывания, непрореагировавшие группы блокируют впрыскиванием 1 M этаноламина HCl. Буферный солевой раствор HEPES (HBS) (10 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% сурфактант Твин-20) используют в качестве подвижного буфера. Все впрыскивания производят при скорости потока 100 мкл/мин. Моноклональные антитела разбавляют в HBS до 10 nM и в течение 240 сек наносят на чип, покрытый белком А для захвата с последующим одновременным впрыскиванием гемоглобулина H1 California (50 nM), сразу после которого вводят анатоксин столбняка (50 nM) в течение 110 сек. В один канал чипа впрыскивают HBS в качестве контроля. Каждое связывание моноклональных антител с H1 и TT оценивают с использованием прибора ProteONXPR36 (фирма Bio-Rad), и данные обрабатывают с помощью программы ProteOn Manager. Результаты показаны на фиг. 9. Конструкции C10 и C11 (несущие TT-специфический домен (VHH или ScFv)) связывают как H1, так и TT, тогда как контрольные антитела F1174 и TT107 распознают только H1 или только TT, соответственно.

Во втором эксперименте исследуют конструкции C12 и C13 (со специфичным RSV F-белок-специфичным VHH или scFv в области изгиба F1174). С этой целью белок А использовали для захвата конструкций с последующей совместной инъекцией исследуемых материалов (H1 в качестве первого исследуемого материала, сразу после которого следует RSV F белок). В качестве контролей используют белок-специфическое антитело против RSV F-специфического антитела MPE8 и H1-специфического антитела F1174. Вкратце, белок А (25 мкг/мл) стабилизируют в 10 mM ацетатном буфере, pH 4,5, и иммобилизуют на предварительно активированном этил(диметиламинопропил) карбодимиде/N-гидроксисукцинимиде (EDC/NHS) чипе pre-activatedProteOnsensor chip (фирма Bio-Rad) путем аминного связывания, непрореагировавшие группы блокируют впрыскиванием 1 M этаноламина HCl. Буферный солевой раствор HEPES (HBS) (10 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% сурфактант Твин-20) используют в качестве подвижного буфера. Все впрыскивания производят при скорости потока

100 мкл/мин. Моноклональные антитела разбавляют в HBS до 10 нМ и в течение 240 сек наносят на чип, покрытый белком А для захвата, и сразу впрыскивают гемагглютинин H1 California (50 нМ), после которого сразу вводят RSV F белок (50 нМ) в течение 110 с. В один канал чипа впрыскивают HBS в качестве контроля. Каждое связывание моноклональных антител с H1 и RSV F оценивают с использованием прибора ProteONXPR36 (фирма Bio-Rad), и данные обрабатывают с помощью программы ProteOn Manager. Результаты показаны на фиг. 10. Конструкции C10 и C11 (несущие RSV F белок-специфический домен (VHH или ScFv)) связывают как H1, так и RSV F белок, тогда как контрольные антитела FI174 и MPE8 распознают только белок H1 или только белок RSV, соответственно.

Таким образом, результаты показывают, что инсерция доменов VHH или ScFv в область изгиба FI174 не влияет на связывание с гемагглютином H1, указывая на то, что в этот сайт можно инсертировать разные домены, не влияя на специфичность исходного антитела, что показано выше для Ig-подобных доменов. Двойное одновременное распознавание двух разных специфических антигенов областью VDJ каркасного антитела и доменов VHH или ScFv, инсертированных в область изгиба, указывает на то, что можно генерировать функциональные и биспецифические антитела, несущие различные типы инсертов в область изгиба.

Таблица последовательностей и SEQ ID номеров (перечень последовательностей)

SEQ ID NO	Последовательности	Примечания
SEQ ID NO: 1	QLQLVQSGTEVKKPGASVKVSCSSGYVFTSYLLV WVRQAPGQGLEWMATISPGDVNTSYEQRFQGRVTV TTDASTNTVDMELRSLRSEDVAVYYCARGPRSKPPY LYFALDVWGQGTAVTVSS	GCE536 VH aa
SEQ ID NO: 2	EIVLTQSPGTLSPGETAILSCRASQSVSSLLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASNRAITGIRGRFSGSGGTDFTLT ISRLEPEDFVLYYCQHYGSRVTFGGGTKLEIK	GCE536 VL aa
SEQ ID NO: 3	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHREALHNYTQKSLSL SPGK	Human HC IgG1 constant region aa
SEQ ID NO: 4	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	Human LC kappa constant region aa
SEQ ID NO: 5	QVQLAQYGGGAVQPGGSLRLSCVVSQFRRFSLYGIH WVRQAPGKGLEWLSLIENHGRKIYYAESVKGRITVS RDNFKNVAYLEMYRLSTEDTAIYYCARNDGLGRYT DAGGTHRTAYLDYWGRGTLVTVSS	C1 VH aa

SEQ ID NO: 6	SYEVTQPPSVSVSPGQAARITCSGDELPRTDISWYQQ TSGQAPVLVIYEGTKRPSGIPERFSGSVSGAMATLMI SEAQLEDEGDYYCFSIDTSGNHGGAFGTGKLTVL	C1 VL aa
SEQ ID NO: 7	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGA VTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYL SLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	Human LC lambda constant region aa
SEQ ID NO: 8	DVQLVESGGGVVRPGVSLRLSCVASGFSFKNYDMA WVRQVPGKGLEWVCGINWNGSLRGYADSVKGRFLI SRDHAKDSLQMSRLRAEDTALYYCARDPGYNTG RDHPYDLWGQGMVTVSS	C1b VH aa
SEQ ID NO: 9	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSISSWLAWYQ QKPGKAPKLLIYKASSLGSVPSRFSGSGSGTQFTLTI SSLQPDFATYYCQYNNYPYTFGQGTKLEIK	C1b VL aa
SEQ ID NO: 10	QVQLVQSGAEVRKPGSSVKVCKTSGGIIRKVALSW VRQAPGQGLEWMGGIIAIFGTNYAQKFGQGRVTINA DESTSTVYLELSSLTSEDTAIYYCAGSATYYESRFDY WGQGLTVTVSS	FI174 VH aa
SEQ ID NO: 11	EIVLTQSPGTLSPGARATLSCRASQSVSSSLAWY QQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSDFTL TISRLEPEDFAVYYCHQYGDSRKTFGQGTKVEIK	FI174 VL aa
SEQ ID NO: 12	EDLPRPSISAEPGTVIPLGSHVTFVCRGPVGVQTFRLE RESRSTYNDTEDVSQASPSESEARFRIDSVSEGNAGP YRCIYYKPPKWSEQSDYLELLVK	unmutated LAIR1 fragment aa
SEQ ID NO: 13	EDLPRPSISAEPGTVIPLGSHVTFVCRGPVGVQTFRLE RERNLYSDTEDVSQTPSESEARFRIDSVNAGNAGL FRCIYYKSRKWSEQSDYLELVVK	mutated LAIR1 fragment aa
SEQ ID NO: 14	DSPDRPWNPPFTFPALLVTEGDNATFTCSFSNTSES FVLNWRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRV TQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTLYLCAISLAPKAQ IKESLRAELRVI	PD-1 fragment aa
SEQ ID NO: 15	EQVSTPEIKVLNKTQENGCTLILGCTVEKGDHVAY SWSEKAGTHPLNPANSSHLLSLTLGPQHADNIYICTV SNPISNNSQTFSPWPGCRTDPS	SLAM fragment aa
SEQ ID NO: 16	MAQVQLVESGGGLVQAGGSLTSCAASGSTRSYA LGWFRQAPGKEREFVAHVGGTAFAAQRFTISRDF KNTVSLQMNDLKSDDTAIYYCVASNRGWSPSRVSY WGQGTQVTVSS	T3-VHH aa
SEQ ID NO: 17	QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTRVGVG WIRQPPGKALEWLSLIYWDEKHYSPSLKNRVTISK DSSKNQVVLTLTDMDPVDTGTYYCAHRGVDTSW GFDYWGQALVTVSS GGGGSGGGSGGGGS QSAL TQPASVSGSPGQSITISCSGAGSDVGGHNFVSWYQQ YPGKAPKLMYDVKNRPSGVSYRFSGSKSGYTASLTI SGLQAEDATYFCSSYSSSSTLIIFGGGTRLTVL	TT39.7-scFv aa

SEQ ID NO: 18	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYIIGW FRQAPGKEREAVSCISGSSGSTYYPDSVKGRFTISR NAKNTVYLLQMNSLKPEDTAVYYCATIRSSSWGCV HYGMDYWGKGTQVTVSS	F4-VHH aa
SEQ ID NO: 19	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNW VRQAPGKGLEWVSSISASSSYSDYADSAKGRFTISR NAKTSFLQMNSLRAEDTAIFYCARARATGYSSITPY FDIWGGQTLVTVSSGGGSGGGSGGGGSQSVVT QPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQL PGTAPKLLIYDNNRPSGVPDRFSASKSGTSASLAIT GLQAEDEADYYCQSYDRNLSGVFGTGTKVTVL	MPE8-scFv aa
SEQ ID NO: 20	SAWSPQFEKGGGSGGGSGGSAWSPQFEK	twin StrepTag aa
SEQ ID NO: 21	GLNDIFEAQKIEWHE	AviTag
SEQ ID NO: 22	KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSGAL	Кальмодулин-метка
SEQ ID NO: 23	EEEEEE	Полиглутамат-метка
SEQ ID NO: 24	GAPVPYDPLEPR	Е-метка
SEQ ID NO: 25	DYKDDDDK	FLAG-метка
SEQ ID NO: 26	YPYDVPDYA	HA-метка
SEQ ID NO: 27	HHHHHH	His-метка
SEQ ID NO: 28	EQKLISEEDL	Мус-метка
SEQ ID NO: 29	TKENPRSNQEESYDDNES	NE-метка
SEQ ID NO: 30	KETAAAKFERQHMS	S-метка
SEQ ID NO: 31	MDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQG QREP	SBP-метка
SEQ ID NO: 32	SLAELLNAGLGG	Softag 1
SEQ ID NO: 33	TQDPSRVG	Softag 3
SEQ ID NO: 34	WSPQFEK	Strep-tag
SEQ ID NO: 35	CCPGCC	ТС метка
SEQ ID NO: 36	GKPIPPLLGLDST	V5 метка
SEQ ID NO: 37	YTDIEMNRLGK	VSV-метка
SEQ ID NO: 38	DLYDDDDK	Xpress метка
SEQ ID NO: 39	TDKDMTITFTNKKDAE	Isopertag
SEQ ID NO: 40	AHIVMVDAYKPTK	Spy Tag
SEQ ID NO: 41	KLGDIEFIKVNK	SnoorTag
SEQ ID NO: 42	EVHTNQDPLD	Ty1 метка
SEQ ID NO: 43	GGGGS	линкер
SEQ ID NO: 44	GGGSGGGGS	линкер
SEQ ID NO: 45	GGGSGGGSGGGGS	линкер
SEQ ID NO: 46	GGGSGGGSGGGSGGGGS	линкер
SEQ ID NO: 47	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS	линкер
SEQ ID NO: 48	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS	линкер
SEQ ID NO: 49	FVGPPSPFLTSLHLS	линкер
SEQ ID NO: 50	GAASEAPGQGLAEPV	линкер
SEQ ID NO: 51	QGFTSVMAPFLPLLT	линкер
SEQ ID NO: 52	GEYTGGSCLATLMSM	линкер

SEQ ID NO: 53	<p>QVQLAQYGGGAVQPGSLRLSCVVS GFRFSLYGIHW VRQAPGKGLEWLSLIENHGRKIYYAESVKGRITVSR DNFKNVAYLEYRLSTEDTAIYYCARNDGLGRYTD AGGTHRTAYLDYWGRGTLTVSSEDLPRPSISAEPG TVIPLGSHVTFVCRGPVGVQTFRLERERNLYSDTED VSQTSPESEARFRIDSVNAGNAGLFRICIYKSRKWS EQSDYLELVVKASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK</p>	C2 heavy chain aa
SEQ ID NO: 54	<p>SYEVTQPPSVSVSPGQAARITCSGDELPRDISWYQQ TSGQAPVLIYEGTKRPSGIPERFSGSVSGAMATLMI SEAQLEDEGDYYCFSIDTSGNHGGAFGTGKLTVLG QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAV TVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLS LTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS</p>	C2/C3 light chain aa
SEQ ID NO: 55	<p>QVQLAQYGGGAVQPGSLRLSCVVS GFRFSLYGIH WVRQAPGKGLEWLSLIENHGRKIYYAESVKGRITVS RDNFKNVAYLEYRLSTEDTAIYYCARNDGLGRYT DAGGTHRTAYLDYWGRGTLTVSSEDLPRPSISAEP GTVIPLGSHVTFVCRGPVGVQTFRLERESRSTYNDT EDVSQASPSESEARFRIDSVSEGNAGPYRCIYKPPK WSEQSDYLELLVKASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	C3 heavy chain aa

SEQ ID NO: 56	<p>QLQLVQSGTEVKKPGASVKVSKSSGYVFTSYLW WVRQAPGQGLEWMATISPGDVNTSYEQRFQGRVT VTTDASTNTVDMELRSLRSEDVAVYYCARGPRSKPP YLYFALDVWGQGTAVTVSSEDLPRPSISAEPGTVIPL GSHVTFVCRGPGVGVQTFRLERESRSTYNDTEDVSQA SPSESEARFRIDSVSEGNAGPYRCIYYKPPKWSEQSD YLELLVKASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNTKVDKRVKPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGNVFSCVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK</p>	C4 heavy chain aa
SEQ ID NO: 57	<p>EIVLTQSPGTLISLSPGETAILSCRASQSVSSLLAWY QQKPGQAPRLLIYGASNRATGIRGRFSGSGSDFT LTISRLEPEDFVLYYQCQHYGSRVTFGQGTKLEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLS KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>	C4/C5/C6 light chain aa
SEQ ID NO: 58	<p>QLQLVQSGTEVKKPGASVKVSKSSGYVFTSYLW WVRQAPGQGLEWMATISPGDVNTSYEQRFQGRVT VTTDASTNTVDMELRSLRSEDVAVYYCARGPRSKPP YLYFALDVWGQGTAVTVSSSDSPDRPWNPTFSPAL LVVTEGDNATFTCSFSNTSESVFLNWYRMSPSNQTD KLAAPFEDRSQPGQDCRFVTVLQPNRDFHMSVVR ARRNDSGTLYCGAISLAPKAQIKESLRAELRVAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHPKSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTTPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQGNVFSCVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK</p>	C5 heavy chain aa

SEQ ID NO: 59	<p>QLQLVQSGTEVKKPGASVKVSCKSSGYVFTSYLLV WVRQAPGQGLEWMATISPGDVNTSYEQRFQGRVTV TTDASTNTVDMELRSLRSEDNAVYYCARGPRSKPPY LYFALDVWGQGTAVTVSSFVGPPSPFLTSLHLSDSPD RPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESVLN WYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLPN GRDFHMSVVRARRNDSGTLYLCAISLAPKAQIKESL RAELRVTGAASEAPGQGLAEPVASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	C5b heavy chain aa
SEQ ID NO: 60	<p>QLQLVQSGTEVKKPGASVKVSCKSSGYVFTSYLLV WVRQAPGQGLEWMATISPGDVNTSYEQRFQGRVTV TTDASTNTVDMELRSLRSEDNAVYYCARGPRSKPPY LYFALDVWGQGTAVTVSSFVGPPSPFLTSLHLSDSPD RPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESVLN WYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLPN GRDFHMSVVRARRNDSGTLYLCAISLAPKAQIKESL RAELRVTGAASEAPGQGLAEPVASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	C6 heavy chain aa

SEQ ID NO: 61	<p>QLQLVQSGTEVKKPGASVKVSCKSSGYVFTSYLW WVRQAPGGLEWMATISPGDVNTSYEQRFQGRVT VTTDASTNTVDMELRSLRSEDVAVYYCARGPRSKPP YLYFALDVWGQGTAVTVSSQGFTSVMAPFLPLLTE QVSTPEIKVLNKTQENGTCTLLGCTVEKGDHVAYS WSEKAGTHPLNPANSSHLLSLTLGPQHADNIYICTV SNPISNNSQTFSPWPGCRTPSGEYTGGSCLATLMS MASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKLSLSPGK</p>	C6b heavy chain aa
SEQ ID NO: 62	<p>DVQLVESGGGVVRRPGVSLRLSCVAGSFKNYDMA WVRQVPGKGLEWVCGINWNGSLRGYADSVKGRFL ISRDHAKDSLQLQMSRLRAEDTALYYCARDPGYNT GRDHPYDLWGQGTMTVTVSSDSPDRPNPPTFSPAL LVVTEGDNATFTCSFSNTSESVLWYRMSPSNQTD KLAAPFEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVR ARRNDSTYLCGAIAPKAQIKESLRAELRVTAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK</p>	C7 heavy chain aa
SEQ ID NO: 63	<p>DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSISSWLAWY QQKPGKAPKLLIYKASSLGSVPSRFSGSGSGTQFTL TISSLQPDFATYYCQYNNYPYTFGQGTKLEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT LSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>	C7/C8/C9 light chain aa

<p>SEQ ID NO: 64</p>	<p>DVQLVESGGGVVPRGVSRLRSCVASGFSFKNYDMA WVRQVPGKGLEWVCGINWNGSLRGYADSVKGRFLI SRDHAKDSLQMSRLRAEDTALYYCARDPGYNTG RDHPYDLWGQGMVTVSSEQVSTPEIKVLNKTQEN GTCTLILGCTVEKGDHVAYSWSEKAGTHPLNPANSS HLLSLTLGPQHADNIYICTVSNPISNNSQTFSPWPGCR TDPSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK</p>	<p>C8 heavy chain aa</p>
<p>SEQ ID NO: 65</p>	<p>DVQLVESGGGVVPRGVSRLRSCVASGFSFKNYDMA WVRQVPGKGLEWVCGINWNGSLRGYADSVKGRFL ISRDHAKDSLQMSRLRAEDTALYYCARDPGYNT GRDHPYDLWGQGMVTVSSSAWHPQFEKGGGSG GGSGGSAWHPQFEKASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHPKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTL PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>C9 heavy chain aa</p>
<p>SEQ ID NO: 66</p>	<p>QVQLVQSGAEVRKPGSSVKVSCKTSGGIIRKYALSW VRQAPGQGLEWMGGIIAIFGTTNYAQKFQGRVTINA DESTSTVYLELSSLTSEDTAIYYCAGSATYYESRFDY WGQGLTVTVSSMAQVQLVESGGGLVQAGGSLTSL CAASGSTRSYALGWFRQAPGKEREFVAHVQGTAE FAQGRFTISRDFAKNTVSLQMNDLKSDDTAIYYCVA SNRGWSPSRVSYWGQGTQVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQ VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>C10 heavy chain aa</p>

SEQ ID NO: 67	EIVLTQSPGTLSPGARATLSCRASQSVSSSLAWY QQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCHQYGDSRKTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	C10/C11/C12/C13 light chain aa
SEQ ID NO: 68	QVQLVQSGAEVRKPGSSVKVSKTSGGIIRKYALSW VRQAPGQGLEWMGGIIAIFGTTNYAQKFQGRVTINA DESTSTVYLELSSLTSEDTAIYYCAGSATYYESRFDY WGQGTLLVTVSSQITLKESGPTLVKPTQTLTCTFSG FSLSTSRVGVGWIRQPPGKALEWLSLIYWDEKHYS PSLKNRVTISKDSSKNQVVLTLTDMDPVDTGTYYC AHRGVDTSWGFYWGQALVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSQSALTQPASVSGSPQISITSCSAGSDVGG HNFVSWYQQYPGKAPKLMYDVKNRPSGVSYRFSG SKSGYASLTISGLQAEDATYFCSSYSSSSTLIIFGG GTRLTVLASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEK SCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK	C11 heavy chain aa
SEQ ID NO: 69	QVQLVQSGAEVRKPGSSVKVSKTSGGIIRKYALSW VRQAPGQGLEWMGGIIAIFGTTNYAQKFQGRVTINA DESTSTVYLELSSLTSEDTAIYYCAGSATYYESRFDY WGQGTLLVTVSSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTLDYIYIGWFRQAPGKEREAVSCISGSSGSTYYPD SVKGRFTISRDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAT IRSSSWGCVHYGMDYWGKGTQVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKTHTCPPCPAPEL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGDSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	C12 heavy chain aa

SEQ ID NO: 70	QVQLVQSGAEVRKPGSSVKVSCKTSGGIIRKYALSW VRQAPGGGLEWMGGHIAIFGTTNYAQKFQGRVTINA DESTSTVYLELSSLTSEDTAIYYCAGSATYYESRFDY WQQTGLVTVSSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAA SGFTFSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISASSYSDY ADSAKGRFTISRDNNAKTSFLQMNSLRAEDTAIYFC ARARATGYSSITPYFDIWGQGTGLTVSSGGGGSGGG GSGGGGSQSVVTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIG AGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYDNNNRPSGVPDRFS ASKSGTASLAIITGLQAEDEADYCYQSYDRNLGCVF GTGTKVTVLSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	C13 heavy chain aa
SEQ ID NO: 71	QVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGGSISSSNWWS WVRQPPGKGLEWIGEIYHSGSTNYNPSLKSRTVISV DKSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARASPLKSQRD TEDLPRPSISAEPGTVIPLGSHVTFVCRGPVGVQTFR LERESRSTYNDTEDVSQASPSESEARFRIDSVSEGNA GPYRCIYYKPPKWSEQSDYLELLVKGEDVTWALPQ SQLDPRACPQGELPISTDIYYMDVWVGKTTVTVSS	MGD ^{UCA} VH aa
SEQ ID NO: 72	AIRMTQSPSSFSASTGDRVTITCRASQGISSYLAWYQ QKPGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFLT ISCLQSEDFATYYCQYYSYPPDFGQGTREIK	MGD ^{UCA} VL aa
SEQ ID NO: 73	QVQLIQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMS WIRQVPGKLEWISVISATTGYTDYADSVKGRFTIS RDNAKNSVFLQMNSLRVDDMAVYYCAREVLGTA WFDYWGQGTGLVTISS	TT107 VH aa
SEQ ID NO: 74	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVTSNYLAWY QQKPGQAPRLLIYGVSRRATGIPDRFSGSGSGTDFAL TISRLEPEDFAVYYCQYRSPRTFGPGTKVEFK	TT107 VL aa
SEQ ID NO: 75	EVQLVESGGGVVVRPAGESLRLSCAASGFIFNDFGMNW VRQPPGRGLEWVAGIKWRGGVALVPSVTGRFTISG DNDKNSLYLQMTSLRDEDTAVYYCARDGFRGGRG HAFDLWGQGTMTISAEDLPRPSISAEPGTVIPLGSH VTFVCRGPVGVHTFRLERESRSTYNETEDVSQASPSE SEARFRIDSVSEGNAGPYRCIYYKPPKWSEQSDYLEL LVK	MGJ1 VH

SEQ ID NO: 76	EVQVVESGGRVARPGGSLRLSCAASGFHLDYDMS WVRQPPGKLEWVAGINWNGGRTGYADSVKGRFTI SRDNAKKFLYLEMKSLRAEDTALYYCARDPGYSSG RRNALDIWGQGTMTVVSLEDLPRPSISAEPGTVIPLG SHVTFVCRGPVGVQTFRLERESRFTYNDTEDVSQASP SESEARFRIDSVSEGNAGPYRCIYYKPPKWSEQSDYL ELLVK	MGJ2 VH
SEQ ID NO: 77	EVQLVQSGGGVVRPGGFLRLSCAASGFTFENYAVA WVRQVAGKGLEWLCVINWDAAGTTNYADSVKGRFTI SRDIVKNSLVLEMSLRAEDTALYYCARDPVYGS DR GDVFDMWGQGTVVTVSSDLPRPSISAEPGTVIPLGSH VTFVCRGPVGVQTFRLERESRSTYNETEDVSQASPSE SEARFRIDSVSEGNAGPYRCIYYKPPKWSEQSDYLEL LVK	MGJ3 VH
SEQ ID NO: 78	DVQLVESGGGVVRPGVSLRLSCVASGFSFKNYDMA WVRQVPGKLEWVCGINWNGSLRGYADSVKGRFLI SRDHAKDSLQMSRLRAEDTALYYCARDPGYNTG RDHPYDLWGQGTMTVVSSEDLPRPSISAEPGTVIPLG SHVTFVCRGPVGVQTFRLERESRSTYNETEDVSQVSP SESEARFRIDSVSEGNAGPYRCIYYKPPKWSEQSDYL ELLVK	MGJ5 VH
SEQ ID NO: 79	EVQLVESGGRVVRPGESLRLSCEVSGVSINDYDMSW VRQPLGKLEWVSGIDRKGVGTGYADSVKGRFTISR DHAKNSLYLQMNSLTGDDTAFYYCVRDPGESSGRG HIFNIWGQGTMTVVSLEDLPRPSISAEPGTVIPLGSHV TFVCRGPVGVQTFRLERESRSTYNETEDVSQVSPSES EARFRIDSVSEGNAGPYRCIYYKPPKWSEQSDYLELL VK	MMJ1 VH
SEQ ID NO: 80	EVQLVESGGGVVRPGESLRLSCEVSGVNINDYDMSW VRQFLGKLEWVSGIDRKGVGTGYADSVKGRFTISR DHAKNSLYLQMNSLRGEDTALYYCVRDPGDTSGRG HIFNVWGQGTMTVVSLEDLPRPSISAEPGTVIPLGSH VTFVCRGPVGVQTFRLERESRSTYNETEDVSQVSPSE SEARFRIDSVSEGNAGPYRCIYYKPPKWSEQSDYLEL LVK	MMJ2 VH
SEQ ID NO: 81	EVQLVESGGGVVRPGESLRLSCEVSGVNINDYDMSW VRQPLGKLEWVSGIDRKGVGTGYADSVKGRFTISR DNGKNSLYLQMNSLRGEDTALYYCVRDPGDRSGRG HIFNIWGQGTMTVVSLEDLPRPSISAEPGTVIPLGSHV TFVCRGPVGVQTFRLERESRSTYNETEDVSQVSPSES EARFRIDSVSEGNAGPYRCIYYKPPKWSEQSDYLELL VK	MMJ5 VH
SEQ ID NO: 82	EVQLVESGGGVVRPGESLRLSCEVSGVSINDYDMSW VRQPLGKLEWVSGIDRKGVGTGYADSVKGRFTISR DHAKNSLYLQMNSLRGEDTALYYCVRDPGDSSGRG QIFNIWGQGTMTVVSLEDLPRPSISAEPGTVIPLGSHV TFVCRGPVGVQTFRLERESRSTYNETEDVSQVSPSES EARFRIDSVSEGNAGPYRCIYYKPPKWSEQSDYLELL VK	MMJ6 VH

SEQ ID NO: 83	EVQLVESGGGVVRRPGESLRLSCEVSGVSINDYDMSW VRQRLGKGLEWVSGIDRKGVTGYADSVKGRFTISR DHAKNSLYLQMNSLRGEDTALYYCVRDPGESSGRG HIFNIWGQGTMTVTSLEDLPRPSISAEPGTVIPLGSHV TFVCRGPVGVQTFRLERESRSTYNETEDVSQVSPSES EARFRIDSVSEGNAGPYRCIYYKPPKWSEQSDYLELL VK	MMJ7 VH
SEQ ID NO: 84	EVQLVESGGGVVRRPGESLRLSCEVSGVNINDYDMSW VRQFLGKGLEWVSGIDRKGVTGYADSVKGRFTISR DHAKNSLYLQMNSLRGEDTALYYCVRDPGDTSGRG HIFNVWGQGTMTVTSLEDLPRPSISAEPGTVIPLGSH VTFVCRGPVGVQTFRLERESRSTYNETEDVSQVSPSE SEARFRIDSVSEGNAGPYRCIYYKPPKWSEQSDYLEL LVK	MMJ8 VH
SEQ ID NO: 85	EVQLVESGGGVVRRPGESLRLSCEVSGVNINDYDMSW VRQFLGKGLEWVSGIDRKGVTGYADSVKGRFTISR DHAKNSLYLQMNSLRGEDTALYYCVRDPGDTSGRG HIFNVWGQGTMTVTSLEDLPRPSISAEPGTVIPLGSH VTFVCRGPVGVQTFRLERESRSTYNETEDVSQVSPSE SEARFRIDSVSEGNAGPYRCIYYKPPKWSEQSDYLEL LVK	MMJ10 VH
SEQ ID NO: 86	EVQLVESGGGVVRRPGESLRLSCEVSGVNINDYDMSW VRQFLGKGLEWVSGIDRKGVTGYADSVKGRFTISR DHAKNSLYLQMNSLRGEDTALYYCVRDPGDTSGRG HIFNVWGQGTMTVTSLEDLPRPSISAEPGTVIPLGSH VTFVCRGPVGVQTFRLERESRSTYNETEDVSQVSPSE SEARFRIDSVSEGNAGPYRCIYYKPPKWSEQSDYLEL LGK	MMJ16 VH
SEQ ID NO: 87	EVQLVESGGGVVRRPGESLRLSCEVSGVNINDYDMSW VRQPLGKGLEWVSGIDRKGVTGYADSVKGRFTISR DNGKNSLYLQMNSLRGEDTALYYCVRDPGDRSGRG HIFNIWGQGTMTVTSLEDLPRPSISAEPGTVIPLGSHV TFVCRGPVGVQTFRLERESRSTYNETEDVSQVSPSES EARFRIDSVSEGNAGPYRCIYYKPPKWSEQSDYLELL VK	MMJ23 VH
SEQ ID NO: 88	EVQLVESGGGVVRRPGESLRLSCEVSGVSINDYDMSW VRQPLGKGLEWVSGIDRKGVTGYADSVKGRFTISR DHAKNSLYLQMNSLRGADTALYYCVRDPGDSSGRG HIFNIWGQGTMTVTSLEDLPRPSISAEPGTVIPLGSHV TFVCRGPVGVQTFRLERESRSTYNETEDVSQVSPSES EARFRIDSVSEGNAGPYRCIYYKPPKWSEQSDYLELL VK	MMJ25 VH
SEQ ID NO: 89	QVQLAQYGGGAVQPGSLRLSCVVSGRFRFLYGIHW VRQAPGKLEWLSLIENHGRKIYYAESVKGRITVSR DNFKNVAYLEMYRLSTEDTAIYYCARNDGLGRYTD AGGTHRTAYLDYWGRGTLTVSSEDLPRPSISAEPG TVIPLGSHVTFVCRGPVGVQTFRLERESRSTYNDTED VSQASPSESEARFRIDSVSEGNAGPYRCVYYKPPKWS EQSDYLDLLVK	MGM1 VH

SEQ ID NO: 90	QVQLVESGGDVVQPGGSLRSLSCAVSGFKFNIDYDIHW VRQAPGKGLEWVSFIRHDGNNQEYADSVKGRFTISR DNFKNIIDLQMHSLRTEDTALYYCATNQSGGSDDT WETNRSAFFPHWGQGLTVTVSSDLRPSISAEPGTVI PLGSHVTFVCRGPVGVQTFRLERESRSIYNDTEDVSQ ASPSESEARFRIDSVSEGNAGPYRCVYYPKPKWSEES DYLELLVK	MGM3 VH
SEQ ID NO: 91	QVQLVESGGGVVQPGGSLRSLSCVSGFRFSTYGIHW ARQAPGKGLEWVAFIRYDGNNSYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRIEDTAVYYCAKNQASGGYDD TWGTYRSAYLDYWGQGLTVTVSSEDLRPSISAEPG TVIPLGSHVTFVCRGPVGVQTFRLERESRSTYNDTE VSQASPSESEARFRIDSVSEGNAGPYRCVYYPKPKWS EESDSLELLVK	MGM4 VH
SEQ ID NO: 92	QVQLVESGGGVVQPGGSLRSLCKMSGFKFSAFGIHW VRQAPGKGLEWVAFVRYDGGDKYYADSVKGRFTIS RDNSKNTVHLQLNSLKPADTAVYYCAKNQPSGQSD DTWGTSLSAYLDYWGQGTQVSVSPEDLRPSISAEP GTVIPLGSHVTFVCRGPVGVQTFRLERESRSTYNDTE DVSQASPSESEARFRIDSVSEGNAGPYRCVYYPKPK WSEQSDYLELLVK	MGM5 VH
SEQ ID NO: 93	EAQVVDHGNRGRARDLEDIKRRARDLEYEDLRPS ISAEPGTVIPLGSRVTFVCRGPVGVQTFRLERESRSKY NETEDVSQASPSESEARFRIDSVSEGNAGPYRCIYYK PPKWSEHSDFLELLVK	MGB2 VH
SEQ ID NO: 94	VAEVEEHINKRRARDLEYEDLRPSISAEPGTVIPLGS HVTFVCRGPVGVQTFRLERESRSRYNETEDVSQTS PSESEARFRIDSVSEGNAGPYRCLYYKTPKWSEQSDFLE LLVK	MGB43 VH
SEQ ID NO: 95	EAEVVEHVNRARRARALEYEDLRPSISAEPGTVIPLG SHVTFVCRGPVGVQTFRLERESRSRYTETEDVSQTS PSESEARFRIDSVSEGNAGPYRCLYYKPKWSEQSDFL ELLVK	MGB47 VH
SEQ ID NO: 96	DFQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQNVNTWLAW YQQAAGKAPKLLIYEASTLQSGVPSRFRGGSGTEFT LTITSLQPEDFATYYCHQYKSHPFTFGPGTKVDVR	MGJ1 VL
SEQ ID NO: 97	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQTISWLAWYQ QKPGKAPKFLIYKASFLENGVPSRFRSGSGTEFTLTI NSLQPDDEFATYYCQYKSYPFTFGPGTKVEIK	MGJ2 VL
SEQ ID NO: 98	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTFTCGASQSIDCLAWYQ QKPGKDPKLLIYKASRLEAGVPARFASGSGTEFTFTI RSMQPEDFATYYCQCYSPPFTFGPGTKVDLK	MGJ3 VL
SEQ ID NO: 99	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQ QKPGKAPKLLIYKASSLGSVPSRFRSGSGTQFTLTI SSLQPDDEFATYYCQYNNYPYTFGQGTKLEIK	MGJ5 VL

SEQ ID NO: 100	DIQMTQSPSTVSASIGDRVTITCRASQIHERSLAWYQQ KPGKSPKALIYKTSNLEDGVPSRFSGSGSGTDFLLTV SSLQPDDFANYCQQYDTPFTFGPGTTVTLR	MMJ1 VL
SEQ ID NO: 101	DIQMTQSPSTLSASIGDRVTITCRASQVIDRSLAWFQ QKPGKSPRPLIYKASTLEGGVPSRFSGSGSGTDFLLTV VSSLQPDDFANYCQQYDTPFTFGPGTTVTLR	MMJ5 VL
SEQ ID NO: 102	DIQMTQSPSTLSASIGDRVTITCRASQIHRSLAWYQQ KPGKSPRALIYKASNLEGGVPSRFSGSGSGTDFLLTV SSLQPDDFAMYYCQQYDTPFTFGPGTTVTLR	MMJ6 VL
SEQ ID NO: 103	DIQMTQSPSTLSASIGDRVTITCRASQSIDRSLAWYQ QKPGKSPKALIYKASNLEGGVPSRFSGSGSGTDFLLTV VSSLQPDDFADYYCQQYDTPFTFGPGTTVTLR	MMJ7 VL
SEQ ID NO: 104	DIQMTQSPSTLSASIGDRVTITCRASQIIDRSLAWYQQ KPGKSPKALIYKASNLEGGVPSRFSGSGSGTDFLLTV SSLQPDDFANYCQQYDTPFTFGPGTTVTLR	MMJ8 VL
SEQ ID NO: 105	DIQMTQSPSTLSASIGDRVTITCRASQIIDRSLAWYQQ KPGKSPKALIYKASNLEGGVPSRFSGSGSGTDFLLTV SSLQPDDFANYCQQYDTPFTFGPGTTVTLR	MMJ10 VL
SEQ ID NO: 106	DIQMTQSPSTLSASIGDRVTITCRASQIIDRSLAWYQQ KPGKSPKALIYKASNLEGGVPSRFSGSGSGTDFLLTV SSLQPDDFANYCQQYDTPFTFGPGTTVTLR	MMJ16 VL
SEQ ID NO: 107	DIQMTQSPSTLSASIGDRVTITCRASQVIDRSLAWFQ QKPGKSPRPLIYKASTLEGGVPSRFSGSGSGTDFLLTV VSSLQPDDFANYCQQYDTPFTFGPGTTVTLR	MMJ23 VL
SEQ ID NO: 108	DIQMTQSPSTLSASIGDRVTITCRASQNIDRSLAWYQ QKPGKSPKALIYKASNLEDGVPSRFSGSGSGTDFLLTV VSSLQPDDFALYYCQQYDTPFTFGPGTTVTLR	MMJ25 VL
SEQ ID NO: 109	SYEVTQPPSVSVSPGQAARITCSGDELPRDISWYQQ TSGQAPVLVIYEGTKRPSGIPERFSGSVSGAMATLMI SEAQLEDEGDYYCFSIDTSGNHGGAFGTGKLTVL	MGM1 VL
SEQ ID NO: 110	SYELIQPPSVSVSPGQTARITCSGELPRSTSTSWYRQK SGQAPVLIIEVSKRPSGIPERXSGSNTGKATLFIVG AQVEDEGDYYCYSTNTSGSRGAFGTGTSLLTVL	MGM3 VL
SEQ ID NO: 111	SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDAVPNTYTYWYQ QKSGQAPVLVIYEDSKRPSGIPERFSGSSGTMATFIIS GAQVEDEADYYCYSTDTSDHHRGAFGTGKVTVL	MGM4 VL
SEQ ID NO: 112	SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPRTFIYWYQQ KSRQAPVVVIYEDVKRPSGIPERFSGSISGTQATLIITG AQVEDEADYYCYSTDTNTHRGAFGTGKVTVL	MGM5 VL
SEQ ID NO: 113	EDLPRPSISAEPGTVIPLGSHVTFVCRGPVGVHTFRLE RESRSTYNATEDVSQASPESEARFRIDSVSEGNAGP YRCIYYKPPKWSEQSDYLELLVK	MGJ1 LAIR1
SEQ ID NO: 114	EDLPRPSISAEPGTVIPLGSHVTFVCRGPVGVQTFRLE RESRFTYNDTEDVSQASPESEARFRIDSVSEGNAGP YRCIYYKPPKWSEQSDYLELLVK	MGJ2 LAIR1

SEQ ID NO: 115	DLPRPSISAEPGTVIPLGSHVTFVCRGPVGVQTFRLER ESRSTYNETEDVSQASPSESEARFRIDSVSEGNAGPY RCIYYKPPKWSEQSDYLELLVK	MJ3 LAIR1
SEQ ID NO: 116	EDLPRPSISAEPGTVIPLGSHVTFVCRGPVGVQTFRLE RESRSTYNETEDVSQVSPSESEARFRIDSVSEGNAGP YRCIYYKPPKWSEQSDYLELLVK	MJ5 LAIR1
SEQ ID NO: 117	EDLPRPSISAEPGTVIPLGSHVTFVCRGPVGVQTFRLE RESRSTYNETEDVSQVSPSESEARFRIDSVSEGNAGP YRCIYYKPPKWSEQSDYLELLVK	MMJ1 LAIR1
SEQ ID NO: 118	EDLPRPSISAEPGTVIPLGSHVTFVCRGPVGVQTFRLE RESRSTYNETEDVSQVSPSESEARFRIDSVSEGNAGP YRCIYYKPPKWSEQSDYLELLVK	MMJ2 LAIR1
SEQ ID NO: 119	EDLPRPSISAEPGTVIPLGSHVTFVCRGPVGVQTFRLE RESRSTYNETEDVSQVSPSESEARFRIDSVSEGNAGP YRCIYYKPPKWSEQSDYLELLVK	MMJ5 LAIR1
SEQ ID NO: 120	EDLPRPSISAEPGTVIPLGSHVTFVCRGPVGVQTFRLE RESRSTYNETEDVSQVSPSESEARFRIDSVSEGNAGP YRCIYYKPPKWSEQSDYLELLVK	MMJ6 LAIR1
SEQ ID NO: 121	EDLPRPSISAEPGTVIPLGSHVTFVCRGPVGVQTFRLE RESRSTYNETEDVSQVSPSESEARFRIDSVSEGNAGP YRCIYYKPPKWSEQSDYLELLVK	MMJ7 LAIR1
SEQ ID NO: 122	EDLPRPSISAEPGTVIPLGSHVTFVCRGPVGVQTFRLE RESRSTYNETEDVSQVSPSESEARFRIDSVSEGNAGP YRCIYYKPPKWSEQSDYLELLVK	MMJ8 LAIR1
SEQ ID NO: 123	EDLPRPSISAEPGTVIPLGSHVTFVCRGPVGVQTFRLE RESRSTYNETEDVSQVSPSESEARFRIDSVSEGNAGP YRCIYYKPPKWSEQSDYLELLVK	MMJ10 LAIR1
SEQ ID NO: 124	EDLPRPSISAEPGTVIPLGSHVTFVCRGPVGVQTFRLE RESRSTYNETEDVSQVSPSESEARFRIDSVSEGNAGP YRCIYYKPPKWSEQSDYLELLGK	MMJ16 LAIR1
SEQ ID NO: 125	EDLPRPSISAEPGTVIPLGSHVTFVCRGPVGVQTFRLE RESRSTYNETEDVSQVSPSESEARFRIDSVSEGNAGP YRCIYYKPPKWSEQSDYLELLVK	MMJ23 LAIR1
SEQ ID NO: 126	EDLPRPSISAEPGTVIPLGSHVTFVCRGPVGVQTFR LERESRSTYNETEDVSQVSPSESEARFRIDSVSEGN AGPYRCIYYKPPKWSEQSDYLELLVK	MMJ25 LAIR1
SEQ ID NO: 127	EDLPRPSISAEPGTVIPLGSHVTFVCRGPVGVQTFRLE RESRSTYNDTEDVSQASPSESEARFRIDSVSEGNAGP YRCVYYKPPKWSEQSDYLDLLVK	MGM1 LAIR1
SEQ ID NO: 128	DLPRPSISAEPGTVIPLGSHVTFVCRGPVGVQTFRLER ESRSIYNDTEDVSQASPSESEARFRIDSVSEGNAGPYR CVYYKPPKWSEESDYLELLVK	MGM3 LAIR1
SEQ ID NO: 129	EDLPRPSISAEPGTVIPLGSHVTFVCRGPVGVQTFRLE RESRSTYNDTEDVSQASPSESEARFRIDSVSEGNAGP YRCVYYKPPKWSEESDLELLVK	MGM4 LAIR1
SEQ ID NO: 130	EDLPRPSISAEPGTVIPLGSHVTFVCRGPVGVQTFRLE RESRSTYNDTEDVSQASPSESEARFRIDSVSEGNAGP YRCVYYKPPKWSEQSDYLELLVK	MGM5 LAIR1
SEQ ID NO: 131	EDLPRPSISAEPGTVIPLGSRVTFVCRGPVGVQTFRLE RESRSKYNATEDVSQASPSESEARFRIDSVSEGNAGP YRCIYYKPPKWSEHSDFLELLVK	MGB2 LAIR1
SEQ ID NO: 132	EDLPRPSISAEPGTVIPLGSHVTFVCRGPVGVQTFRLE RESRSRYNETEDVSQTSPESEARFRIDSVSEGNAGP YRCLYYKTPKWSEQSDFLELLVK	MGB43 LAIR1
SEQ ID NO: 133	EDLPRPSISAEPGTVIPLGSHVTFVCRGPVGVQTFRLE RESRSRYTETEDVSQTSPESEARFRIDSVSEGNAGPY RCLYYKPPKWSEQSDFLELLVK	MGB47 LAIR1

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент с функциональным доменом в области изгиба, которое/который включает первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, первая из которых содержит в направлении от N к C

- (i) один или несколько переменных доменов,
- (ii) функциональный домен, и

- (iii) один или несколько константных доменов, а указанная вторая полипептидная цепь включает в направлении от N к C
- (iv) один или несколько переменных доменов, формирующих сайты связывания антигена с одним или несколькими переменными доменами первой полипептидной цепи,
- (v) функциональный домен, и
- (vi) один или несколько константных доменов, отличающиеся тем, что указанный функциональный домен (ii) первой полипептидной цепи не включает фрагмента второй полипептидной цепи и указанный функциональный домен (v) второй полипептидной цепи не включает фрагмента первой полипептидной цепи, при этом
 - (а) один или несколько константных доменов первой полипептидной цепи являются константными доменами тяжелой цепи, содержащими по меньшей мере константный домен CH1, один или несколько переменных доменов первой полипептидной цепи - переменными доменами тяжелой цепи VH, константный домен второй полипептидной цепи является константным доменом CL легкой цепи, и один или несколько переменных доменов второй полипептидной цепи - переменными доменами VL легкой цепи, или
 - (б) константные домены первой полипептидной цепи являются константным доменом CL легкой цепи, один или несколько переменных доменов первой полипептидной цепи - переменными доменами VL легкой цепи, один или несколько константных доменов второй полипептидной цепи - константными доменами тяжелой цепи, содержащими по меньшей мере константный домен CH1, и один или несколько переменных доменов второй полипептидной цепи - переменными доменами VH тяжелой цепи.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент с функциональным доменом в области изгиба, которое/который включает первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, первая из которых включает в направлении от N к C

- (i) один или несколько переменных доменов,
- (ii) функциональный домен, и
- (iii) один или несколько константных доменов, а указанная вторая полипептидная цепь включает в направлении от N к C
- (iv) один или несколько переменных доменов, формирующих сайты связывания антигена с одним или несколькими переменными доменами первой полипептидной цепи, и
- (v) один или несколько константных доменов, отличающиеся тем, что C-конец самого крайнего C-концевого переменного домена второй полипептидной цепи непосредственно связан с N-концом самого крайнего N-концевого константного домена второй полипептидной цепи, при этом
 - (а) один или несколько константных доменов первой полипептидной цепи являются константными доменами тяжелой цепи, содержащими по меньшей мере константный домен CH1, один или несколько переменных доменов первой полипептидной цепи - переменными доменами тяжелой цепи VH, константный домен второй полипептидной цепи - константным доменом CL легкой цепи, и один или несколько переменных доменов второй полипептидной цепи - переменными доменами VL легкой цепи, или
 - (б) константные домены первой полипептидной цепи являются константным доменом CL легкой цепи, один или несколько переменных доменов первой полипептидной цепи - переменными доменами VL легкой цепи, один или несколько константных доменов второй полипептидной цепи - константными доменами тяжелой цепи, содержащими по меньшей мере константный домен CH1, и один или несколько переменных доменов второй полипептидной цепи - переменными доменами VH тяжелой цепи.

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, в котором домен CH1 и необязательно какой-либо дополнительный константный домен тяжелой цепи выбраны из следующих классов: γ , α , μ , ϵ и δ .

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, в котором домен CL выбран из следующих классов: κ и λ .

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, в котором функциональный домен (ii) первой полипептидной цепи и/или функциональный домен (v) второй полипептидной цепи включают(ет) или состоят(ит) из Ig-подобного домена.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.5, в котором Ig-подобный домен выбран из Ig-подобного домена (доменов) PD1, SLAM, CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD22, CD33, CD80 или CD86.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, в котором функциональный домен (ii) первой полипептидной цепи и/или функциональный домен (v) второй полипептидной цепи включают(ет) несущий домен, репортерный домен, метки, домен локализации, (независимый) сайт связывания, энзим или энзиматический домен, рецептор или его функциональный фрагмент или лиганд или его функциональный фрагмент.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.7, в котором функциональный домен (ii) первой полипептидной цепи и/или функциональный домен (v) второй полипептидной цепи включает домен-носитель.

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.8, в котором домен-носитель предусмотрен для конъюгации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с лекарственным средством или с визуализирующим агентом.

10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.7, в котором функциональный домен (ii) первой полипептидной цепи и/или функциональный домен (v) второй полипептидной цепи включают(ет) репортерный домен.

11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.10, где репортерный домен содержит аминокислотные последовательности GFP, YFP, RFP, CFP, люциферазы, бета-галактозидазы или пероксидазы.

12. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.7, в котором функциональный домен (ii) первой полипептидной цепи и/или функциональный домен (v) второй полипептидной цепи включают(ет) домен локализации.

13. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.7, в котором функциональный домен (ii) первой полипептидной цепи и/или функциональный домен (v) второй полипептидной цепи включают(ет) фермент или ферментативный домен, например каталитический домен.

14. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.7, в котором функциональный домен (ii) первой полипептидной цепи и/или функциональный домен (v) второй полипептидной цепи включают(ет) метку.

15. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.14, в котором метка является аффинной меткой, меткой солиubilизации, хроматографической меткой, эпитопной меткой или флуоресцентной меткой.

16. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.7, в котором функциональный домен (ii) первой полипептидной цепи и/или функциональный домен (v) второй полипептидной цепи включают(ет) рецептор или его функциональный фрагмент, например Ig-подобный домен рецептора.

17. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.16, в котором функциональный домен включает (i) рецептор, выбранный из группы, состоящей из PD1, SLAM, LAIR1, CTLA4, BTLA, TIM-3, TIGIT, CD200R1, 2B4 (CD244), TLT2, LILRB4, KIR2DL2, ICOS или CD28, или (ii) функциональный фрагмент рецептора, например, Ig-подобного домена какого-либо одного из следующих рецепторов: PD1, SLAM, LAIR1, CTLA4, BTLA, TIM-3, TIGIT, CD200R1, 2B4 (CD244), TLT2, LILRB4, KIR2DL2, ICOS или CD28.

18. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.7, в котором функциональный домен (ii) первой полипептидной цепи и/или функциональный домен (v) второй полипептидной цепи включает лиганд или его функциональный фрагмент.

19. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.18, в котором лиганд является цитокином и/или лигандом PD1, SLAM, LAIR1, CTLA4, BTLA, TIM-3, TIGIT, CD200R1, 2B4 (CD244), TLT2, LILRB4, KIR2DL2, ICOS или CD28.

20. Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент по п.18, в котором лиганд выбран из группы, включающей PD-L1, PD-L2, B7-1, B7-2, B7-H4 (гомолог B7), галектин-9, рецептор вируса полиомиелита (PVR), мембранный гликопротеин OX-2, CD48, B7-H3 (гомолог B7), MHCI, ICOS-L.

21. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.18, в котором лиганд выбран из группы, состоящей из цитокинов семейства SIS, цитокинов семейства SIG, цитокинов семейства SCY, представителей надсемейства тромбоцитарного фактора 4 и интеркринов, СС-хемокиновых лигандов с CCL-1 по CCL-28, CXCL1-CXCL17, XCL1 (лимфотактина- α) и XCL2 (лимфотактина- β), фракталкин (или CX₃CL1); интерферонов, например типа I IFN, типа II IFN и типа III IFN, в частности IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IFN- ϵ , IFN- κ , IFN- ω , IL10R2 (также называемый CRF2-4) и IFNLR1 (также называемый CRF2-12); интерлейкины, например IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IL-34, IL-35 и IL-36; лимфокинов, например IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, GM-CSF и интерферона-гамма; факторов некроза опухоли, например CD40LG (TNFSF5); CD70 (TNFSF7); EDA; FASLG (TNFSF6); LTA (TNFSF1); LTB (TNFSF3); TNF, TNF α , TNFSF4 (OX40L); TNFSF8 (CD153); TNFSF9; TNFSF10 (TRAIL); TNFSF11 (RANKL); TNFSF12 (TWEAK); TNFSF13; TNFSF13B; TNFSF14; TNFSF15 и TNFSF18; и колониестимулирующих факторов, например CSF1 (колониестимулирующего фактора макрофагов), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (G-CSF), а также синтетических CSF, например промегапo-этина.

22. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.7, в котором функциональный домен (ii) первой полипептидной цепи и/или функциональный домен (v) второй полипептидной цепи включают(ет) или состоят(ит) из (независимого) сайта связывания.

23. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.22, в котором (независимый) сайт связы-

вания включает рецептор или его функциональный фрагмент, включающий сайт связывания, лиганд или его функциональный фрагмент, включающий сайт связывания, молекулу CD или ее функциональный фрагмент, одноцепочечное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, антиген или его функциональный фрагмент, или метку, включающую сайт связывания.

24. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.23, в котором (независимый) сайт связывания включает одноцепочечное антитело (например, scFv или VHH) или его антигенсвязывающий фрагмент, или антиген или его функциональный фрагмент.

25. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-24, в котором функциональный домен включает Ig-подобный домен, scFv, VHH или Strep-tag.

26. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.25, в котором функциональный домен включает последовательность аминокислот, представленную в любой из последовательностей SEQ ID NO: 13-20, или вариант ее функциональной последовательности, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98% идентична последовательности.

27. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-26, в котором первая полипептидная цепь включает единственный вариабельный домен (i) N-концевого функционального домена (ii) и вторая полипептидная цепь включает единственный вариабельный домен (iv) N-концевого необязательного функционального домена (v) или N-концевого одного или нескольких константных доменов (vi), причем единственный вариабельный домен (iv) второй полипептидной цепи формирует сайт связывания антигена с вариабельным доменом (i) первой полипептидной цепи.

28. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-26, в котором первая полипептидная цепь включает два или более вариабельных доменов (i) N-концевого функционального домена (ii) и вторая полипептидная цепь включает два или несколько вариабельных доменов (iv) N-концевого необязательного функционального домена (v) или N-концевого одного или более константных доменов (vi), два или несколько вариабельных доменов (iv) второй полипептидной цепи, формируя сайты связывания антигена с двумя или несколькими вариабельными доменами (i) первой полипептидной цепи.

29. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-28, в котором первая полипептидная цепь включает одноцепочечное антитело, например, scFv или однодоменное антитело, например, VHH, N-конец самого крайнего N-концевого вариабельного домена (i) и/или C-конец самого крайнего C-концевого константного домена (iii).

30. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-29, в котором вторая полипептидная цепь включает одноцепочечное антитело, например, scFv или однодоменное антитело, например, VHH, N-конец самого крайнего N-концевого вариабельного домена (i) и/или C-конец самого крайнего C-концевого константного домена (vi).

31. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-30, в котором первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь каждая включает единственный константный домен, в частности домен CL и домен CH1, соответственно.

32. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-31, в котором первая полипептидная цепь или вторая полипептидная цепь включает единственный константный домен, в частности домен CL; а другая первая полипептидная цепь или вторая полипептидная цепь включает домен CH1 и один или несколько дополнительных константных доменов, например домен CH2 и/или CH3.

33. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-32, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает часть молекулы Fc или область Fc.

34. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-33, в котором первая полипептидная цепь и/или вторая полипептидная цепь содержит/содержат один или несколько линкеров.

35. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-34, в котором первая полипептидная цепь и/или вторая полипептидная цепь не содержит/содержат каких-либо линкеров.

36. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-35, в котором первая полипептидная цепь включает или состоит из V-D-CH1, где

V является вариабельным доменом (i),

D является функциональным доменом (ii), и

CH1 является константным доменом CH1 (iii).

37. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.36, в котором первая полипептидная цепь включает или состоит из V-D-CH1-CH2-CH3, где CH2 и CH3 являются константным доменом CH2 и константным доменом CH3, соответственно.

38. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.35-37, в котором первая полипептидная цепь включает или состоит из $(V)_A$ -D-CH1, где A означает целое число от 1 до 5.

39. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-37, в котором вторая полипептидная цепь включает или состоит из V-CL, где V является вариабельным доменом (iv); и CL является константным доменом (vi).

40. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.39, в котором вторая полипептидная цепь

включает или состоит из $(V)_A$ -CL, где A означает целое число от 1 до 5.

41. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-40, в котором вариабельный домен (i) первой полипептидной цепи включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 1, 5, 8 или 10, или варианта ее функциональной последовательности, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98% идентична этой последовательности.

42. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-41, в котором вариабельный домен (iv) второй полипептидной цепи включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в любой из последовательностей SEQ ID NO: 2, 6, 9 или 11, или варианта ее функциональной последовательности, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98% идентична этой последовательности.

43. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-42, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает одну или две первые полипептидные цепи и одну или две вторые полипептидные цепи.

44. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-43, в котором первая полипептидная связь и вторая полипептидная связь связаны дисульфидной связью, тем самым формируя пару.

45. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.43 или по п.44, которое/который включает две первые полипептидные цепи и две вторые полипептидные цепи, причем две первые полипептидные цепи и/или две вторые полипептидные цепи связаны одной или несколькими, например, двумя дисульфидными связями.

46. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-45, которое/который являются двухвалентным для каждой специфичности/антигена.

47. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-45, которое/который является одновалентным для каждой специфичности (антигена).

48. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.46 или 47, в котором сайт (сайты) связывания антигена, сформированные одним или несколькими вариабельными доменами первой пары первой и второй полипептидных цепей, и сайт (сайты) связывания антигена, сформированные одним или несколькими вариабельными доменами второй пары первой и второй полипептидных цепей, одинаковы или различны.

49. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-48, которое/который включает по меньшей мере два функциональных домена, которые могут быть одинаковыми или разными.

50. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-49, которое/который включает две первые полипептидные цепи и две вторые полипептидные цепи, формирующие первую и вторую пару первой и второй полипептидных цепей, причем первая пара первой и второй полипептидных цепей содержат, по меньшей мере, один функциональный домен (домены) и/или вторая пара первой и второй полипептидных цепей содержат, по меньшей мере, один функциональный домен (домены).

51. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-50, которое/который происходит от IgG-подобного антитела, Fab или $F(ab)_2$.

52. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-51, в котором вариабельные домены и/или константные домены являются человеческими или гуманизированными.

53. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-52, в котором (дополнительный) функциональный домен (домены) состоит или включают аминокислотную последовательность, которая является последовательностью человека или гуманизированной.

54. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-53, в котором первая полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, являющейся какой-либо из ниже приведенных последовательностей SEQ ID NO: 53, 55, 56, 58, 59, 60, 61, 62, 64, 65, 66, 68, 69 или 70 или функциональным вариантом этой последовательности, который по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98% идентичен этой последовательности, и/или вторая полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, являющейся любой из приведенных ниже последовательностей SEQ ID NO: 54, 57, 63 или 67 или функциональным вариантом этой последовательности, который по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98% идентичен этой последовательности.

55. Молекула нуклеиновой кислоты, включающая полинуклеотид, кодирующий первую полипептидную цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-54.

56. Молекула нуклеиновой кислоты, включающая полинуклеотид, кодирующий вторую полипептидную цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-54.

57. Молекула нуклеиновой кислоты, включающая полинуклеотид, кодирующий первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по лю-

бому из пп.1-54.

58. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп.55-57, в которой молекула нуклеиновой кислоты является молекулой ДНК или молекулой РНК.

59. Вектор-экспрессии, включающий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.55-58.

60. Клетка-хозяин, включающая молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.55-58 или вектор-экспрессии по п.59.

61. Фармацевтическая композиция, включающая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-54, молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.55-58, вектор-экспрессии по п.59.

62. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-54, включающий:

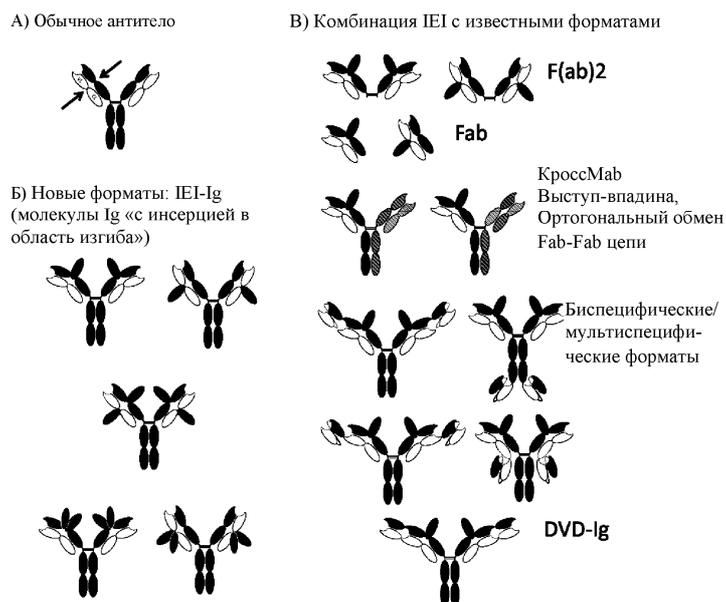
а) трансформацию эукариотической клетки-хозяина путем включения одной или нескольких молекул нуклеиновой кислоты по п.55 и 56 или по п.57, кодирующих первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь,

б) культивирование клетки-хозяина в условиях, обеспечивающих экспрессию полипептидных цепей антитела, и

в) вызывая или обеспечивая первой и второй полипептидным цепям объединение для формирования антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

63. Способ по п.62, дополнительно включающий очистку антитела или его антигенсвязывающего фрагмента от культуральной среды.

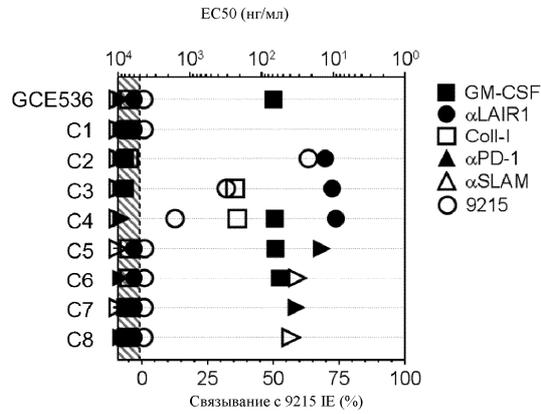
64. Способ профилактики или лечения рака, инфекционного заболевания или аутоиммунного расстройства у субъекта, включающий стадию введения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-54, молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп.55-58, вектора-экспрессии по п.59 или композиции по п.61 субъекту.



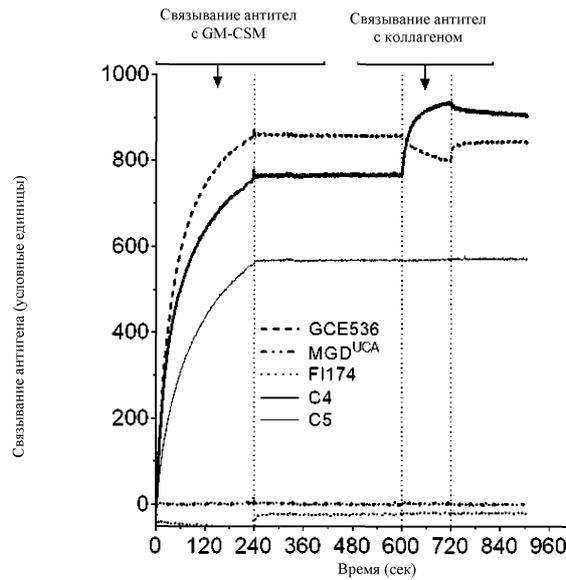
Фиг. 1

GCE536	VH1-46	D	JH6	
C1	VH3-30	D	JH6	
C1b	VH3-20	D	JH3	
C2	VH3-30	D	JH6	LAIR1 ^{mut}
C3	VH3-30	D	JH6	LAIR1 ^{gen}
C4	VH1-46	D	JH6	LAIR1 ^{gen}
C5	VH1-46	D	JH6	PD1
C5b	VH1-46	D	JH6	PD1
C6	VH1-46	D	JH6	SLAM
C6b	VH1-46	D	JH6	SLAM
C7	VH3-20	D	JH3	PD1
C8	VH3-20	D	JH3	SLAM
C9	VH3-20	D	JH3	2XST

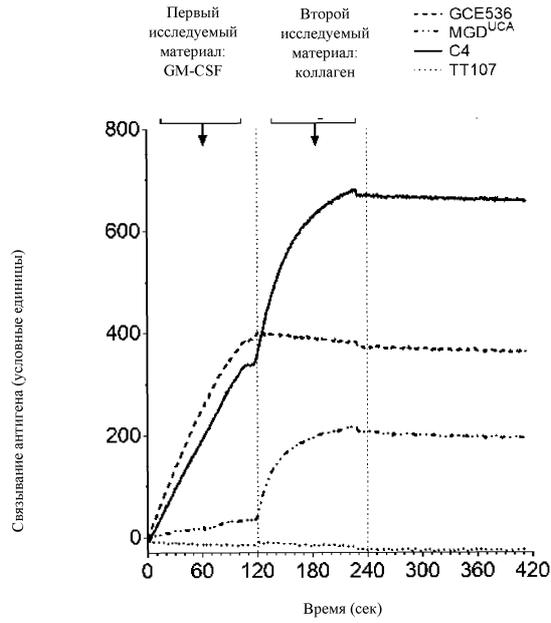
Фиг. 2



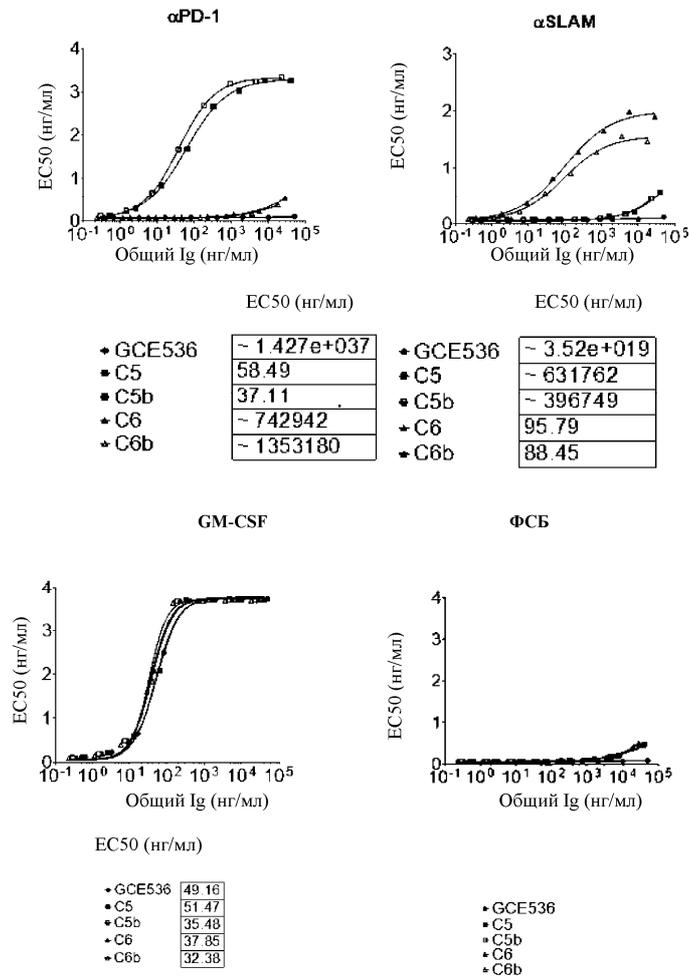
Фиг. 3



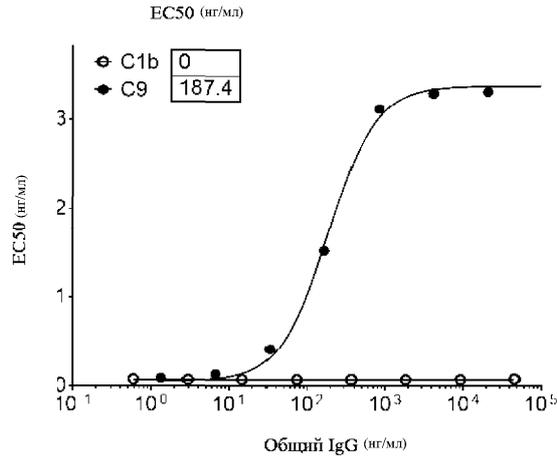
Фиг. 4



Фиг. 5



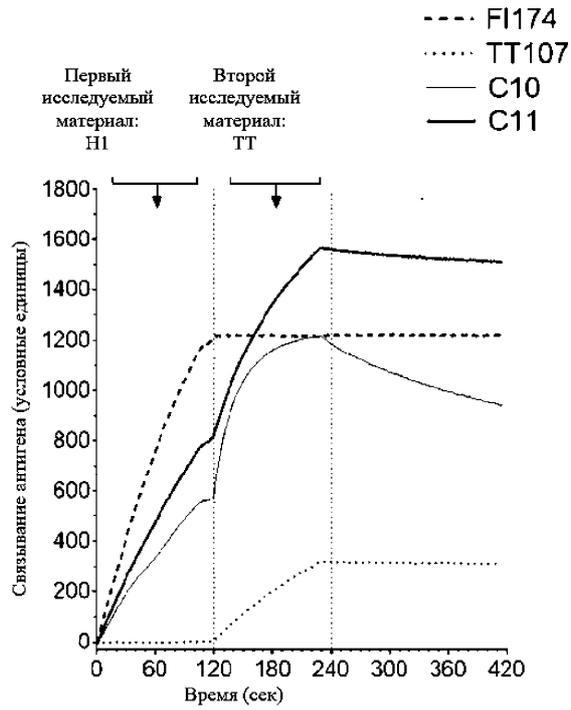
Фиг. 6



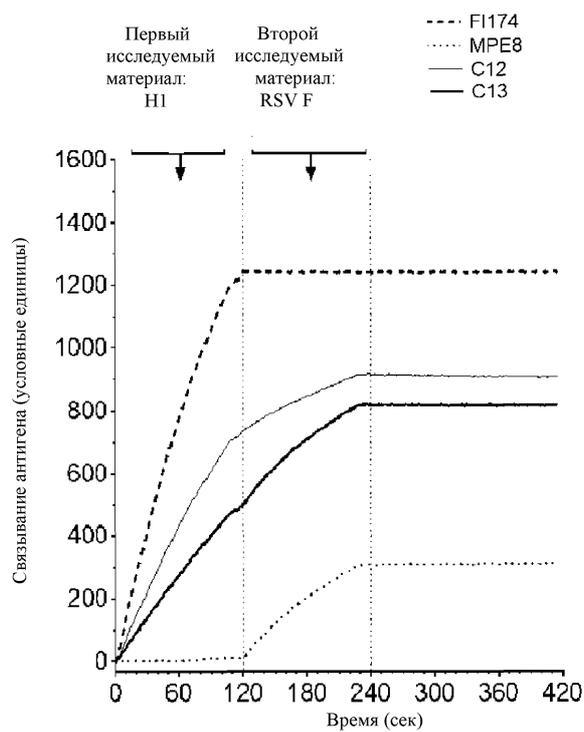
Фиг. 7

F1174	VH1-69	D	JH4	
C10	VH1-69	D	JH4	T3-VHH
C11	VH1-69	D	JH4	TT39.7-ScFv
C12	VH1-69	D	JH4	F4-VHH
C13	VH1-69	D	JH4	MPE8-ScFv

Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10

