

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047566**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.08.07

(21) Номер заявки
202290238

(22) Дата подачи заявки
2020.07.06

(51) Int. Cl. **C07K 14/47** (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

**(54) ПОЛИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ПРОДУКТЫ СЛИЯНИЯ ТРАНСТИРЕТИНА И
ИММУНОГЛОБУЛИНА**

(31) 62/871,247

(32) 2019.07.08

(33) US

(43) 2022.04.25

(86) PCT/US2020/040873

(87) WO 2021/007150 2021.01.14

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Уокер Кеннет Уилльям (US)

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

(56) WO-A1-2019070901

RICARDO SANT'ANNA ET AL.: "Cavity filling mutations at the thyroxine-binding site dramatically increase transthyretin stability and prevent its aggregation", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 7, no. 1, 24 March 2017 (2017-03-24), XP055727221, DOI: 10.1038/srep44709, abstract, page 2, paragraph 2-4, page 10, paragraph 3

UEMICHI T. ET AL.: "A new mutant transthyretin (Arg 10) associated with familial amyloid polyneuropathy", JOURNAL OF MEDICAL GENETICS, BMJ, PUBLISHING GROUP, LONDON, GB, vol. 29, no. 12, 1 December 1992 (1992-12-01), pages 888-891, XP002623510, ISSN: 0022-2593, DOI: 10.1136/JMG.29.12.888, abstract, page 890, left-hand column, paragraph 3 - page 891, left-hand column, paragraph 1

(57) Изобретение относится к полиспецифическим комплексам на основе транстиретина (TTR), применимым в качестве полиспецифических связывающих белков. Полиспецифические комплексы на основе TTR, описанные в данном изобретении, особенно применимы для связывания с одним, двумя или несколькими эпитопами, которые могут присутствовать на одном или нескольких белках. Способы лечения заболеваний с применением комплексов на основе TTR по настоящему изобретению описаны в данном документе.

B1

047566

047566 B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 62/871247, поданной 8 июля 2019 г., которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Ссылка на перечень последовательностей

Данная заявка содержит перечень последовательностей в машиночитаемой форме. Перечень последовательностей представлен в виде текстового файла под названием A-2414-WO-PCT_SeqList_ST25.txt, созданного 1 июля 2020 г., размер которого составляет 101660 байт. Информация о перечне последовательностей в электронной форме включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к полиспецифическим комплексам на основе транстиретина (TTR), применимым в качестве полиспецифических связывающих белков. Полиспецифические комплексы на основе TTR, описанные в данном документе, особенно применимы для связывания с одним, двумя или несколькими эпитопами, которые могут присутствовать на одном или нескольких белках. Способы лечения заболеваний с применением комплексов на основе TTR по настоящему изобретению описаны в данном документе.

Предпосылки создания изобретения

Моноспецифические антитела, т.е. антитела, которые связывают один антиген, представляют собой широко известный класс соединений, одобренных в различных терапевтических областях. Действительно, за последнее десятилетие многие фармацевтические средства на основе моноспецифических антител были одобрены в различных странах.

Полиспецифические белки, такие как полиспецифические антитела, стали предметом все большего количества исследований. Полиспецифические белки способны связываться с двумя или более различными антигенами на одном или различных белках. Это предоставляет возможность воздействия на два разных биологических пути одновременно.

Транстиретин (TTR) представляет собой нековалентный тетрамерный белок сыворотки крови и спинномозговой жидкости человека, который играет роль в переносе части циркулирующего тироксина и в периоде полужизни ретинолсвязывающего белка в сыворотке крови. TTR обычно присутствует в виде тетрамерного (~ 56 кДа) белка сыворотки крови, каждая мономерная единица которого характеризуется примерной молекулярной массой, составляющей 14 кДа.

Предыдущие попытки осуществить мультимеризацию белков включают применение стрептавидина (Kipriyanov et al., Protein Engineering, 9(2):203-211 (1996)), конструкций типа спираль-поворот-спираль (Kriangkum et al., Biomolecular Engineering, 18:31-40 (2001)), лейциновых застежек-молний (Kruif et al., The Journal of Biological Chemistry, 271(13):7630-7634, 1996 (1996)), комплексов барназа/барстар (Deyev et al., Nature Biotechnology, 21(12):1486-1492 (2003)) и технологии Dock N Lock (взаимодействия протектикиназы и якорного домена якорного белка А-киназы) (Goldenberg et al., Journal of Nuclear Medicine, 49(1):158-163 (2008)).

Однако остается потребность в эффективных способах получения полиспецифических белков (например целых антител и фрагментов антител), которые способны связывать несколько эпитопов на одном или разных белках.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к белковому комплексу на основе TTR, где белковый комплекс на основе TTR содержит субъединицы А, В, С и D TTR; субъединицы А и В TTR димеризуются с образованием димера АВ TTR; субъединицы С и D TTR димеризуются с образованием димера CD TTR; димеры АВ и CD TTR дополнительно димеризуются с образованием тетрамера ABCD TTR и каждая из субъединиц А, В, С и D содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, за исключением того, что по меньшей мере одна аминокислота в области контакта между димером АВ TTR и димером CD TTR подвергнута мутации таким образом, что образование тетрамера ABCD является более предпочтительным, чем образование любого другого тетрамера (например тетрамера АВАВ или тетрамера CDCD).

Каждая из субъединиц А, В, С и D белкового комплекса на основе TTR может содержать аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1 со следующими мутациями: C10A, K15A или обеими из C10A и K15A.

Таким образом, в одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к белковым комплексам на основе TTR, где обе из А и В, обе из С и D или все четыре из А, В, С и D содержат мутацию в одном или нескольких аминокислотных положениях, выбранных из перечня, содержащего 6, 7, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 50, 51, 52, 53, 54, 56, 57, 60, 61, 62, 63, 78, 82, 83, 84, 85, 100, 101, 102, 103, 104, 106, 108, 110, 112, 113, 114, 115, 117, 119, 121, 123, 124, 125, 126 и 127 из SEQ ID NO: 1.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к белковому комплексу на основе TTR, где обе из А и В, обе из С и D или все четыре из А, В, С и D содержат мутацию в одном или

нескольких аминокислотных положениях, выбранных из перечня, содержащего 15, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 51, 52, 84, 106, 108, 112, 114, 115, 119, 121 и 123 из SEQ ID NO: 1.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к белковому комплексу на основе TTR, где обе из А и В, обе из С и D или все четыре из А, В, С и D содержат мутацию в одном или нескольких аминокислотных положениях, выбранных из перечня, содержащего 15, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 51, 52, 84, 106, 108, 112, 114, 115, 119, 121 и 123 из SEQ ID NO: 1, где указанная аминокислота подвергнута мутации с заменой на аспаргат, глутамат, аргинин, лизин или гистидин.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к белковому комплексу на основе TTR, где А и В содержат мутацию в одном или нескольких аминокислотных положениях, выбранных из перечня, содержащего 15, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 51, 52, 84, 106, 108, 112, 114, 115, 119, 121 и 123 из SEQ ID NO: 1, где указанная аминокислота подвергнута мутации с заменой на аспаргат или глутамат.

В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к белковому комплексу на основе TTR, где С и D содержат мутацию в одном или нескольких аминокислотных положениях, выбранных из перечня, содержащего 15, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 51, 52, 84, 106, 108, 112, 114, 115, 119, 121 и 123 из SEQ ID NO: 1, где указанная аминокислота подвергнута мутации с заменой на аргинин, лизин или гистидин.

В конкретном варианте осуществления А и В содержат мутацию в одном или нескольких аминокислотных положениях, выбранных из перечня, содержащего 15, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 51, 52, 84, 106, 108, 112, 114, 115, 119, 121 и 123 из SEQ ID NO: 1, где указанная аминокислота подвергнута мутации с заменой на аспаргат или глутамат и С и D содержат мутацию в одном или нескольких аминокислотных положениях, выбранных из перечня, содержащего 15, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 51, 52, 84, 106, 108, 112, 114, 115, 119, 121 и 123 из SEQ ID NO: 1, где указанная аминокислота подвергнута мутации с заменой на аргинин, лизин или гистидин.

В некоторых вариантах осуществления А и В содержат по меньшей мере одну мутацию в SEQ ID NO: 1, где указанная мутация выбрана из перечня, содержащего K15D, L17D, V20D, R21D, G22D, S23D, P24D, S52D, I84D, T106D, A108D, S112D, Y114D, S115D, T119D, V121D, S123D, K15E, L17E, V20E, R21E, G22E, S23E, P24E, D51E, S52E, I84E, T106E, A108E, S112E, Y114E, S115E, T119E, V121E и S123E. Настоящее изобретение также относится к белковым комплексам на основе TTR, где А и В содержат по меньшей мере одну мутацию в SEQ ID NO: 1, где мутация выбрана из перечня, содержащего L17D, L17E, V20D, V20E, G22D, G22E, S112D, S112E, T119D, T119E, V121D и V121E.

В некоторых вариантах осуществления С и D содержат по меньшей мере одну мутацию в SEQ ID NO: 1, где указанная мутация выбрана из перечня, содержащего K15R, L17R, V20R, G22R, S23R, P24R, D51R, S52R, I84R, T106R, A108R, S112R, Y114R, S115R, T119R, V121R, S123R, L17K, V20K, R21K, G22K, S23K, P24K, D51K, S52K, I84K, T106K, A108K, S112K, Y114K, S115K, T119K, V121K, S123K, K15H, L17H, V20H, R21H, G22H, S23H, P24H, D51H, S52H, I84H, T106H, A108H, S112H, Y114H, S115H, T119H, V121H и S123H. Настоящее изобретение также относится к белковым комплексам на основе TTR, где С и D содержат по меньшей мере одну мутацию в SEQ ID NO: 1, где мутация выбрана из перечня, содержащего L17R, L17K, L17H, V20R, V20K, V20H, G22R, G22K, G22H, S112R, S112K, S112H, T119R, T119K, T119H, V121R, V121K и V121H.

В других вариантах осуществления обе из А и В, обе из С и D или все четыре из А, В, С и D независимо содержат одну мутацию, описанную выше. В еще одних вариантах осуществления обе из А и В, обе из С и D или все четыре из А, В, С и D независимо содержат две указанные мутации, описанные выше.

В конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к белковому комплексу на основе TTR, где каждая из А, В, С и D содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1 со следующими мутациями:

- А и В содержат C10A/K15A/L17D, а С и D содержат C10A/K15A/L17R (или наоборот);
- А и В содержат C10A/K15A/L17E, а С и D содержат C10A/K15A/L17R (или наоборот);
- А и В содержат C10A/K15A/V20D, а С и D содержат C10A/K15A/L17R (или наоборот);
- А и В содержат C10A/K15A/V20E, а С и D содержат C10A/K15A/L17R (или наоборот);
- А и В содержат C10A/K15A/G22D, а С и D содержат C10A/K15A/L17R (или наоборот);
- А и В содержат C10A/K15A/G22E, а С и D содержат C10A/K15A/L17R (или наоборот);
- А и В содержат C10A/K15A/S112D, а С и D содержат C10A/K15A/L17R (или наоборот);
- А и В содержат C10A/K15A/S112E, а С и D содержат C10A/K15A/L17R (или наоборот);
- А и В содержат C10A/K15A/T119D, а С и D содержат C10A/K15A/L17R (или наоборот);
- А и В содержат C10A/K15A/T119E, а С и D содержат C10A/K15A/L17R (или наоборот);
- А и В содержат C10A/K15A/V121D, а С и D содержат C10A/K15A/L17R (или наоборот);
- А и В содержат C10A/K15A/V121E, а С и D содержат C10A/K15A/L17R (или наоборот);
- А и В содержат C10A/K15A/L17D, а С и D содержат C10A/K15A/L17K (или наоборот);
- А и В содержат C10A/K15A/L17E, а С и D содержат C10A/K15A/L17K (или наоборот);
- А и В содержат C10A/K15A/V20D, а С и D содержат C10A/K15A/L17K (или наоборот);
- А и В содержат C10A/K15A/V20E, а С и D содержат C10A/K15A/L17K (или наоборот);
- А и В содержат C10A/K15A/G22D, а С и D содержат C10A/K15A/L17K (или наоборот);

А и В содержат С10А/К15А/Т119Е, а С и D содержат С10А/К15А/В121К (или наоборот);
 А и В содержат С10А/К15А/В121D, а С и D содержат С10А/К15А/В121К (или наоборот) или
 А и В содержат С10А/К15А/В121Е, а С и D содержат С10А/К15А/В121К (или наоборот).

В других конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к белковому комплексу на основе ТТР, где каждая из А, В, С и D содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1 со следующими мутациями:

А и В содержат С10А/К15А/Л17D, а С и D содержат С10А/К15А/В121R (или наоборот);
 А и В содержат С10А/К15А/Л17D, а С и D содержат С10А/К15А/В121К (или наоборот);
 А и В содержат С10А/К15А/Л17Е, а С и D содержат С10А/К15А/В121R (или наоборот);
 А и В содержат С10А/К15А/В20D, а С и D содержат С10А/К15А/В20R (или наоборот);
 А и В содержат С10А/К15А/В20D, а С и D содержат С10А/К15А/В20К (или наоборот);
 А и В содержат С10А/К15А/В20Е, а С и D содержат С10А/К15А/В20R (или наоборот);
 А и В содержат С10А/К15А/В20Е, а С и D содержат С10А/К15А/В20К (или наоборот);
 А и В содержат С10А/К15А/Т119D, а С и D содержат С10А/К15А/Л17R (или наоборот);
 А и В содержат С10А/К15А/Т119D, а С и D содержат С10А/К15А/Л17К (или наоборот) или
 А и В содержат С10А/К15А/В121Е, а С и D содержат С10А/К15А/Л17К (или наоборот).

В некоторых вариантах осуществления А и В содержат две мутации в SEQ ID NO: 1, где указанные мутации выбраны из перечня, содержащего Л17D/В20D, Л17D/В20Е, Л17Е/В20D, Л17Е/В20Е, Л17D/Т119D, Л17D/В121Е, Л17Е/Т119D, Л17Е/В121Е, В20D/Т119D, В20D/В121Е, В20Е/Т119D и В20Е/В121Е.

В некоторых вариантах осуществления С и D содержат две мутации в SEQ ID NO: 1, где указанные мутации выбраны из перечня, содержащего Л17К/В20К, Л17К/В20R, Л17R/В20К, Л17R/В20R, Л17К/В121К, Л17К/В121R, Л17R/В121К, Л17R/В121R, В20К/В121К, В20К/В121R, В20R/В121К и В20R/В121R.

Настоящее изобретение также предусматривает варианты осуществления, где каждая из А, В, С и D в белковом комплексе на основе ТТР содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1 со следующими мутациями:

А и В содержат С10А/К15А/Л17D/В20D, а С и D содержат С10А/К15А/Л17К/В20К (или наоборот);
 А и В содержат С10А/К15А/Л17D/В20Е, а С и D содержат С10А/К15А/Л17К/В20R (или наоборот);
 А и В содержат С10А/К15А/Л17Е/В20D, а С и D содержат С10А/К15А/Л17R/В20К (или наоборот);
 А и В содержат С10А/К15А/Л17Е/В20Е, а С и D содержат С10А/К15А/Л17R/В20R (или наоборот);
 А и В содержат С10А/К15А/Л17D/Т119D, а С и D содержат С10А/К15А/Л17К/В121К (или наоборот);
 А и В содержат С10А/К15А/Л17D/В121Е, а С и D содержат С10А/К15А/Л17К/В121R (или наоборот);
 А и В содержат С10А/К15А/Л17Е/Т119D, а С и D содержат С10А/К15А/Л17R/В121К (или наоборот);
 А и В содержат С10А/К15А/Л17Е/В121Е, а С и D содержат С10А/К15А/Л17R/В121R (или наоборот);
 А и В содержат С10А/К15А/В20D/Т119D, а С и D содержат С10А/К15А/В20К/В121К (или наоборот);
 А и В содержат С10А/К15А/В20D/В121Е, а С и D содержат С10А/К15А/В20К/В121R (или наоборот);
 А и В содержат С10А/К15А/В20Е/Т119D, а С и D содержат С10А/К15А/В20R/В121К (или наоборот), или
 А и В содержат С10А/К15А/В20Е/В121Е, а С и D содержат С10А/К15А/В20R/В121R (или наоборот)

В некоторых вариантах осуществления белковый комплекс на основе ТТР присоединен к 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, или 8 биоактивным белкам, пептидам или малым молекулам. В некоторых вариантах осуществления белковый комплекс на основе ТТР присоединен к 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, или 8 антигенсвязывающим белкам или пептидам. В других вариантах осуществления белковый комплекс на основе ТТР присоединен к 1, 2, 3 или 4 антигенсвязывающим белкам или пептидам. Антигенсвязывающие белки или пептиды могут быть присоединены к белковому комплексу на основе ТТР по С-концу субъединицы ТТР или N-концу субъединицы ТТР. Кроме того, белковый комплекс на основе ТТР может быть непосредственно присоединен к 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, или 8 антигенсвязывающим белкам или пептидам или может быть присоединен к 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, или 8 антигенсвязывающим белкам или пептидам посредством линкера. В конкретных вариантах осуществления белковый комплекс на основе ТТР непосредственно присоединен к 1, 2, 3 или 4 антигенсвязывающим белкам или пептидам или присоединен к 1, 2, 3 или 4 антигенсвязывающим белкам или пептидам посредством линкера.

Линкер может представлять собой линкер на основе аминокислот, содержащий 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 или 60 аминокислот. В других ва-

риантах осуществления линкер представляет собой линкер на основе аминокислот, содержащий 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 аминокислот. В других вариантах осуществления линкер представляет собой линкер на основе аминокислот, содержащий 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот. В еще одних вариантах осуществления линкер представляет собой линкер на основе аминокислот, содержащий 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот. В конкретных вариантах осуществления линкер представляет собой G, GG, GGG, GGGG, GGGGG, GGGGGG, GGGGGGG, GGGGGGGG, GGGGGGGGG или GGGGGGGGGG. В других конкретных вариантах осуществления линкер выбран из перечня, содержащего: GG, GGGG, GGGSGG, GGGSGGGG и GGAGGGAGGG.

Другие подходящие линкеры включают линкер $G(G_xB_y)_rG_z$, где G представляет собой глицин; B представляет собой любую аминокислоту; x равняется 1-15; y равняется 1-5; z равняется 1-15, и r равняется 1-20. В другом варианте осуществления линкер представляет собой линкер $G(G_xB_y)_rG_z$, где B представляет собой Q, S, A, E, P, T, K, R, D или N; x равняется 4; y равняется 1; z равняется 4 и r равняется 1.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения белковый комплекс на основе TTR присоединен к двум антигенсвязывающим белкам, где каждый антигенсвязывающий белок связывает другой антиген. В других вариантах осуществления настоящего изобретения белковый комплекс на основе TTR присоединен к четырем антигенсвязывающим белкам, где антигенсвязывающие белки связываются по меньшей мере с двумя разными антигенами (например, один антигенсвязывающий белок связывается с первым антигеном, и три антигенсвязывающих белка связываются со вторым антигеном, или два антигенсвязывающих белка связываются с первым антигеном, и два антигенсвязывающих белка связываются со вторым антигеном).

Антигенсвязывающие белки могут представлять собой антитела. В других вариантах осуществления антигенсвязывающие белки представляют собой Fab или scFv. В конкретном варианте осуществления антигенсвязывающие белки представляют собой Fab. В других вариантах осуществления антигенсвязывающие белки представляют собой смесь антител и Fab.

Настоящее изобретение также предусматривает фармацевтические композиции, содержащие любой из белковых комплексов на основе TTR, обсуждаемых в данном документе.

Кроме того, настоящее изобретение предусматривает способы лечения рака с применением любого из белковых комплексов на основе TTR, обсуждаемых в данном документе. Белковые комплексы на основе TTR по настоящему изобретению можно использовать в лечении рака. Настоящее изобретение также предусматривает любой из белковых комплексов на основе TTR, обсуждаемых в данном документе, для применения в лечении рака.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусматривает одну или несколько выделенных нуклеиновых кислот, кодирующих любой из белковых комплексов на основе TTR, обсуждаемых в данном документе. Кроме того, настоящее изобретение предусматривает вектор(векторы) экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую любой из белковых комплексов на основе TTR, обсуждаемых в данном документе. Настоящее изобретение дополнительно предусматривает рекомбинантную клетку-хозяина, содержащую такую нуклеиновую(нуклеиновые) кислоту(кислоты) или вектор(векторы). В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку яичника китайского хомячка (CHO), клетку E5, клетку почки новорожденного хомячка (ВНК), клетку почки обезьяны (COS), клетку гепатоцеллюлярной карциномы человека или клетку эмбриональной почки человека 293 (НЕК 293).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения относится к способу получения белкового комплекса на основе TTR, описанного в данном документе, где способ включает: а) культивирование рекомбинантной клетки-хозяина и б) выделение белкового комплекса на основе TTR из культуры.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1: На фиг. 1 представлено схематическое изображение белкового комплекса на основе TTR (конструкции или слитые белки) по настоящему изобретению. На фиг. 1a изображены четыре субъединицы TTR, которые составляют комплексы на основе TTR по настоящему изобретению. На фиг. 1b представлен иллюстративный гетеродимерный слитый белок TTR-антитело, где С-конец обеих тяжелых цепей антитела связан с N-концом каждой субъединицы TTR. В данном примере два антитела связывают разные эпитопы на одном и том же или разных белках. На фиг. 1c представлен иллюстративный гетеротетрамерный слитый белок TTR-антитело/Fab. В данном примере антитело связывает первый эпитоп, а Fab связывают второй эпитоп на одном и том же или разных белках. На фиг. 1d представлен иллюстративный гетеротетрамерный слитый белок TTR-Fab, где С-конец каждого Fab связан с N-концом каждой субъединицы TTR. В данном примере два Fab связывают первый эпитоп, и два Fab связывают второй эпитоп на одном и том же или разных белках. На каждой из фиг. 1b-1d показан необязательный линкер между тяжелой цепью и TTR.

Фиг. 2: На фиг. 2a-e представлены иллюстративные гетеромерные белковые комплексы TTR-Ab, TTR-Fab и TTR-Ab/Fab. Любой антигенсвязывающий белок (например, Fab, антитело, scFv, scFab) или белки, такие как ферменты, можно использовать в белковых комплексах на основе TTR по настоящему изобретению. Знаки "+" и "-" на фиг. 2e обозначают пары заряженных аминокислот Fc, которые обеспе-

чивают последовательное присоединение одной субъединицы TTR на полное антитело. На фигурах 2а-е также приводится краткое описание каждого из белковых комплексов (например, [[Fab "A"] - [отрицательно заряженный TTR]]₂: [[положительно заряженный TTR] - [Fab "B"]]₂), где "A" относится к первой мишени, а "B" относится ко второй мишени. Знак "-" обозначает единственную точку присоединения между двумя фрагментами (например, [положительно заряженный TTR] и [Fab "B"]), в то время как "=" обозначает две точки присоединения между двумя фрагментами (например, [Ab 655-341] и [отрицательно заряженный TTR]). Примечательно, что сокращение не подразумевает ориентацию N→C или C→N, а скорее представляет собой сокращенное описание молекулы "слева направо". Также изображена вторая форма сокращения. Например, конструкция на фиг. 2а может быть отмечена как "4X-Fab-TTR", что указывает на то, что 4 Fab присоединены к комплексу на основе TTR. Сходным образом, конструкции на фиг. 2b и 2e можно обозначить как "2X-Ab-TTR" и "4X-Ab-TTR" соответственно.

Фиг. 3: На фиг. 3 изображена область контакта между мономерами TTR, которые образуют два набора димеров TTR (левая сторона), и область контакта между димерами TTR, которые образуют тетрамер TTR (правая сторона). Как видно, область контакта между мономерами TTR отличается от области контакта между димерами TTR.

Фиг. 4: На фиг. 4 изображены 18 вариантов TTR с заряженными аминокислотами (C10A/K15A/XX) TTR (SEQ ID NO: 1), которые были получены для оценки того, будут ли мутации с заменой заряженных аминокислот приводить к значительному отталкиванию в области контакта димер/димер TTR.

Фиг. 5: На фиг. 5 изображено, как различные области контакта димер/димер TTR (с мутациями) отвечали на присутствие SDS (хаотроп) с нагреванием и без него.

Фиг. 6: На фиг. 6 изображено влияние денатурирующих условий на варианты TTR. Отмечены варианты TTR с выходом независимо от того, присутствует ли TTR в виде тетрамера или димера (согласно анализу посредством SEC и SDS-PAGE), и температура плавления TTR.

Фиг. 7: На фиг. 7 изображена оценка образования гетеротетрамера TTR посредством как SEC (вверху), так и SDS-PAGE (внизу). Анализ посредством SEC (вверху) указывает на то, что многие из пар вариантов характеризовались склонностью к образованию гетеромультимеров, на что указывает ненулевое значение (% молекул со временем удерживания, соответствующим тетрамеру TTR). Кроме того, многие из гетеротетрамеров TTR были устойчивы к разрушению с помощью хаотропного SDS, как продемонстрировано с помощью результатов SDS-PAGE.

Фиг. 8: На фиг. 8 изображена дополнительная оценка пар положительно/отрицательно заряженных аминокислот посредством SDS-PAGE, которая демонстрировала высокую склонность к образованию стабильных тетрамеров TTR. Гетеротетрамеры TTR устойчивы к денатурации, индуцированной SDS, что является показателем высокой стабильности. Для каждой пары оценивали [1] отрицательно заряженный (т.е. основной) вариант; [2] положительно заряженный (т.е. кислый) вариант; [3] комбинацию отрицательно заряженных и положительно заряженных вариантов (которая должна образовывать тетрамер) и [4] комбинацию отрицательно заряженных и положительно заряженных вариантов, подверженных воздействию каспазы.

Фиг. 9: На фиг. 9 изображена оценка гетеротетрамеров TTR, содержащих пары L17R/T119D, L17K/T119D, L17K/V121E, V20R/V20D, V20R/V20E, V20K/V20D, V20K/V20E, V121R/L17D, V121R/L17E и V121K/L17D, при воздействии условий при pH 5,0 с определением того, способны ли они поддерживать свое тетрамерное состояние (посредством SEC) в условиях, сходных с теми, которые встречаются в фармацевтических составах.

Фиг. 10: На фиг. 10 изображена оценка значений температуры плавления гетеротетрамеров TTR. В каждом случае (мутантные варианты, указанные на фигуре) гетеротетрамер TTR был стабилен до по меньшей мере 92°C, что указывает на то, что гетеротетрамер является термостабильным.

Фиг. 11: На фиг. 11 изображено конструирование биспецифических гетеротетрамерных конструкций TTR-Ab. Показана иллюстративная биспецифическая гетеротетрамерная конструкция TTR-Ab, где каждая тяжелая цепь Ab 655-341 (штриховка линиями) присоединена к N-концу отрицательно заряженных мономеров TTR (совместно образуя отрицательно заряженный димер TTR), и каждая тяжелая цепь Ab DNP-3B1 (сплошная штриховка) присоединена к N-концу положительно заряженных мономеров TTR (совместно образуя положительно заряженный димер TTR). Четыре отрицательно заряженных варианта TTR сливали с Ab 655-341, а четыре положительно заряженных варианта TTR сливали с Ab DNP-3B1. Все продукты слияния Ab-TTR получали без линкера между Ab и мономером TTR.

Фиг. 12: На фиг. 12 изображено, что гетеротетрамерные конструкции TTR-Ab не продуцируются эффективно, если части тетрамера [Ab 655-341]=[отрицательно заряженный TTR]₂ и [положительно заряженный TTR]₂=[Ab DNP-3B1] экспрессируются в отдельных клетках млекопитающих (клетки 293-6E НЕК).

Фиг. 13: На фиг. 13 изображено конструирование биспецифических гетеродимерных конструкций TTR-Ab для оценки влияния добавления линкера между тяжелой цепью Ab и мономером TTR на экспрессию двух частей тетрамера в двух разных клетках млекопитающих.

Фиг. 14: На фиг. 14 изображены результаты (упорядоченные в зависимости от линкера) экспрессии двух частей гетеродимера TTR-Ab в двух разных клетках млекопитающих биспецифических гетеротет-

рамерных конструкций TTR-Ab с линкерами между тяжелой цепью Ab и мономером TTR.

Фиг. 15: На фиг. 15 изображены дополнительные результаты (упорядоченные в зависимости от линкера) экспрессии двух частей гетеродимера TTR-Ab в двух разных клетках млекопитающих биспецифических гетеротетрамерных конструкций TTR-Ab с линкерами между тяжелой цепью Ab и мономером TTR.

Фиг. 16: На фиг. 16 представлены усредненные результаты с фиг. 14 и 15.

Фиг. 17: На фиг. 17 изображено конструирование биспецифических гетеротетрамерных конструкций TTR-Fab для оценки продуктов слияния TTR-Fab в линии клеток млекопитающих (K1 CHO).

Фиг. 18: На фиг. 18 изображены результаты оценки биспецифических гетеротетрамерных конструкций TTR-Fab с фиг. 17.

Фиг. 19: На фиг. 19 изображено удерживание (SEC) гетеромультимерной молекулы 15524 ([Fab 655-341] - [GG] - [TTR(C10A/K15A/L17D)] и [TTR(C10A/K15A/V121R)] - [GG] - [Fab DNP-3B1]) по сравнению с гомомультимерными продуктами слияния Ab- и Fab-TTR, а также с неслитыми Ab (каждое в качестве стандартов).

Фиг. 20: На фиг. 20 представлено подтверждение молекулярной массы элюируемых разновидностей (с фиг. 19) посредством MS, сопряженной с SEC, в соответствии с ожидаемой для молекулы 15524 (в виде гетеромультимера).

Фиг. 21: На фиг. 21 изображено конструирование Ab-содержащих продуктов слияния TTR с определением того, приведет ли совместная экспрессия Ab-содержащих продуктов слияния TTR к образованию необходимого гетеротетрамера TTR [Ab 655-341]=[LX] - [отрицательно заряженный TTR]₂: [[положительно заряженный TTR] - [LX]]₂=[Ab DNP-3B1].

Фиг. 22: На фиг. 22 изображено, что значительное количество необходимого гетеротетрамера TTR было образовано для многих комбинаций с фиг. 21.

Фиг. 23: На фиг. 23 изображено удерживание (SEC) гетеромультимерной молекулы 15539 ([Ab 655-341]=[GGAGGGAGGG] - [TTR(C10A/K15A/L17D)]₂: [[TTR(C10A/K15A/V121K)] - [GGAGGGAGGG]]₂=[Ab DNP-3B1]) по сравнению с гомомультимерными продуктами слияния Ab- и Fab-TTR, а также неслитыми Ab (каждое в качестве стандартов).

Фиг. 24: На фиг. 24 представлено подтверждение молекулярной массы элюируемых разновидностей (с фиг. 23) посредством MS, сопряженной с SEC, в соответствии с ожидаемой для молекулы 15539 (в виде гетеромультимера).

Фиг. 25: На фиг. 25 представлены усредненные результаты с фиг. 22.

Фиг. 26: На фиг. 26 представлена оценка того, может ли совместная экспрессия отрицательно заряженных и положительно заряженных вариантов TTR (4 каждой мутации), слитых с Ab и Fab, в одной и той же линии клеток приводить к продуцированию конструкций Ab-Fab-TTR (т.е. конструкций [Ab "A"]=[отрицательно заряженный TTR]₂: [[положительно заряженный TTR]=[Fab "B"]]₂).

Фиг. 27: На фиг. 27 изображены результаты экспрессии, очистки и анализа конструкций Ab-Fab-TTR с фиг. 26.

Фиг. 28: На фиг. 28 изображено удерживание (посредством SEC) гетеромультимерной молекулы 15545 ([Ab 655-341]=[GGGG] - [TTR(C10A/K15A/V20D)]₂: [[TTR(C10A/K15A/V20R)] - [GG] - [DNP-3B1-Fab]]₂) по сравнению с гомомультимерными продуктами слияния Ab- и Fab-TTR, а также неслитыми Ab (каждое в качестве стандартов).

Фиг. 29: На фиг. 29 представлено подтверждение молекулярной массы элюируемых разновидностей (с фиг. 28) посредством MS, сопряженной с SEC, в соответствии с ожидаемой для молекулы 15545 (в виде гетеромультимера).

Фиг. 30: На фиг. 30 представлены усредненные результаты с фиг. 27.

Фиг. 31: На фиг. 31 изображены варианты TTR с двумя заряженными аминокислотами (C10A/K15A/XX/YY) TTR (SEQ ID NO: 1), которые получали для оценки того, могут ли мутации с заменой двух заряженных аминокислот способствовать повышению селективности гетеромультимеров по сравнению с гомомультимерами.

Фиг. 32: На фиг. 32 представлены выход при экспрессии, выход при очистке и определенные посредством SEC свойства отдельно экспрессируемых мутантных вариантов с одной и двумя областями контакта.

Фиг. 33: На фиг. 33 изображен SEC-профиль иллюстративных мутантных вариантов с одной и двумя областями контакта.

Фиг. 34: На фиг. 34 изображены варианты TTR с двумя заряженными аминокислотами (C10A/K15A/XX/YY) TTR (SEQ ID NO: 1), которые получали для оценки того, могут ли мутации с заменой двух заряженных аминокислот способствовать повышению селективности гетеромультимеров по сравнению с гомомультимерами.

Фиг. 35: На фиг. 35 представлены определенные посредством SEC свойства при смешивании после очистки мутантных вариантов с одной и двумя областями контакта, отсортированных по мутации с заменой отрицательно заряженной аминокислоты.

Фиг. 36: На фиг. 36 представлены определенные посредством SEC свойства при отдельном смешивании

вании после очистки мутантных вариантов с одной и двумя областями контакта, отсортированных по мутации с заменой положительно заряженной аминокислоты.

Фиг. 37: На фиг. 37 изображены SEC-профили иллюстративных мутантных вариантов с одной и двумя областями контакта по отдельности и при смешивания после очистки.

Фиг. 38: На фиг. 38 представлены выход при очистке и SEC-профили мутантных вариантов с одной и двумя областями контакта, полученных при совместном культивировании линий клеток.

Фиг. 39: На фиг. 39 изображено продолжение данных, представленных на фиг. 38.

Фиг. 40: На фиг. 40 изображен SEC-профиль иллюстративных молекул, продуцируемых посредством совместного культивирования мутантов с двумя областями контакта.

Подробное описание изобретения

Применяемые в данном документе заголовки разделов служат только для организационных целей и не должны истолковываться как ограничивающие описываемый объект изобретения.

Если в данном документе не определено иное, научные и технические термины, используемые в рамках настоящей заявки, имеют значения, которые общеизвестны рядовым специалистам в данной области техники. Кроме того, если контекст не предусматривает иное, термины в единственном числе будут включать их формы во множественном числе, а термины во множественном числе будут включать их формы в единственном числе.

В целом, номенклатура, применяемая в рамках культивирования клеток и тканей, молекулярной биологии, иммунологии, микробиологии, генетики и химии белков и нуклеиновых кислот и гибридизации и связанные с ними методики, описанные в данном документе, являются общеизвестными и общепринятыми в данной области техники. Способы и методики из настоящей заявки, в целом, осуществляются в соответствии с традиционными способами, общеизвестными в данной области техники и описанными в различных общих и более конкретных источниках, которые приводятся и обсуждаются на протяжении всей настоящей заявки, если не указано иное. См., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001), Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992) и Harlow and Lane *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990), которые включены в данный документ посредством ссылки. Ферментативные реакции и методики очистки осуществляются в соответствии с инструкциями производителя, как обычно выполняется в данной области техники или как описано в данном документе. Терминология, применяемая в рамках аналитической химии, химии органического синтеза и медицинской и фармацевтической химии и связанные с ними лабораторные процедуры и методики, описанные в данном документе, являются общеизвестными и общепринятыми в данной области техники. Стандартные методики можно применять для химических синтезов, химических анализов, получения, составления и доставки фармацевтических средств, а также лечения пациентов.

Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретной методологией, протоколами и реагентами и т.д., описанными в данном документе, и, ввиду этого, может изменяться. Используемая в данном документе терминология служит только для целей описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения, который определяется исключительно формулой изобретения.

Кроме случая рабочих примеров или случаев, где указано иное, все числа, выражающие количества ингредиентов или условия реакций, применяемые в данном документе, следует понимать как модифицированные во всех случаях с помощью термина "приблизительно." Термин "приблизительно" при использовании в сочетании с процентами может означать $\pm 1\%$.

Все варианты осуществления, более узкие по объему, чем вариации, определенные конкретными абзацами в данном документе, должны рассматриваться как включенные в настоящее изобретение. Например, некоторые аспекты описываются как род, и следует понимать, что каждый член рода может быть отдельно вариантом осуществления. Также следует понимать, что аспекты, описываемые как род, или выбирающие член рода, включают в себя комбинации двух или более членов рода. Следует также понимать, что хотя различные варианты осуществления в настоящем описании представлены с использованием формулировки "содержащие", при различных обстоятельствах связанный вариант осуществления также может быть описан с использованием формулировок "состоящий из" или "состоящий, по существу, из".

В настоящей заявке использование "или" означает "и/или", если не указано иное. Кроме того, использование термина "включая", а также других форм, таких как "включает" и "включенный", не ограничено. Кроме того, такие термины как "элемент" или "компонент" охватывают как элементы, так и компоненты, содержащие одну единицу, так и элементы и компоненты, которые содержат более одной субъединицы, если конкретно не указано иное.

Определения

Термин "аминокислота" включает его стандартное значение в данной области техники. Двадцать встречающихся в природе аминокислот и их аббревиатуры соответствуют общепринятой практике. См., *Immunology-A Synthesis*, 2nd Edition, (E. S. Golub and D. R. Green, eds.), Sinauer Associates: Sunderland,

Mass. (1991), включенный в данный документ посредством ссылки для любых целей. Стереизомеры (например, D-аминокислоты) двадцати стандартных аминокислот, неприродные аминокислоты, такие как [альфа]-, [альфа]-дизамещенные аминокислоты, N-алкиламинокислоты и другие нестандартные аминокислоты также могут представлять собой подходящие компоненты для полипептидов и включены в термин "аминокислота". Примеры нестандартных аминокислот включают 4-гидроксипролин, [гамма]-карбоксиглутамат, [эпсилон]-N,N,N-триметиллизин, [эпсилон]-N-ацетиллизин, O-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формилметионин, 3-метилгистидин, 5-гидроксилизин, [сигма]-N-метиларгинин и другие аналогичные аминокислоты и иминокислоты (например, 4-гидроксипролин). В системе обозначений полипептидов, используемой в данном документе, левое направление представляет собой направление в сторону аминоконца, а правое направление представляет собой направление в сторону карбоксильного конца в соответствии со стандартной практикой и правилами.

Термин "антагонист", используемый в данном документе, как правило, относится к молекуле, например антигенсвязывающему белку, такому как белок, представленный в данном документе, который может связывать антиген и ингибировать, уменьшать или устранять биологическую передачу сигналов, связанную с антигеном.

Используемый в данном документе термин "антитело" относится к белку в общепринятом формате иммуноглобулина, содержащему тяжелые и легкие цепи и содержащему переменные и константные области. Например, антитело может представлять собой IgG, который характеризуется "Y-образной" структурой из двух идентичных пар полипептидных цепей, при этом каждая пара содержит одну "легкую" (как правило, имеющую молекулярную массу, составляющую приблизительно 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (как правило, имеющую молекулярную массу, составляющую приблизительно 50-70 кДа). Антитело содержит переменную область и константную область. В форматах IgG переменная область обычно содержит приблизительно 100-110 или больше аминокислот, содержит три области, определяющие комплементарность (CDR), в первую очередь отвечает за распознавание антигена и существенно отличается среди других антител, которые связываются с различными антигенами. Константная область позволяет антителу рекрутировать клетки и молекулы иммунной системы. Переменная область состоит из N-концевых областей каждой легкой цепи и тяжелой цепи, тогда как константная область состоит из C-концевых частей каждой из тяжелых и легких цепей. (Janeway et al., "Structure of the Antibody Molecule and the Immunoglobulin Genes", Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 4th ed. Elsevier Science Ltd./Garland Publishing, (1999)).

Антитела могут содержать любую константную область, известную из уровня техники. Человеческие легкие цепи классифицируются как легкие каппа- и лямбда-цепи. Тяжелые цепи классифицируются как мю-, дельта-, гамма-, альфа- или эпсилон-цепи, и они определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE соответственно. IgG имеет несколько подклассов, включая без ограничения IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. IgM имеет подклассы, включая без ограничения IgM1 и IgM2. Варианты осуществления настоящего изобретения включают все такие классы или изотипы антител. Константная область легкой цепи может представлять собой, например, константную область легкой цепи каппа- или лямбда-типа, например, человеческую константную область легкой цепи каппа- или лямбда-типа. Константная область тяжелой цепи может представлять собой, например, константные области тяжелой цепи альфа-, дельта-, эпсилон-, гамма- или мю-типа, например, человеческую константную область тяжелой цепи альфа-, дельта-, эпсилон-, гамма- или мю-типа. Соответственно, в иллюстративных вариантах осуществления антитело представляет собой антитело изотипа IgA, IgD, IgE, IgG или IgM, включая любое из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

Термин "антиген" относится к молекуле или части молекулы, которые может связывать связывающее средство, такое как антигенсвязывающий белок (включая, например, антитело), и которые дополнительно можно применять для выработки в организме животного антител, способных связываться с данным антигеном. Антиген может содержать один или несколько эпитопов, которые способны взаимодействовать с различными антигенсвязывающими белками, например, антителами.

Термин "антигенсвязывающий белок", используемый в данном документе, означает любой белок, который специфически связывает определенный целевой антиген. Термин включает полипептиды, которые включают по меньшей мере одну антигенсвязывающую область. Термин также охватывает антитела, которые содержат по меньшей мере две полноразмерные тяжелые цепи и две полноразмерные легкие цепи, а также их производные, варианты, фрагменты и мутации. Антигенсвязывающий белок также включает фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, доменные антитела, такие как Nanobodies®, и scFv, как более подробно описано ниже.

"Антигенсвязывающая область" или "антигенсвязывающий домен" означает часть белка, такого как антитело или его фрагмент, производное или вариант, которая специфически связывается, взаимодействует или распознает данный эпитоп или сайт на молекуле (например, антиген). Например, часть антигенсвязывающего белка, которая содержит аминокислотные остатки, которые взаимодействуют с антигеном и придают антигенсвязывающему белку его специфичность и аффинность в отношении антигена, называется "антигенсвязывающей областью". Антигенсвязывающая область может включать одну или несколько "областей, определяющих комплементарность" ("CDR"). Определенные антигенсвязывающие

области также включают одну или несколько "каркасных" областей. "Каркасные" области могут вносить непосредственный вклад в специфическое связывание антигенсвязывающего белка, но обычно содействуют в поддержании правильной конформации CDR для стимуляции связывания между антигенсвязывающей областью и антигеном.

Термины "рак", "опухоль", "раковый" и "злокачественный" относятся к физиологическому состоянию млекопитающих, которое, как правило, характеризуется неконтролируемым клеточным ростом, или описывают его. Примеры рака включают без ограничения карциному, в том числе аденокарциному, лимфому, бластому, меланому, саркому и лейкоз. Более конкретные примеры таких видов рака включают меланому, рак легкого, рак головы и шеи, почечно-клеточный рак, рак толстой кишки, колоректальный рак, плоскоклеточный рак, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, желудочно-кишечный рак, ходжкинские и неходжкинские лимфомы, рак поджелудочной железы, глиобластому, глиому, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, такой как печеночная карцинома и гепатома, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак эндометрия, миелому (такую как множественная миелома), рак слюнной железы, рак почки, такой как почечно-клеточный рак и опухоли Вильмса, базальноклеточную карциному, рак предстательной железы, рак вувльвы, рак щитовидной железы, рак яичка и рак пищевода.

Термин "CDR" и его множественное число (также называемый "гипервариабельными областями") относится к определяющей комплементарности области белка, такого как антитело или его фрагмент, производное или вариант. Вариабельная область легкой цепи и вариабельная область тяжелой цепи содержат по три CDR. Например, вариабельная область легкой цепи содержит следующие CDR: CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3; а вариабельная область тяжелой цепи содержит следующие CDR: CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3. CDR содержат большую часть остатков, ответственных за специфические взаимодействия антитела с антигеном, и, следовательно, вносят вклад в функциональную активность молекулы антитела. CDR являются основными детерминантами антигенной специфичности.

Точные границы и длины определения CDR зависят от различных систем классификации и нумерации. Следовательно, CDR могут упоминаться по Kabat, Chothia, месту контакта или любым другим определениям границ, включая систему нумерации, описанную в данном документе. Схема (система) нумерации согласно Kabat является широко распространенным стандартом для последовательной нумерации аминокислотных остатков вариабельного домена антитела и является предпочтительной схемой, применяемой в настоящем изобретении, как также упоминалось в другом месте данного документа. Дополнительные структурные соображения также могут быть использованы для определения канонической структуры антитела. Например, те различия, которые не полностью отражены в нумерации согласно Kabat, могут быть описаны системой нумерации согласно Chothia et al. и/или выявлены другими методиками, например, кристаллографией и двумерным или трехмерным компьютерным моделированием. Несмотря на различные границы, каждая из этих систем имеет некоторую степень совпадения в том, что составляет CDR в вариабельных последовательностях. Поэтому определения CDR в соответствии с этими системами могут отличаться по длине и граничным областям относительно прилегающей каркасной области. См., например, Kabat (подход, основанный на межвидовой вариабельности последовательности), Chothia (подход, основанный на кристаллографических исследованиях комплексов антиген-антитело) и/или MacCallum (Kabat et al., loc. cit.; Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 1987, 196: 901-917 и MacCallum et al., *J. Mol. Biol.*, 1996, 262: 732). Еще одним стандартом для характеристики антигенсвязывающего сайта является определение AbM, используемое в программном обеспечении для моделирования антител Oxford Molecular's AbM. См., например, Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. В *Antibody Engineering Lab Manual* (Ed.: Duebel, S. and Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg). Для обзора структуры антител см. *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, eds. Harlow et al., 1988.

Как правило, CDR образуют структуру петли, которая может быть классифицирована как каноническая структура. Термин "каноническая структура" относится к конформации основной цепи, которая принимается антигенсвязывающими (CDR) петлями. Из сравнительных структурных исследований было обнаружено, что пять из шести антигенсвязывающих петель имеют только ограниченный набор доступных конформаций. Каждая каноническая структура может характеризоваться торсионными углами полипептидного остова. Следовательно, соответствующие петли между антителами могут иметь очень похожие трехмерные структуры, несмотря на высокую вариабельность аминокислотной последовательности в большинстве частей петель (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, 1987, 196: 901; Chothia et al., *Nature*, 1989, 342: 877; Martin and Thornton, *J. Mol. Biol.*, 1996, 263: 800). Кроме того, существует связь между принятой структурой петли и аминокислотными последовательностями, окружающими ее. Конформация определенного канонического класса определяется длиной петли и аминокислотными остатками, находящимися в ключевых положениях внутри петли, а также в консервативном каркасе (т.е. вне петли). Следовательно, присвоение определенному каноническому классу может быть осуществлено на основании присутствия этих ключевых аминокислотных остатков.

Термин "конкурировать", когда он применяется в контексте антигенсвязывающих белков (например, антител или их фрагментов), которые конкурируют за один и тот же эпитоп, означает конкуренцию

между антигенсвязывающими белками и определяется с помощью анализа, в котором подвергаемый тестированию антигенсвязывающий белок (например, антитело или его фрагмент) предотвращает или ингибирует специфическое связывание эталонного антигенсвязывающего белка с общим антигеном. Можно использовать множество типов анализов конкурентного связывания, например, твердофазный прямой или непрямой радиоиммуноанализ (RIA), твердофазный прямой или непрямой иммуноферментный анализ (EIA), конкурентный сэндвич-анализ (см., например, Stahli et al., 1983, *Methods in Enzymology* 9:242-253); твердофазный прямой EIA с биотином и авидином (см., например, Kirkland et al., 1986, *J. Immunol.* 137:3614-3619), твердофазный прямой анализ с мечением, твердофазный прямой сэндвич-анализ с мечением (см., например, Harlow and Lane, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); твердофазный прямой RIA с мечением с применением метки I-125 (см., например, Morel et al., 1988, *Molec. Immunol.* 25:7-15); твердофазный прямой EIA с биотином и авидином (см., например, Cheung, et al., 1990, *Virology* 176:546-552) и прямой RIA с мечением (Moldenhauer et al., 1990, *Scand. J. Immunol.* 32:77-82). Как правило, такой анализ включает применение очищенного антигена, связанного с твердой поверхностью, или клеток, экспрессирующих антиген, немеченого исследуемого антигенсвязывающего белка и меченого эталонного антигенсвязывающего белка. Конкурентное ингибирование измеряют путем определения количества метки, связывающейся с твердой поверхностью или клетками в присутствии тестируемого антигенсвязывающего белка. Обычно тестируемый антигенсвязывающий белок присутствует в избытке. Антигенсвязывающие белки, идентифицированные с помощью конкурентного анализа, включают антигенсвязывающие белки, связывающиеся с тем же эпитопом, что и эталонные антигенсвязывающие белки, и антигенсвязывающие белки, связывающиеся с прилегающим эпитопом, расположенным достаточно близко к эпитопу, связываемому эталонным антигенсвязывающим белком, чтобы возникло стерическое несоответствие. Дополнительные подробности, касающиеся способов определения конкурентного связывания, предусмотрены в данном документе. Например, в одном варианте осуществления конкуренция определяется в соответствии с анализом ViaCore. Обычно, когда конкурирующий антигенсвязывающий белок присутствует в избытке, он будет ингибировать специфичное связывание эталонного антигенсвязывающего белка с общим антигеном на по меньшей мере 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% или 75%. В некоторых случаях связывание ингибируется по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, или 97% или больше.

Термин "регуляторная последовательность" относится к полинуклеотидной последовательности, которая может воздействовать на экспрессию и процессинг кодирующих последовательностей, с которыми она лигирована. Природа таких регуляторных последовательностей может зависеть от организма-хозяина. В конкретных вариантах осуществления регуляторные последовательности для прокариот могут включать промотор, сайт связывания рибосомы и последовательность терминации транскрипции. Например, регуляторные последовательности для эукариот могут включать промоторы, содержащие один или множество сайтов распознавания транскрипционных факторов, последовательности транскрипционных энхансеров и последовательности терминации транскрипции. "Регуляторные последовательности" могут включать лидерные последовательности и/или последовательности партнеров по слиянию.

"Производное" полипептида представляет собой полипептид, который был модифицирован (например химически) посредством некоторого способа, отличного от получения вариантов со вставками, делециями или заменами, например посредством конъюгации с другим химическим фрагментом.

"Доменное антитело" представляют собой иммунологически функциональный фрагмент иммуноглобулина, содержащий только переменную область тяжелой цепи или переменную область легкой цепи. Примеры доменных антител включают Nanobodies®. В некоторых случаях две или более областей V_H соединены ковалентной связью с помощью пептидного линкера для создания бивалентного доменного антитела. Данные две области V_H бивалентного доменного антитела могут нацеливаться на одинаковые или различные антигены.

Как правило, "эффективное количество" представляет собой количество, достаточное для уменьшения выраженности и/или частоты возникновения симптомов, устранения симптомов и/или основной причины, предупреждения возникновения симптомов и/или их основной причины и/или улучшения или устранения повреждения, которое является результатом или связано с раком. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество представляет собой терапевтически эффективное количество или профилактически эффективное количество. "Терапевтически эффективное количество" представляет собой количество, достаточное для излечения болезненного состояния (например, рака) или симптомов, в частности, состояния или симптомов, ассоциированных с болезненным состоянием, или иного предупреждения, препятствования, замедления или обращения прогрессирования болезненного состояния или любого другого нежелательного симптома, ассоциированного с заболеванием в какой бы то ни было форме. "Профилактически эффективное количество" представляет собой количество фармацевтической композиции, которое при введении субъекту будет оказывать желаемый профилактический эффект, например, предупреждать или задерживать возникновение (или повторное появление) рака, или снижать вероятность возникновения (или повторного появления) рака или симптомов рака. Полный терапевтический или профилактический эффект не обязательно возникает при введении одной дозы, и они могут возникать только после введения серии доз. Таким образом, терапевтически или профилактически эф-

фективное количество может быть введено за одно или несколько введений.

Термин "эпитоп" относится к части антигена, способной распознаваться и специфически связываться с антигенсвязывающим белком (например антителом). В контексте полипептидов эпитопы могут быть образованы смежными аминокислотами или несмежными аминокислотами, сближенными за счет укладки белка в третичную структуру. Эпитопы, образованные смежными аминокислотами, как правило, сохраняются при денатурации белка, в то время как эпитопы, образованные посредством укладки в третичную структуру, как правило, утрачиваются при денатурации белка. Как правило, эпитоп включает по меньшей мере 3, а чаще всего по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации. "Линейный эпитоп" или "непрерывный эпитоп" представляет собой эпитоп, который распознается антигенсвязывающим белком (например, антителом) по его линейной последовательности аминокислот или первичной структуре. "Конформационный эпитоп" или "непоследовательный эпитоп" представляет собой эпитоп, который распознается антигенсвязывающим белком (например, антителом) по его третичной структуре. Остатки, которые составляют эти эпитопы, могут быть несмежными в первичной аминокислотной последовательности, но сближены в третичной структуре молекулы. Линейные и конформационные эпитопы обычно ведут себя по-разному, когда белок денатурируется, фрагментируется или восстанавливается.

Термин "вектор экспрессии" или "конструкция экспрессии" относится к вектору, который подходит для трансформации клетки-хозяина и содержит последовательности нуклеиновой кислоты, которые управляют (вместе с клеткой-хозяином) экспрессией одной или нескольких гетерологичных кодирующих областей, функционально связанных с ними, и/или контролируют ее. Конструкция экспрессии может включать без ограничения последовательности, которые воздействуют на транскрипцию, трансляцию или контролируют их, и, в случае наличия интронов, воздействуют на сплайсинг РНК кодирующей области, функционально связанной с ними.

"Fab-фрагмент" или "Fab" состоит из одной легкой цепи, а также C_{H1} и вариабельной областей одной тяжелой цепи. Тяжелая цепь молекулы Fab не может образовывать дисульфидную связь с другой молекулой тяжелой цепи.

"Фрагмент Fab'" или "Fab'" содержит одну легкую цепь и часть одной тяжелой цепи, которая содержит домен V_H и домен C_{H1} , а также область между доменами C_{H1} и C_{H2} , так что между двумя тяжелыми цепями двух фрагментов Fab' может образовываться межцепочечная дисульфидная связь с образованием молекулы $F(ab')_2$.

"Фрагмент $F(ab')_2$ " или " $F(ab')_2$ " содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи, содержащие часть константной области между доменами C_{H1} и C_{H2} , так что между двумя тяжелыми цепями образуется межцепочечная дисульфидная связь. Таким образом фрагмент $F(ab')_2$ состоит из двух фрагментов Fab', которые удерживаются вместе посредством дисульфидной связи между двумя тяжелыми цепями.

"Область F_c " содержит два фрагмента тяжелой цепи, содержащие домены C_{H2} и C_{H3} антитела. Два фрагмента тяжелой цепи удерживаются вместе двумя или более дисульфидными связями и посредством гидрофобных взаимодействий доменов C_{H3} .

"Область F_v " содержит вариабельные области как из тяжелой, так и из легкой цепей, но не содержит константных областей.

Термин "тяжелая цепь", используемый в отношении антигенсвязывающего белка, антитела или их фрагмента, включает полноразмерную тяжелую цепь. Полноразмерная тяжелая цепь включает домен вариабельной области (V_H) и три домена константной области (C_{H1} , C_{H2} и C_{H3}). Домен V_H находится на аминоконце полипептида, а домены C_H находятся на карбоксильном конце, причем C_{H3} находится ближе всего к карбоксиконцу полипептида. Тяжелые цепи могут относиться к любому изотипу, такому как IgG (включая подтипы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), IgA (включая подтипы IgA1 и IgA2), IgM и IgE. Фрагменты тяжелых цепей имеют достаточную последовательность вариабельной области для придания специфичности связывания.

"Гемобластозы" представляют собой рак, который происходит из кроветворной ткани, такой как костный мозг, или из клеток иммунной системы. Примерами гемобластозов являются лейкоз, лимфома и множественная миелома.

Термин "гетеродимерный слитый белок" или "гетеродимерный белковый комплекс" относится к слитому белку, содержащему два разных белка (например, антигенсвязывающие белки; пептиды, такие как пептиды-агонисты, и домены белков-агонистов). В конкретном примере гетеродимер может представлять собой гетеродимерный слитый белок на основе TTR, который содержит два разных антигенсвязывающих белка (например два разных антитела), связанных с посредством белка TTR, как описано в данном документе. В другом примере гетеродимер может представлять собой гетеродимерный слитый белок на основе TTR, который содержит одно антитело и один Fab, связанные посредством белка TTR, как описано в данном документе. Иллюстративные гетеродимерные слитые белки изображены на фиг. 1b и 2b.

Термин "гетеротримерный слитый белок" или "гетеротримерный белковый комплекс" относится к слитому белку, содержащему три разных белка (например, антигенсвязывающие белки; пептиды, такие как пептиды-агонисты, и домены белков-агонистов). В конкретном примере гетеротример может пред-

ставлять собой гетеротримерный слитый белок на основе TTR, который содержит антитело и два Fab, связанные посредством белка TTR, как описано в данном документе (см., например, фиг. 2с).

Термин "гетеротетрамерный слитый белок" или "гетеротетрамерный белковый комплекс" относится к слитому белку, содержащему четыре разных белка (например, антигенсвязывающие белки; пептиды, такие как пептиды-агонисты, и домены белков-агонистов). В конкретном примере гетеротетрамерный слитый белок представляет собой гетеротетрамерный слитый белок на основе TTR, где, например, антитела, Fab или их смеси связаны посредством белка TTR, как описано в данном документе. Примеры включают случаи, когда антигенсвязывающий белок представляет собой антитело (см., например, фиг. 2е) или Fab (см., например, фиг. 1d и 2а). В конкретном примере гетеротетрамерный слитый белок представляет собой гетеротетрамерный слитый белок на основе TTR, где, например, антитела, Fab или их смеси связаны посредством белка TTR, как описано в данном документе.

Термин "клетка-хозяин" означает клетку, которая была трансформирована с помощью последовательности нуклеиновой кислоты и, таким образом, этого экспрессирует ген, представляющий интерес. Данный термин охватывает потомство родительской клетки вне зависимости от того, идентично ли данное потомство по морфологии или по генетической структуре исходной родительской клетке или нет, при условии, что присутствует ген, представляющий интерес.

Термин "идентичность" относится к сходству между последовательностями двух или более полипептидных молекул или двух или больше молекул нуклеиновых кислот, как определено при выравнивании и сравнении последовательностей. "Процент идентичности" означает процент идентичных остатков аминокислот или нуклеотидов у сравниваемых молекул, и его рассчитывают на основании размера наименьшей из сравниваемых молекул. Для этих расчетов гэпы в выравниваниях (если таковые имеются) должны быть учтены с помощью определенной математической модели или компьютерной программы (т.е. "алгоритма"). Способы, которые могут применяться для расчета идентичности выравниваемых нуклеиновых кислот или полипептидов, включают описанные в Computational Molecular Biology, (Lesk, A. M., ed.), 1988, New York: Oxford University Press; Biocomputing Informatics and Genome Projects (Smith, D. W., ed.), 1993, New York: Academic Press; Computer Analysis of Sequence Data, Part I (Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds.), 1994, New Jersey: Humana Press; von Heinje, G., 1987, Sequence Analysis in Molecular Biology, New York: Academic Press; Sequence Analysis Primer (Gribskov, M. and Devereux, J., eds.), 1991, New York: M. Stockton Press и Carillo et al., 1988, SIAM J. Applied Math. 48:1073.

При расчете процента идентичности сравниваемые последовательности выравнивают способом, который дает наибольшее совпадение между последовательностями. Компьютерная программа, применяемая для определения процента идентичности, представляет собой пакет программ GCG, который включает GAP (Devereux et al., 1984, Nucl. Acid Res. 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI). Компьютерный алгоритм GAP применяют для выравнивания двух полипептидов или полинуклеотидов, для которых должен быть определен процент идентичности последовательностей. Последовательности выравнивают для получения оптимального совпадения их соответствующих аминокислот или нуклеотидов ("охват совпадения", определяемый алгоритмом). Штраф за открытие гэпа (который рассчитывается как 3х средняя диагональ, где "средняя диагональ" представляет собой среднее значение диагонали применяемой матрицы сравнения; "диагональ" представляет собой балл или число, присваиваемое каждому идеальному совпадению аминокислоты в соответствии с конкретной матрицей сравнения) и штраф за продление гэпа (который обычно составляет 1/10 часть от штрафа за открытие гэпа), а также матрицу сравнения, такую как PAM 250 или BLOSUM 62, применяют вместе с данным алгоритмом. В определенных вариантах осуществления в этом алгоритме также применяется стандартная матрица сравнения (см. Dayhoff et al., (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure 5:345-352 для матрицы сравнения PAM 250; Henikoff et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:10915-10919 касательно матрицы сравнения BLOSUM 62).

Рекомендуемые параметры для определения процента идентичности полипептидов или нуклеотидных последовательностей с применением программы GAP являются следующими:

Алгоритм: Needleman et al., 1970, J. Mol. Biol. 48:443-453;

Матрица сравнения: BLOSUM 62 из Henikoff et al., 1992, выше;

Штраф за открытие гэпа: 12 (но без штрафа за концевые гэпы);

Штраф за продление гэпа: 4

пороговое значение степени сходства: 0

Использование определенных схем выравнивания для выравнивания двух аминокислотных последовательностей может приводить к совпадению только короткой области в этих двух последовательностях, и эта небольшая выровненная область может характеризоваться очень высокой идентичностью последовательности, даже если отсутствует значительное сходство между двумя полноразмерными последовательностями. Соответственно, выбранный способ выравнивания (программа GAP) может быть, если требуется, адаптирован для обеспечения выравнивания, которое охватывает по меньшей мере 50 смежных аминокислот целевого полипептида.

Фраза "иммуномодулятор" относится к молекуле, которая индуцирует, усиливает или подавляет иммунный ответ. Иммунный активатор представляет собой молекулу, которая индуцирует или усиливает

иммунный ответ. Иммуносупрессор представляет собой молекулу, которая уменьшает или подавляет иммунный ответ. Таким образом, активационная иммунотерапия представляет собой терапию, которая включает введение молекулы (молекул) для индукции или усиления иммунной системы субъекта. Иммуносупрессивная терапия представляет собой терапию, при которой субъекта лечат с помощью молекулы(молекул) для снижения или подавления иммунной системы субъекта.

Используемый в данном документе термин "фрагмент" цепи антитела или иммуноглобулина (тяжелой или легкой цепи) представляет собой антигенсвязывающий белок, содержащий часть (независимо от того, как эту часть получают или синтезируют) антитела, в которой отсутствуют, по меньшей мере, некоторые аминокислоты, присутствующие в полноразмерной цепи, но которая способна специфически связываться с антигеном. Такие фрагменты являются биологически активными, так как они специфически связываются с целевым антигеном и могут конкурировать с другими антигенсвязывающими белками, включая интактные антитела, за связывание с заданным эпитопом. В одном аспекте такой фрагмент будет сохранять по меньшей мере одну CDR, присутствующую в полноразмерной легкой или тяжелой цепи, и в некоторых вариантах осуществления будет содержать одну тяжелую цепь и/или легкую цепь или ее часть. Эти биологически активные фрагменты могут быть получены с помощью методов рекомбинантной ДНК или могут быть получены, например, посредством ферментативного или химического расщепления антигенсвязывающих белков, включая интактные антитела. Иммунологически функциональные фрагменты иммуноглобулина включают без ограничения Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, доменные антитела и scFv и могут быть получены из любого источника, представляющего собой млекопитающее, включая без ограничения человека, мышь, крысу, верблюда или кролика. Дополнительно предполагается, что функциональная часть антигенсвязывающих белков, раскрытых в данном документе, например, одна или несколько CDR, может быть ковалентно связана со вторым белком или с малой молекулой с целью создания терапевтического средства, направленного на конкретную мишень в организме или имеющего продленный период полужизни в сыворотке крови.

"Выделенная молекула нуклеиновой кислоты" означает геномную ДНК или РНК, mRNA, cDNA или молекулу синтетического происхождения или некоторую их комбинацию, которые не связаны со всем или частью полинуклеотида, в котором выделенный полинуклеотид обнаруживается в природе, или связаны с полинуклеотидом, с которым они не связаны в природе. Следует понимать, что для целей настоящего изобретения "молекула нуклеиновой кислоты, содержащая" конкретную нуклеотидную последовательность, не охватывает интактные хромосомы. Выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, "содержащие" определенные последовательности нуклеиновой кислоты, в дополнение к определенным последовательностям могут включать последовательности, кодирующие до десяти или даже до двадцати других белков или их частей, или могут включать функционально связанные регуляторные последовательности, которые контролируют экспрессию кодирующей области упомянутых последовательностей нуклеиновой кислоты, и/или могут включать векторные последовательности.

Используемый в данном документе термин "выделенный полипептид", "очищенный полипептид", "выделенный белок" или "очищенный белок" предназначен для обозначения композиции, выделяемой из других компонентов, где полипептид очищен до любой степени по сравнению с его состоянием, которое можно получить в природе. Следовательно, очищенный полипептид также относится к полипептиду, который свободен от среды, в которой он может встречаться в природе. Как правило, термин "очищенный" относится к полипептидной композиции, которая была подвергнута фракционированию для удаления различных других компонентов и которая по существу сохраняет свою выраженную биологическую активность. Когда используется термин "по существу очищенный", это обозначение будет относиться к пептиду или полипептидной композиции, в которой полипептид или пептид образует основной компонент композиции, такой как составляющий приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95% или более белков в композиции.

Термин "легкая цепь", используемый в отношении антигенсвязывающего белка, антитела или их фрагментов, включает полноразмерную легкую цепь. Полноразмерная легкая цепь включает домен варибельной области (V_L) и домен константной области (C_L). Домен варибельной области легкой цепи находится на аминоконце полипептида. Легкие цепи включают каппа-цепи и лямбда-цепи. Фрагменты легких цепей имеют достаточную последовательность варибельной области для придания специфичности связывания.

Используемый повсюду в настоящем описании в отношении биологических материалов, таких как полипептиды, нуклеиновые кислоты, клетки-хозяева и т.п., термин "встречающийся в природе" относится к материалам, которые обнаруживаются в природе.

Термин "олигонуклеотид" означает полинуклеотид, содержащий 200 или менее нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина олигонуклеотидов составляет от 10 до 60 оснований. В других вариантах осуществления длина олигонуклеотидов составляет от 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 до 40 нуклеотидов. Олигонуклеотиды могут быть одностранными или двухстранными, например, для применения в конструировании мутантного гена. Олигонуклеотиды могут представлять собой смысловые или бессмысловые олигонуклеотиды. Олигонуклеотид может содержать метку, включая радиоактивную метку, флуоресцентную метку, гаптен или антигенную метку для применения в анализах обна-

ружения. Олигонуклеотиды можно применять, например, в качестве праймеров для ПЦР, праймеров для клонирования или гибридизационных зондов.

Применяемый в данном документе "функционально связанный" означает, что компоненты, в отношении которых применяют данный термин, находятся во взаимосвязи, которая позволяет им выполнять присущие им функции в подходящих условиях. Например, контрольная последовательность в векторе, которая "функционально связана" с кодирующей белок последовательностью, лигирована таким образом, что экспрессия кодирующей белок последовательности достигается в условиях, совместимых с транскрипционной активностью регуляторных последовательностей.

Термин "полинуклеотид" или "нуклеиновая кислота" включает как одонитевые, так и двухнитевые полимеры из нуклеотидов. Нуклеотиды, входящие в состав полинуклеотида, могут представлять собой рибонуклеотиды или дезоксирибонуклеотиды или модифицированную форму любого из этих типов нуклеотидов. Модификации включают модификации оснований, такие как бромуридиновые и инозиновые производные, модификации рибозы, такие как 2',3'-дидезоксирибоза, и модификации межнуклеотидных связей, такие как фосфоротиоатные, фосфородитиоатные, фосфороселеноатные, фосфородиселеноатные, фосфоранилиотиоатные, фосфораниладатные и фосфороамидатные связи.

Если не указано иное, находящийся слева конец любой обсуждаемой в данном документе одонитевой полинуклеотидной последовательности представляет собой 5'-конец; при этом находящееся слева направление двухнитевых полинуклеотидных последовательностей обозначается как 5'-направление. Направление от 5' к 3', в котором происходит наращивание формирующихся РНК-транскриптов, обозначается как направление транскрипции; области последовательности нити ДНК, содержащие такую же последовательность, что и РНК-транскрипт, которые расположены в направлении 5' относительно 5'-конца РНК-транскрипта, называются "вышележащими последовательностями"; области последовательности нити ДНК, содержащие такую же последовательность, что и РНК-транскрипт, которые расположены в направлении 3' относительно 3'-конца РНК-транскрипта, называются "нижележащими последовательностями".

Термины "полипептид" или "белок" используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения полимера из аминокислотных остатков. Данные термины также применимы к полимерам из аминокислот, в которых один или несколько аминокислотных остатков представляют собой аналог или миметик соответствующей встречающейся в природе аминокислоты, а также к встречающимся в природе полимерам из аминокислот. Термины также могут охватывать полимеры из аминокислот, которые были модифицированы, например, посредством добавления углеводных остатков с образованием гликопротеинов, или посредством фосфорилирования. Полипептиды и белки можно получать с помощью встречающейся в природе и нерекомбинантной клетки или с помощью генетически сконструированной или рекомбинантной клетки, и они могут предусматривать молекулы, содержащие аминокислотную последовательность нативного белка, или молекулы с делециями, вставками и/или заменами одной или нескольких аминокислот в нативной последовательности. Термин "фрагмент полипептида" относится к полипептиду, который содержит аминоконцевую делецию, карбоксиконцевую делецию и/или внутреннюю делецию по сравнению с полноразмерным белком. Такие фрагменты также могут содержать модифицированные аминокислоты по сравнению с полноразмерным белком. В определенных вариантах осуществления длина фрагментов составляет от приблизительно пяти до 500 аминокислот. Например, длина фрагментов может составлять по меньшей мере 5, 6, 8, 10, 14, 20, 50, 70, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 или 450 аминокислот.

"Рекомбинантный белок", включая рекомбинантный белок ТТР, представляет собой белок, полученный с применением рекомбинантных методик, т.е. посредством экспрессии рекомбинантной нуклеиновой кислоты, как описано в данном документе. Способы и методики получения рекомбинантных белков хорошо известны из уровня техники.

"Одноцепочечные Fv" (scFv) представляют собой молекулы Fv, в которых вариабельные области тяжелой и легкой цепей были соединены посредством гибкого линкера с образованием единой полипептидной цепи, которая образует антигенсвязывающую область. scFv подробно обсуждаются в международной публикации патентной заявки № WO 88/01649 и в патентах США № 4946778 и № 5260203.

"Солидная опухоль" относится к аномальному росту или массе ткани, которая обычно не содержит кист или жидких областей. Солидные опухоли могут быть доброкачественными (не раковыми) или злокачественными (раковыми). Различные типы солидных опухолей названы по типу клеток, которые их образуют. Примерами солидных опухолей являются саркомы, карциномы и лимфомы. Лейкозы (рак крови) обычно не образуют солидных опухолей.

Антигенсвязывающий белок "специфически связывается" с антигеном, когда антигенсвязывающий белок демонстрирует слабое связывание или его отсутствие с молекулами, отличными от антигена. Однако антигенсвязывающий белок, который специфически связывает антиген, может перекрестно реагировать с антигенами от различных видов. Как правило, антигенсвязывающий белок специфически связывает антиген человека, когда константа диссоциации (K_D) составляет $\leq 10^{-7}$ М, как измерено с помощью методики поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACore, GE-Healthcare, Упсала, Швеция). Антигенсвязывающий белок специфически связывает антиген с "высокой аффинностью", когда он свя-

зывается с $K_D \leq 5 \times 10^{-8}$ М, и с "очень высокой аффинностью", когда он связывается с $K_D \leq 5 \times 10^{-9}$ М (как измерено с использованием способа, такого как BIACore).

Используемые в данном документе термины "субъект" или "пациент" могут представлять собой любое млекопитающее. В типичном варианте осуществления субъект или пациент являются человеком.

Используемый в данном документе термин "по существу чистый" означает, что описанная разновидность молекулы представляет собой преобладающую присутствующую разновидность, то есть по молярному содержанию она является более распространенной, чем любая другая отдельная разновидность в той же смеси. В определенных вариантах осуществления по существу чистая молекула представляет собой композицию, в которой целевая разновидность составляет по меньшей мере 50% (по молярному содержанию) от всех присутствующих макромолекулярных разновидностей. В других вариантах осуществления по существу чистая композиция будет содержать по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% от всех макромолекулярных частиц, присутствующих в композиции. В других вариантах осуществления целевую разновидность очищают до фактической гомогенности, где контаминирующие разновидности не могут быть обнаружены в композиции с помощью традиционных способов обнаружения, и, таким образом, композиция состоит из одной обнаруживаемой макромолекулярной разновидности.

Термин "лечение" относится к любым признакам успеха в лечении или уменьшения интенсивности повреждения, патологии или состояния, включая любой объективный или субъективный параметр, такой как ослабление выраженности; ремиссия; снижение интенсивности симптомов или содействие лучшей переносимости пациентом повреждения, патологии или состояния; замедление темпов дегенерации или ухудшения; способствование менее изнуряющему протеканию конечной стадии дегенерации; улучшение физического или психического здоровья пациента. Лечение или уменьшение интенсивности симптомов может быть основано на объективных или субъективных параметрах; включая результаты физического осмотра, психоневрологических тестов и/или психиатрической оценки. Например, посредством определенных способов, представленных в данном документе, успешно осуществляют лечение рака и опухолей, например, путем уменьшения прогрессирования или распространения рака, подавления роста опухоли, вызывания ремиссии опухоли и/или уменьшения интенсивности симптома, связанного со раком или опухолью. Аналогично, посредством других способов, представленных в данном документе, осуществляют лечение инфекционного заболевания путем уменьшения прогрессирования или распространения инфекции, уменьшения степени инфекции и/или уменьшения интенсивности симптома, связанного с инфекцией.

Используемый в данном документе термин "TTR" относится к "транстиретину". TTR человека описан в Mita et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 124(2):558-564 (1984), которая включена в данный документ посредством ссылки. Аминокислотная последовательность TTR человека также описана в информационной базе данных UniProt (www.uniprot.org/uniprot/P02766#sections) и приведена в данном документе под SEQ ID NO: 1. Последовательность нуклеиновой кислоты TTR человека описана в NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7276). См. также депонирование в GenBank K02091.1. Последовательность нуклеиновой кислоты TTR человека упомянута в данном документе под SEQ ID NO: 44. Последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот TTR мыши приведены под SEQ ID NO: 2 и 3 соответственно. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота TTR человека представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует белок TTR человека под SEQ ID NO: 1. В других вариантах осуществления нуклеиновая кислота TTR мыши представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует белок TTR мыши под SEQ ID NO: 2.

Термин "вариант TTR" относится к белку, содержащему аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична TTR под SEQ ID NO: 1. Настоящее изобретение также включает нуклеиновые кислоты, кодирующие такие варианты TTR. Конкретные варианты включают, например, белки TTR с усечениями на С- или N-конце.

"Опухоль" относится к массе ткани, образованной в результате роста и размножения раковых клеток, которые могут проникать и разрушать нормальные прилегающие ткани. Раковые клетки могут отделяться от злокачественной опухоли и попадать в кровоток или лимфатическую систему, так что раковые клетки распространяются из первичной опухоли с образованием новых опухолей в других органах.

"Вариант" полипептида включает аминокислотную последовательность, где один или несколько аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности вставлены, удалены и/или заменены по сравнению с другой полипептидной последовательностью. Варианты включают слитые белки.

Используемый в данном документе термин "вектор" предназначен для обозначения молекулы нуклеиновой кислоты, способной к переносу другой нуклеиновой кислоты, с которой она была связана. Одним типом вектора является "плазмида", которая относится к кольцевой двухнитевой петле ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, где в вирусный геном могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Определенные векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, содержащие бактериальную точку начала репликации, и эписомные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомные векторы млекопитающих) могут быть интегриро-

ваны в геном клетки-хозяина после введения в клетку-хозяина и реплицируются, таким образом, вместе с геномом хозяина. Более того, некоторые векторы способны управлять экспрессией генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называются в данном документе "рекомбинантными векторами экспрессии" (или просто "векторами экспрессии"). Как правило, векторы экспрессии, используемые в методиках рекомбинантных ДНК, часто находятся в форме плазмид. В настоящем описании "плазмида" и "вектор" могут использоваться взаимозаменяемо, поскольку плазмида является наиболее часто используемой формой вектора. Однако, подразумевается, что настоящее изобретение включает и другие такие формы векторов экспрессии, такие как вирусные векторы (например, ретровирусы, дефектные по репликации, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), выполняющие эквивалентные функции.

Варианты TTR

Как обсуждалось ранее, TTR человека представляет собой нековалентный тетрамерный белок. Тетрамерный белок TTR состоит из димера димеров (фиг. 3). Интересно, что область контакта между мономерами TTR, которые образуют димеры TTR (фиг. 3, левая сторона), и область контакта между димерами TTR, которые образуют тетрамеры TTR (фиг. 3, правая сторона), различаются. Различия между двумя областями контакта позволяют конструировать варианты TTR, которые модулируют взаимодействие между димерами TTR, не нарушая области контакта между мономерами TTR.

В одном аспекте настоящего изобретения каждый из четырех мономеров TTR, которые составляют тетрамерный белок, может быть описан в виде субъединицы A, B, C или D TTR, где субъединицы A и B TTR образуют первый димер AB, а субъединицы C и D TTR образуют второй димер CD (фиг. 3). Димер AB TTR и димер CD TTR связываются с образованием тетрамера ABCD TTR. Мономеры TTR по настоящему изобретению содержат по меньшей мере одну аминокислотную мутацию (относительно SEQ ID NO: 1) в области контакта между димером AB TTR и димером CD TTR таким образом, что образование тетрамера ABCD является более предпочтительным, чем образование любого другого тетрамера (например тетрамера ABAB или тетрамера CDCD).

Соответственно, настоящее изобретение относится к белковому комплексу на основе TTR, где белковый комплекс на основе TTR содержит субъединицы A, B, C и D TTR; субъединицы A и B TTR димеризуются с образованием димера AB TTR; субъединицы C и D TTR димеризуются с образованием димера CD TTR; димеры AB и CD TTR дополнительно димеризуются с образованием тетрамера ABCD TTR и каждая из субъединиц A, B, C и D содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, за исключением того, что по меньшей мере одна аминокислота в области контакта между димером AB TTR и димером CD TTR подвергнута мутации таким образом, что образование тетрамера ABCD является более предпочтительным, чем образование любого другого тетрамера (например тетрамера ABAB или тетрамера CDCD).

Каждая из A, B, C и D белкового комплекса на основе TTR может содержать аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1 со следующими мутациями: C10A, K15A или обеими из C10A и K15A.

Таким образом, в одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к белковым комплексам на основе TTR, где обе из A и B, обе из C и D или все четыре из A, B, C и D содержат мутацию в одном или нескольких аминокислотных положениях, выбранных из перечня, содержащего 6, 7, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 50, 51, 52, 53, 54, 56, 57, 60, 61, 62, 63, 78, 82, 83, 84, 85, 100, 101, 102, 103, 104, 106, 108, 110, 112, 113, 114, 115, 117, 119, 121, 123, 124, 125, 126 и 127 из SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления мутации представлены в дополнение к C10A и K15A.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к белковому комплексу на основе TTR, где обе из A и B, обе из C и D или все четыре из A, B, C и D содержат мутацию в одном или нескольких аминокислотных положениях, выбранных из перечня, содержащего 15, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 51, 52, 84, 106, 108, 112, 114, 115, 119, 121 и 123 из SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления мутации представлены в дополнение к C10A и K15A.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к белковому комплексу на основе TTR, где обе из A и B, обе из C и D или все четыре из A, B, C и D содержат мутацию в одном или нескольких аминокислотных положениях, выбранных из перечня, содержащего 15, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 51, 52, 84, 106, 108, 112, 114, 115, 119, 121 и 123 из SEQ ID NO: 1, где указанная аминокислота подвергнута мутации с заменой на аспарат, глутамат, аргинин, лизин или гистидин. В некоторых вариантах осуществления мутации представлены в дополнение к C10A и K15A.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к белковому комплексу на основе TTR, где A и B содержат мутацию в одном или нескольких аминокислотных положениях, выбранных из перечня, содержащего 15, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 51, 52, 84, 106, 108, 112, 114, 115, 119, 121, и 123 из SEQ ID NO: 1, где указанная аминокислота подвергнута мутации с заменой на аспарат или глутамат. В некоторых вариантах осуществления мутации представлены в дополнение к C10A и K15A.

В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к белковому комплексу на основе TTR, где C и D содержат мутацию в одном или нескольких аминокислотных положениях, выбранных из перечня, содержащего 15, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 51, 52, 84, 106, 108, 112, 114, 115, 119, 121, и

123 из SEQ ID NO: 1, где указанная аминокислота подвергнута мутации с заменой на аргинин, лизин или гистидин. В некоторых вариантах осуществления мутации представлены в дополнение к C10A и K15A.

В конкретном варианте осуществления А и В содержат мутацию в одном или нескольких аминокислотных положениях, выбранных из перечня, содержащего 15, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 51, 52, 84, 106, 108, 112, 114, 115, 119, 121 и 123 из SEQ ID NO: 1, где указанная аминокислота подвергнута мутации с заменой на аспаргат или глутамат, а С и D содержат мутацию в одном или нескольких аминокислотных положениях, выбранных из перечня, содержащего 15, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 51, 52, 84, 106, 108, 112, 114, 115, 119, 121 и 123 из SEQ ID NO: 1, где указанная аминокислота подвергнута мутации с заменой на аргинин, лизин или гистидин. В некоторых вариантах осуществления мутации представлены в дополнение к C10A и K15A.

В некоторых вариантах осуществления А и В содержат по меньшей мере одну мутацию в SEQ ID NO: 1, где указанная мутация выбрана из перечня, содержащего K15D, L17D, V20D, R21D, G22D, S23D, P24D, S52D, I84D, T106D, A108D, S112D, Y114D, S115D, T119D, V121D, S123D, K15E, L17E, V20E, R21E, G22E, S23E, P24E, D51E, S52E, I84E, T106E, A108E, S112E, Y114E, S115E, T119E, V121E и S123E. Настоящее изобретение также относится к белковым комплексам на основе TTR, где А и В содержат по меньшей мере одну мутацию в SEQ ID NO: 1, где мутация выбрана из перечня, содержащего L17D, L17E, V20D, V20E, G22D, G22E, S112D, S112E, T119D, T119E, V121D и V121E. В некоторых вариантах осуществления мутации представлены в дополнение к C10A и K15A.

В некоторых вариантах осуществления С и D содержат по меньшей мере одну мутацию в SEQ ID NO: 1, где указанная мутация выбрана из перечня, содержащего K15R, L17R, V20R, G22R, S23R, P24R, D51R, S52R, I84R, T106R, A108R, S112R, Y114R, S115R, T119R, V121R, S123R, L17K, V20K, R21K, G22K, S23K, P24K, D51K, S52K, I84K, T106K, A108K, S112K, Y114K, S115K, T119K, V121K, S123K, K15H, L17H, V20H, R21H, G22H, S23H, P24H, D51H, S52H, I84H, T106H, A108H, S112H, Y114H, S115H, T119H, V121H и S123H. Настоящее изобретение также относится к белковым комплексам на основе TTR, где С и D содержат по меньшей мере одну мутацию в SEQ ID NO: 1, где мутация выбрана из перечня, содержащего L17R, L17K, L17H, V20R, V20K, V20H, G22R, G22K, G22H, S112R, S112K, S112H, T119R, T119K, T119H, V121R, V121K и V121H. В некоторых вариантах осуществления мутации представлены в дополнение к C10A и K15A.

Белковый комплекс на основе TTR по настоящему изобретению может содержать субъединицы TTR, где обе из А и В, обе из С и D или все четыре из А, В, С и D независимо содержат одну или две мутации, обсуждаемые в данном документе. В некоторых вариантах осуществления белковый комплекс на основе TTR по настоящему изобретению может содержать субъединицы TTR, где обе из А и В, обе из С и D или все четыре из А, В, С и D независимо содержат одну мутацию, обсуждаемую в данном документе. В некоторых вариантах осуществления мутации представлены в дополнение к C10A и K15A.

В конкретных вариантах осуществления белковые комплексы на основе TTR по настоящему изобретению содержат субъединицы TTR, где каждая из А, В, С и D содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1 со следующими мутациями (и наоборот) в табл. 1.

Таблица 1

Мутация в субъединицах А и В TTR*	Мутация в субъединицах С и D TTR*	Мутация в субъединицах А и В TTR*	Мутация в субъединицах С и D TTR*
C10A/K15A/L17D	C10A/K15A/L17R	C10A/K15A/L17D	C10A/K15A/S112R
C10A/K15A/L17E	C10A/K15A/L17R	C10A/K15A/L17E	C10A/K15A/S112R
C10A/K15A/V20D	C10A/K15A/L17R	C10A/K15A/V20D	C10A/K15A/S112R
C10A/K15A/V20E	C10A/K15A/L17R	C10A/K15A/V20E	C10A/K15A/S112R

C10A/K15A/G22D	C10A/K15A/L17R
C10A/K15A/G22E	C10A/K15A/L17R
C10A/K15A/S112 D	C10A/K15A/L17R
C10A/K15A/S112E	C10A/K15A/L17R
C10A/K15A/T119 D	C10A/K15A/L17R
C10A/K15A/T119E	C10A/K15A/L17R
C10A/K15A/V121 D	C10A/K15A/L17R
C10A/K15A/V121 E	C10A/K15A/L17R
C10A/K15A/L17D	C10A/K15A/L17K
C10A/K15A/L17E	C10A/K15A/L17K
C10A/K15A/V20D	C10A/K15A/L17K
C10A/K15A/V20E	C10A/K15A/L17K
C10A/K15A/G22D	C10A/K15A/L17K
C10A/K15A/G22E	C10A/K15A/L17K
C10A/K15A/S112 D	C10A/K15A/L17K
C10A/K15A/S112E	C10A/K15A/L17K
C10A/K15A/T119	C10A/K15A/L17K

	R
C10A/K15A/G22D	C10A/K15A/S112 R
C10A/K15A/G22E	C10A/K15A/S112 R
C10A/K15A/S112D	C10A/K15A/S112 R
C10A/K15A/S112E	C10A/K15A/S112 R
C10A/K15A/T119D	C10A/K15A/S112 R
C10A/K15A/T119E	C10A/K15A/S112 R
C10A/K15A/V121 D	C10A/K15A/S112 R
C10A/K15A/V121E	C10A/K15A/S112 R
C10A/K15A/L17D	C10A/K15A/S112 K
C10A/K15A/L17E	C10A/K15A/S112 K
C10A/K15A/V20D	C10A/K15A/S112 K
C10A/K15A/V20E	C10A/K15A/S112 K
C10A/K15A/G22D	C10A/K15A/S112 K
C10A/K15A/G22E	C10A/K15A/S112 K
C10A/K15A/S112D	C10A/K15A/S112 K
C10A/K15A/S112E	C10A/K15A/S112 K
C10A/K15A/T119D	C10A/K15A/S112

D	
C10A/K15A/T119E	C10A/K15A/L17K
C10A/K15A/V121	C10A/K15A/L17K
D	
C10A/K15A/V121	C10A/K15A/L17K
E	
C10A/K15A/L17D	C10A/K15A/V20R
C10A/K15A/L17E	C10A/K15A/V20R
C10A/K15A/V20D	C10A/K15A/V20R
C10A/K15A/V20E	C10A/K15A/V20R
C10A/K15A/G22D	C10A/K15A/V20R
C10A/K15A/G22E	C10A/K15A/V20R
C10A/K15A/S112	C10A/K15A/V20R
D	
C10A/K15A/S112E	C10A/K15A/V20R
C10A/K15A/T119	C10A/K15A/V20R
D	
C10A/K15A/T119E	C10A/K15A/V20R
C10A/K15A/V121	C10A/K15A/V20R
D	
C10A/K15A/V121	C10A/K15A/V20R
E	
C10A/K15A/L17D	C10A/K15A/V20
	K
C10A/K15A/L17E	C10A/K15A/V20

	K
C10A/K15A/T119E	C10A/K15A/S112
	K
C10A/K15A/V121	C10A/K15A/S112
D	K
C10A/K15A/V121E	C10A/K15A/S112
	K
C10A/K15A/L17D	C10A/K15A/T119
	R
C10A/K15A/L17E	C10A/K15A/T119
	R
C10A/K15A/V20D	C10A/K15A/T119
	R
C10A/K15A/V20E	C10A/K15A/T119
	R
C10A/K15A/G22D	C10A/K15A/T119
	R
C10A/K15A/G22E	C10A/K15A/T119
	R
C10A/K15A/S112D	C10A/K15A/T119
	R
C10A/K15A/S112E	C10A/K15A/T119
	R
C10A/K15A/T119D	C10A/K15A/T119
	R
C10A/K15A/T119E	C10A/K15A/T119
	R
C10A/K15A/V121	C10A/K15A/T119
D	R
C10A/K15A/V121E	C10A/K15A/T119
	R
C10A/K15A/L17D	C10A/K15A/T119
	K
C10A/K15A/L17E	C10A/K15A/T119

	K
C10A/K15A/V20D	C10A/K15A/V20 K
C10A/K15A/V20E	C10A/K15A/V20 K
C10A/K15A/G22D	C10A/K15A/V20 K
C10A/K15A/G22E	C10A/K15A/V20 K
C10A/K15A/S112 D	C10A/K15A/V20 K
C10A/K15A/S112E	C10A/K15A/V20 K
C10A/K15A/T119 D	C10A/K15A/V20 K
C10A/K15A/T119E	C10A/K15A/V20 K
C10A/K15A/V121 D	C10A/K15A/V20 K
C10A/K15A/V121 E	C10A/K15A/V20 K
C10A/K15A/L17D	C10A/K15A/G22R
C10A/K15A/L17E	C10A/K15A/G22R
C10A/K15A/V20D	C10A/K15A/G22R
C10A/K15A/V20E	C10A/K15A/G22R
C10A/K15A/G22D	C10A/K15A/G22R
C10A/K15A/G22E	C10A/K15A/G22R
C10A/K15A/S112	C10A/K15A/G22R

	K
C10A/K15A/V20D	C10A/K15A/T119 K
C10A/K15A/V20E	C10A/K15A/T119 K
C10A/K15A/G22D	C10A/K15A/T119 K
C10A/K15A/G22E	C10A/K15A/T119 K
C10A/K15A/S112D	C10A/K15A/T119 K
C10A/K15A/S112E	C10A/K15A/T119 K
C10A/K15A/T119D	C10A/K15A/T119 K
C10A/K15A/T119E	C10A/K15A/T119 K
C10A/K15A/V121 D	C10A/K15A/T119 K
C10A/K15A/V121E	C10A/K15A/T119 K
C10A/K15A/L17D	C10A/K15A/V121 R
C10A/K15A/L17E	C10A/K15A/V121 R
C10A/K15A/V20D	C10A/K15A/V121 R
C10A/K15A/V20E	C10A/K15A/V121 R
C10A/K15A/G22D	C10A/K15A/V121 R
C10A/K15A/G22E	C10A/K15A/V121 R
C10A/K15A/S112D	C10A/K15A/V121

D	
C10A/K15A/S112E	C10A/K15A/G22R
C10A/K15A/T119D	C10A/K15A/G22R
D	
C10A/K15A/T119E	C10A/K15A/G22R
C10A/K15A/V121D	C10A/K15A/G22R
D	
C10A/K15A/V121E	C10A/K15A/G22R
E	
C10A/K15A/L17D	C10A/K15A/G22K
C10A/K15A/L17E	C10A/K15A/G22K
C10A/K15A/V20D	C10A/K15A/G22K
C10A/K15A/V20E	C10A/K15A/G22K
C10A/K15A/G22D	C10A/K15A/G22K
C10A/K15A/G22E	C10A/K15A/G22K
C10A/K15A/S112D	C10A/K15A/G22K
C10A/K15A/S112E	C10A/K15A/G22K
C10A/K15A/T119D	C10A/K15A/G22K
C10A/K15A/T119E	C10A/K15A/G22K
C10A/K15A/V121D	C10A/K15A/G22K
C10A/K15A/V121E	C10A/K15A/G22K
E	K

* Относительно SEQ ID NO: 1

	R
C10A/K15A/S112E	C10A/K15A/V121R
C10A/K15A/T119D	C10A/K15A/V121R
C10A/K15A/T119E	C10A/K15A/V121R
C10A/K15A/V121D	C10A/K15A/V121R
C10A/K15A/V121E	C10A/K15A/V121R
C10A/K15A/L17D	C10A/K15A/V121K
C10A/K15A/L17E	C10A/K15A/V121K
C10A/K15A/V20D	C10A/K15A/V121K
C10A/K15A/V20E	C10A/K15A/V121K
C10A/K15A/G22D	C10A/K15A/V121K
C10A/K15A/G22E	C10A/K15A/V121K
C10A/K15A/S112D	C10A/K15A/V121K
C10A/K15A/S112E	C10A/K15A/V121K
C10A/K15A/T119D	C10A/K15A/V121K
C10A/K15A/T119E	C10A/K15A/V121K
C10A/K15A/V121D	C10A/K15A/V121K
C10A/K15A/V121E	C10A/K15A/V121K
	K

* Относительно SEQ ID NO: 1

Любой из вариантов TTR и пар вариантов в табл. 1 является подходящим для применения в в настоящем изобретении. В табл. 2 отмечено количество образованного тетрамера TTR, наблюдаемое для определенных вариантов и пар (см. пример 2 и фиг. 7).

Таблица 2. Образование тетрамера TTR

Относительно количество образованного тетрамера *	Отрицательно заряженный	Положительно заряженный	Относительное количество образованного тетрамера*	Отрицательно заряженный	Положительно заряженный
1	L17D	V121R	2	V121E	V20R
1	L17D	V121K	2	V121E	V20K
1	L17E	V121R	2	V121E	T119R
1	V20D	V20R	2	V121E	V121R
1	V20D	V20K	2	V121E	V121K
1	V20E	V20R	3	T119D	T119K
1	V20E	V20K	3	T119E	V121R
1	T119D	L17R	3	L17D	G22R
1	T119D	L17K	3	L17D	G22K
1	V121E	L17K	3	V20D	L17R
2	L17D	L17R	3	G22D	L17R
2	L17D	L17K	3	G22D	L17K
2	L17D	V20R	3	G22D	V20K
2	L17D	V20K	3	G22D	V121R
2	L17D	T119R	3	G22D	V121K
2	L17D	T119K	3	G22E	L17R
2	L17E	L17R	3	G22E	L17K
2	L17E	L17K	3	G22E	V20K
2	L17E	V20R	3	G22E	V121R
2	L17E	V20K	3	G22E	V121K
2	L17E	T119R	3	S112D	L17R
2	L17E	T119K	3	S112D	L17K
2	L17E	V121K	3	S112D	V20R
2	V20D	L17K	3	S112D	V20K
2	V20E	L17R	3	S112E	L17R
2	V20E	L17K	3	S112E	L17K
2	T119D	V20K	3	S112E	V20K
2	T119D	T119R	3	T119D	V20R
2	T119D	V121R	3	T119E	V20K
2	T119D	V121K	3	T119E	T119K
2	T119E	L17R	3	V121D	V20K
2	T119E	L17K	3	V121D	V121R
2	T119E	T119R	3	V121D	V121K
2	T119E	V121K	3	V121E	G22R
2	V121D	L17R	3	V121E	G22K
2	V121D	L17K	3	V121E	T119K
2	V121E	L17R			

*Ранг 1=прочно связанные тетрамеры, определенные посредством SEC и устойчивые к SDS

Ранг 2=прочно связанные тетрамеры, определенные посредством SEC > 60%,
незначительно устойчивые или не устойчивые к SDS

Ранг 3=значимые тетрамеры, определенные посредством SEC > 10% и <= 60%

Белковый комплекс на основе TTR по настоящему изобретению может содержать субъединицы TTR, где обе из А и В, обе из С и D или все четыре из А, В, С и D независимо содержат две мутации, обсуждаемые в данном документе. В некоторых вариантах осуществления А и В содержат две мутации в SEQ ID NO: 1, где указанные мутации выбраны из перечня, содержащего L17D/V20D, L17D/V20E, L17E/V20D, L17E/V20E, L17D/T119D, L17D/V121E, L17E/T119D, L17E/V121E, V20D/T119D,

V20D/V121E, V20E/T119D, и V20E/V121E. В некоторых вариантах осуществления мутации представлены в дополнение к C10A и K15A.

В некоторых вариантах осуществления C и D содержат две мутации в SEQ ID NO: 1, где указанные мутации выбраны из перечня, содержащего: L17K/V20K, L17K/V20R, L17R/V20K, L17R/V20R, L17K/V121K, L17K/V121R, L17R/V121K, L17R/V121R, V20K/V121K, V20K/V121R, V20R/V121K и V20R/V121R. В некоторых вариантах осуществления мутации представлены в дополнение к C10A и K15A.

В конкретных вариантах осуществления белковые комплексы на основе TTR по настоящему изобретению содержат субъединицы TTR, где каждая из A, B, C и D содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1 со следующими мутациями (и наоборот) в табл. 3.

Таблица 3

Мутации в субъединицах A и B TTR*	Мутации в субъединицах C и D TTR*	Мутации в субъединицах A и B TTR*	Мутации в субъединицах C и D TTR*
C10A/K15A/L17D /V20D	C10A/K15A/L17 K/V20K	C10A/K15A/L17E/T119D	C10A/K15A/L17R /V121K
C10A/K15A/L17D /V20E	C10A/K15A/L17 K/V20R	C10A/K15A/L17E/V121E	C10A/K15A/L17R /V121R
C10A/K15A/L17E/V20D	C10A/K15A/L17 R/V20K	C10A/K15A/V20D / T119D	C10A/K15A/V20K /V121K
C10A/K15A/L17E/V20E	C10A/K15A/L17 R/V20R	C10A/K15A/V20D / V121E	C10A/K15A/V20K /V121R
C10A/K15A/L17D /T119D	C10A/K15A/L17 K/V121K	C10A/K15A/V20E/T119D	C10A/K15A/V20R /V121K
C10A/K15A/L17D /V121E	C10A/K15A/L17 K/V121R	C10A/K15A/V20E/V121E	C10A/K15A/V20R /V121R

* Относительно SEQ ID NO: 1

* Относительно SEQ ID NO: 1

В некоторых вариантах осуществления белковые комплексы на основе TTR по настоящему изобретению содержат субъединицы TTR, где A и B или C и D содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1 со следующими мутациями: C10A/K15A/V20E/T119D, C10A/K15A/L17D/T119D, C10A/K15A/L17E/T119D, C10A/K15A/L17R/V20K, C10A/K15A/L17K/V20K, C10A/K15A/L17R/V121R или C10A/K15A/L17R/V121K.

Как обсуждалось выше, варианты TTR также могут использоваться в настоящем изобретении. Любой из вариантов TTR, обсуждаемых в данном документе, может использоваться в комбинации друг с другом. Варианты TTR включают белки, содержащие аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 86%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична белку TTR, содержащему мутацию относительно SEQ ID NO: 1.

Цистеины, присутствующие в TTR человека (SEQ ID NO: 1), можно использовать в качестве сайтов конъюгации с биоактивными белками, пептидами или малыми молекулами. В некоторых вариантах осуществления цистеины, присутствующие в TTR человека (SEQ ID NO: 1), можно использовать в качестве сайтов конъюгации с антигенсвязывающими белками (например антителами и Fab). Кроме того, варианты TTR, которые обеспечивают сайт-специфическую конъюгацию, такие как варианты TTR со сконструированными цистеинами, могут быть использованы в настоящем изобретении. См., например, USP 8633153, которая включена в данный документ посредством ссылки. Например, вариант TTR может включать одну или несколько из следующих мутаций по цистеину: A37C, D38C, A81C или G83C.

Дополнительные варианты, пригодные в настоящем изобретении, включают, например, белки TTR с усеками на C- или N-конце. Такие белки TTR включают белки, где 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, или 20 аминокислот удалены с C- или N-конца белка TTR. В некоторых вариантах осуществления слитые белки по настоящему изобретению содержат белки TTR, где 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, или 8 аминокислот удалены с C- или N-конца белка TTR. В других вариантах осуществления слитые белки по настоящему изобретению содержат белки TTR, где 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислот удалены с N-конца белка TTR.

Дополнительные варианты TTR, которые можно использовать в настоящем изобретении, включают варианты, которые уменьшают или блокируют связывание TTR с тироксином. Каждый тетрамер на основе TTR содержит два сайта связывания тироксина, расположенных в центральном канале тетрамера на основе TTR. Такие варианты, например, могут избежать вмешательства в биологию тироксина у пациен-

тов и могут избежать воздействия продуктов слияния на основе TTR на путь метаболизма тирокина. Еще другие варианты TTR, которые можно использовать в настоящем изобретении, включают варианты, которые уменьшают или устраняют протеолитическую активность TTR.

Кроме того, в настоящем изобретении могут использоваться продукты слияния TTR и His-метки. Например, продукты слияния TTR и His-метки можно использовать при очистке конструкций TTR-Fab, где Fab не содержит Fc, или для очистки конструкций TTR-Ab, где предпочтительно избегать среды для очистки с низким pH колонки для аффинной хроматографии на основе связывания с белком А. В некоторых вариантах осуществления His-метка удаляется после очистки. His-метки могут также присутствовать в конечной терапевтической молекуле (т.е. метка может сохраняться после очистки). В некоторых вариантах осуществления His-метка представляет собой His, (His)₂, (His)₃, (His)₄, (His)₅, (His)₆, (His)₇, (His)₈, (His)₉, или (His)₁₀-метку. В конкретных вариантах осуществления His-метка представляет собой (His)₆ или (His)₇-метку. В конкретном варианте осуществления His-метка представляет собой (His)₆-метку. В некоторых вариантах осуществления His-метка содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот, представляющих собой глицин, в качестве линкера. В конкретном варианте осуществления His-метка включает два глицина (например, GGNNNNN).

В некоторых вариантах осуществления двухглицинный аминокислотный линкер может быть вставлен между вариантом TTR и тяжелой или легкой цепью.

Кроме того, вариант TTR по настоящему изобретению может включать варианты, включающие сайты гликозилирования, которые могут быть полезны при модулировании свойств РК или растворимости продуктов слияния на основе TTR. Кроме того, варианты TTR или слитые белки на основе TTR по настоящему изобретению могут быть модифицированы для включения фрагментов, которые придают полезные РК свойства, например триазинсодержащих фрагментов (содержащихся в конструкциях, содержащих концевую группу, способную вступать в реакцию с белком; см., например, публикацию РСТ № WO/2017/083604, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

В некоторых вариантах осуществления белковый комплекс на основе TTR присоединен к 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, или 8 антигенсвязывающим белкам или пептидам. В других вариантах осуществления белковый комплекс на основе TTR присоединен к 1, 2, 3 или 4 антигенсвязывающим белкам или пептидам. Антигенсвязывающие белки или пептиды могут быть присоединены к белковому комплексу на основе TTR по С-концу субъединицы TTR или N-концу субъединицы TTR. Кроме того, белковый комплекс на основе TTR может быть непосредственно присоединен к 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, или 8 антигенсвязывающим белкам или пептидам или может быть присоединен к 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, или 8 антигенсвязывающим белкам или пептидам посредством линкера. В конкретных вариантах осуществления белковый комплекс на основе TTR непосредственно присоединен к 1, 2, 3 или 4 антигенсвязывающим белкам или пептидам или присоединен к 1, 2, 3 или 4 антигенсвязывающим белкам посредством линкера или пептидов.

Гетеродимерные слитые белки (комплексы)

Как описано в данном документе, настоящее изобретение частично относится к применению TTR в мультимеризации антигенсвязывающих белков, таких как антитела. Поскольку TTR представляет собой внеклеточный белок человека, встречающийся в сыворотке крови человека, он присутствует в относительно высоких количествах во всем организме человека, что снижает вероятность того, что он вызовет иммунный ответ при присутствии в мультимеризационных конструкциях по настоящему изобретению (по сравнению, например, с белками, отличными от белков человека, внутриклеточными и редкими белками). Соответственно, его использование в методиках мультимеризации по настоящему изобретению является выгодным.

Например, TTR можно использовать в димеризации антител, которые связывают разные эпитопы, где эпитопы присутствуют, например, на одном или разных белках. В таких гетеродимерных слитых белках TTR (SEQ ID NO: 1) или его вариант присутствуют в виде тетрамера, где субъединица TTR связана с С-концом тяжелой цепи антитела с образованием гетеродимеров TTR-антитела. Например, С-конец каждой тяжелой цепи антитела (причем каждое антитело содержит два таких С-конца) может быть связан с N-концом каждой субъединицы TTR (см. фиг. 1 и 2). Таким образом, каждое антитело связано с двумя субъединицами TTR в тетрамере TTR, в результате чего образуется гетеродимер TTR-антитела.

Соответственно, настоящее изобретение относится к гетеродимерным слитым белкам, содержащим два антигенсвязывающих белка, где каждый антигенсвязывающий белок связывает другой эпитоп, где эпитопы присутствуют, например, на одном или разных белках. В некоторых вариантах осуществления гетеротетрамерные слитые белки содержат антигенсвязывающие белки, связанные с белковым комплексом. В некоторых вариантах осуществления белковый комплекс представляет собой белковый комплекс на основе TTR, где белковый комплекс на основе TTR представляет собой тетрамер TTR. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок представляет собой антитело.

В конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к гетеродимерным слитым белкам, содержащим два антитела, связанные с тетрамером TTR, где каждый антигенсвязывающий белок связывает другой эпитоп, где эпитопы присутствуют, например, на одном или разных белках. Антитела могут быть связаны с тетрамером на основе TTR без линкера (т.е. антитела непосредственно связаны с TTR).

В других вариантах осуществления антитела связаны с тетрамером на основе TTR с помощью линкера. Например, аминокислотные линкеры могут быть использованы для связывания С-конца тяжелой цепи антитела с N-концом субъединицы TTR. В некоторых вариантах осуществления длина линкера составляет 1-5, 1-10, 1-15, 1-20, 1-25, 1-30, 1-35, или 1-40 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления длина линкера составляет, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, или 40 аминокислот. В других вариантах осуществления длина линкера составляет, 35, или 40 аминокислот. В других вариантах осуществления длина линкера составляет не более 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, или 40 аминокислот. В других вариантах осуществления длина линкера составляет не более 5, 10, 15 или 20 аминокислот. В конкретных вариантах осуществления длина линкера составляет 0, 5, 10, 15 или 20 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления линкер is GGGGS, GGGSGGGGS (i.e., (GGGS)₂), GGGSGGGSGGGGS (i.e., (GGGS)₃), GGGSGGGSGGGSGGGGS (i.e., (GGGS)₄), GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (i.e., (GGGS)₅), или GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (i.e., (GGGS)₆). В других вариантах осуществления представляется собой GGGGS, GGGSGGGGS (i.e., (GGGS)₂), GGGSGGGSGGGGS (i.e., (GGGS)₃), или GGGSGGGSGGGSGGGGS (i.e., (GGGS)₄).

Другие подходящие аминокислотные линкеры включают, например, дисульфидные связи, (Gly)_n (n=1-10), (EAAAK)_n (n=1-5), A(EAAAK)₄ALEA(EAAAK)₄A, PAPAP, AEAALKEAALKA, (Ala-Pro)_n (n=1-20), VSQTSKLTRAETVFPDV, PLGLWA, RVLAEA, EDVCCSMSY, GGIEGRGS, TRHRQPRGWE, AGNRVRRSVG, RRRRRRRR, GFLG и LE. Подходящие неаминокислотные линкеры включают полиэтиленгликоль (PEG).

В некоторых вариантах осуществления антитела связаны с усеченной субъединицей TTR с помощью линкера или без него. Например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10 аминокислот могут быть удалены с N-конца одной или нескольких субъединиц TTR и антитело может быть присоединено к N-концу усеченной субъединицы TTR.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим гетеродимерные слитые белки, описанные в данном документе. Детали, касающиеся иллюстративных способов получения гетеродимерных слитых белков, можно найти в разделе "Примеры".

Гетеротетрамерные и гетеротетрамерные слитые белки (комплексы)

Настоящее изобретение также частично относится к применению TTR в тримеризации или тетрамеризации антигенсвязывающих белков, таких как антитела.

В гетеротетрамерных слитых белках TTR (SEQ ID NO: 1) или его вариант также присутствуют в виде тетрамера. Однако в контексте гетеротетрамеров TTR-антитело одна тяжелая цепь антитела (т.е. только одна из двух тяжелых цепей, присутствующих в одном антителе) связана с каждой субъединицей TTR, что позволяет связывать четыре антитела с тетрамером TTR (см. фиг. 2e). Одна из двух тяжелых цепей на С-конце антитела может быть связана с N-концом каждой субъединицы TTR (см. фиг. 2e). Таким образом, каждое антитело связано с одной субъединицей TTR в тетрамере TTR, в результате чего образуется гетеротетрамер TTR-антитело.

В таких гетеротетрамерных слитых белках образование гетеродимеров Fc (обсуждалось выше) препятствуется посредством мутаций в Fc. Такие модификации включают мутации Fc, такие как "выступы во впадины", DuoBody, Azymetric, замены пар заряженных аминокислот, HA-TF, SEEDbody и модификации с дифференциальной аффинностью к белку А. См., например, Spiess et al., *Molecular Immunology*, 67(2, Part A), 2015, pp. 95-106. Мутации по типу "выступы во впадины" включают T366W в первой тяжелой цепи и T366S, L368A и/или Y407V во второй тяжелой цепи. См., например, Ridgway et al., *Protein Eng.*, 9 (1996), pp. 617-621 и Atwell et al., *J. Mol. Biol.*, 270 (1997), pp. 26-35. Мутации DuoBody включают F405L в первой тяжелой цепи и K409R во второй тяжелой цепи. См., например, Labrijn et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110 (2013), pp. 5145-5150. Мутации Azymetric включают T350V, L351Y, F405A и/или Y407V в первой тяжелой цепи и T350V, T366L, K392L и/или T394W во второй тяжелой цепи. См., например, Von Kreudenstein et al., *mAbs*, 5 (2013), pp. 646-654. Мутации HA-TF включают S364H и/или F405A в первой тяжелой цепи и Y349T и/или T394F во второй тяжелой цепи. См., например, Moore et al., *mAbs*, 3 (2011), pp. 546-557. Мутации SEEDbody включают мутации химеризации IgG/A в первой тяжелой цепи и мутации химеризации IgG/A во второй тяжелой цепи. См., например, Davis et al., *Protein Eng. Des. Sel.*, 23 (2010), pp. 195-202. Мутации с дифференциальной аффинностью к белку А включают H435R в одной тяжелой цепи и отсутствие мутаций в другой тяжелой цепи. См., например, патент США № 8586713. Каждый из данных документов включен посредством ссылки в данный документ во всей своей полноте.

В конкретных вариантах осуществления можно управлять гетеротетрамеризацией антител посредством применения пар заряженных аминокислот в Fc, что препятствует димеризации тяжелых цепей антитела, таким образом способствуя димеризации тяжелых цепей между одной тяжелой цепью антитела, которая связана с субъединицей TTR, и одной тяжелой цепью антитела, которая не связана с TTR (см. фиг. 1c). Например, ряд мутаций заряженных аминокислот может быть включен в домен C_H3 тяжелой цепи с отрицательно заряженными аминокислотами на одной тяжелой цепи и положительно заряженными аминокислотами на соответствующей тяжелой цепи, или смесью отрицательно и положительно заряженных аминокислот на одной тяжелой цепи с соответствующими им положительно и отрицательно за-

ряженными аминокислотами на соответствующей тяжелой цепи. Иллюстративные отрицательные заряды включают K392D и K409D, а иллюстративные положительные заряды включают E356K и D399K. Поскольку сходные заряды на поверхности контакта C_{H3} отталкиваются, а несходные заряды притягиваются, условия для гомодимеризации благоприятны, а для гетеродимеризации нет. TTR сливается с тяжелой цепью только одного типа заряда (положительного или отрицательного, но не обоих); таким образом, в результате на полное антитело, состоящее из 4 цепей (две легкие цепи, одна неслитая тяжелая цепь и одна слитая с TTR тяжелая цепь), приходится одна субъединица TTR. Дополнительные мутации замены пар заряженных аминокислот обсуждаются, например, в патенте США № 9546203. Мутации с заменой пар заряженных аминокислот, включая D221E, P228E и/или L368E в первой тяжелой цепи и D221R, P228R и/или K409R во второй тяжелой цепи, также описаны, например, в Strop et al., *J. Mol. Biol.*, 420 (2012), pp. 204-219. Каждый из данных документов включен посредством ссылки в данный документ во всей своей полноте.

В гетеротримерных слитых белках TTR (SEQ ID NO: 1) или его вариант также присутствуют в виде тетрамера. Примеры гетеротримерных слитых белков включают белки, содержащие одно антитело и два Fab. В контексте гетеротримеров TTR-антитело C-конец каждой тяжелой цепи антитела может быть связан с N-концом каждой из двух субъединиц TTR, в то время как C-конец каждого из двух Fab связан с N-концом каждой из двух субъединиц TTR с образованием гетеротримера Ab/Fab TTR (см. фиг. 2c и 2d). Таким образом, антитело связано с двумя субъединицами TTR в тетрамере TTR и каждый Fab связан с субъединицей TTR, что приводит к образованию гетеротримера Ab/Fab TTR, содержащего тетрамер TTR, одно антитело и два Fab.

Настоящее изобретение также частично относится к применению TTR в тетрамеризации Fab. В таких гетеротетрамерных слитых белках TTR (SEQ ID NO: 1) или его вариант также присутствуют в виде тетрамера, где каждая субъединица TTR связана с C-концом каждого Fab с образованием гетеротетрамеров TTR-Fab (см. фиг. 2a). Таким образом, каждый Fab связан с одной субъединицей TTR в тетрамере TTR, в результате чего образуется гетеротетрамер TTR-Fab.

Соответственно, настоящее изобретение относится к гетеротримерным и гетеротетрамерным слитым белкам, содержащим три или четыре антигенсвязывающих белка (например, тример Ab/Fab, тетрамер Fab или тетрамер Ab). В некоторых вариантах осуществления гетеротримерные и гетеротетрамерные слитые белки содержат антигенсвязывающие белки, связанные с белковым комплексом. В некоторых вариантах осуществления белковый комплекс представляет собой белковый комплекс на основе TTR, где белковый комплекс на основе TTR представляет собой тетрамер TTR. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок представляет собой антитело. В других вариантах осуществления антигенсвязывающий белок представляет собой Fab. В некоторых вариантах осуществления гетеротетрамерные слитые белки представляют собой смесь антител и Fab.

В конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к гетеротетрамерным слитым белкам, содержащим четыре антитела, связанные с тетрамером TTR. В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к гетеротетрамерным слитым белкам, содержащим четыре Fab, связанные посредством линкера с тетрамером TTR. В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к гетеротримерным слитым белкам, содержащим одно Ab и два Fab, связанные посредством линкера с тетрамером TTR. В некоторых вариантах осуществления антитела или Fab связаны с тетрамером на основе TTR без линкера (т.е. антитела или Fab непосредственно связаны с TTR).

Линкер может представлять собой линкер на основе аминокислот, содержащий 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 или 60 аминокислот. В других вариантах осуществления линкер представляет собой линкер на основе аминокислот, содержащий 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 аминокислот. В других вариантах осуществления линкер представляет собой линкер на основе аминокислот, содержащий 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот. В еще одних вариантах осуществления линкер представляет собой линкер на основе аминокислот, содержащий 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот. В конкретных вариантах осуществления линкер представляет собой G, GG, GGG, GGGG, GGGGG, GGGGGG, GGGGGGG, GGGGGGGG, GGGGGGGGG, или GGGGGGGGGG. В других конкретных вариантах осуществления линкер выбран из перечня, содержащего: GG, GGGG, GGSGG, GGSGGGG и GGAGGGAGGG.

В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой GGGGS, GGGSGGGGS (i.e., (GGGS)₂), GGGSGGGSGGGGS (i.e., (GGGS)₃), GGGSGGGSGGGSGGGGS (i.e., (GGGS)₄), GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (i.e., (GGGS)₅), или GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (i.e., (GGGS)₆). В других вариантах осуществления линкер представляет собой GGGGS, GGGSGGGGS (i.e., (GGGS)₂), GGGSGGGSGGGGS (i.e., (GGGS)₃) или GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (i.e., (GGGS)₄).

Другие подходящие линкеры включают линкер G(G_xB_y)_rG_z, где G представляет собой глицин; B представляет собой любую аминокислоту; x равняется 1-5; y равняется 1-15 и r равняется 1-20. В другом варианте осуществления линкер представляет собой линкер G(G_xB_y)_rG_z, где B представляет собой Q, S, A, E, P, T, K, R, D или N; x равняется 4; y равняется 1; z равняется 4 и r равняется 1.

Дополнительные подходящие аминокислотные линкеры включают, например, дисульфидные связи, $(\text{Gly})_n$ ($n=1-10$), $(\text{EAAAK})_n$ ($n=1-5$), $\text{A}(\text{EAAAK})_4\text{ALEA}(\text{EAAAK})_4\text{A}$, PAPAP , AEAAAKEAAAKA , $(\text{Ala-Pro})_n$ ($n=1-20$), VSQTSKLTRETVFPDV , PLGLWA , RVLAEA , EDVVCCMSY , GGIEGRGS , TRHRQPRGWE , AGNRVRRSVG , RRRRRRRR , GFLG , и LE . Подходящие неаминокислотные линкеры включают полиэтиленгликоль (PEG) и триазинсодержащие фрагменты (содержащиеся в конструкциях, содержащих концевую группу, способную вступать в реакцию с белком; см., например, публикацию РСТ № WO/2017/083604, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

В некоторых вариантах осуществления антитела или Fab связаны с усеченной субъединицей TTR с помощью линкера или без него. Например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот могут быть удалены с N-конца одной или нескольких субъединиц TTR, и антитела или Fab могут быть присоединены к N-концу усеченной субъединицы TTR.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим гетеротримерные и гетеротетрамерные слитые белки, описанные в данном документе. Детали, касающиеся иллюстративных способов получения гетеротримерных и гетеротетрамерных слитых белков, можно найти в разделе "Примеры".

Антигенсвязывающие белки

Любой антигенсвязывающий белок (например, Fab, антитело, scFv, scFab) можно использовать в слитых белках на основе TTR по настоящему изобретению. Кроме того, в слитых белках на основе TTR по настоящему изобретению можно использовать белки, такие как ферменты, в комбинации с антигенсвязывающими белками.

Поскольку слитые белки по настоящему изобретению позволяют связывание разных эпитопов (например на одном и том же или разных белках), слитые белки применимы в контекстах, где имеется преимущество приведения различных мишеней в непосредственную близость. Примеры успешного применения таких методик включают эмицизумаб, который действует посредством приведения в контакт активированного фактора IX и фактора X, таким образом способствуя тому, что процесс свертывания крови продолжается без необходимости замены фактора VIII для лечения гемофилии.

Слитые белки по настоящему изобретению также можно использовать в области онкологии. Например, в зависимости от механизма действия, связанного с онкологической мишенью, может потребоваться перекрестное связывание клеток-мишеней (например раковых клеток) с эффекторными клетками (например Т-клетками). Такие подходы оказались успешными в контексте конструкций на основе антитела ViTE® (биспецифический рекрутер Т-клеток). Другие примеры включают триспецифические молекулы, которые способны связывать два разных опухолевых маркера (например посредством Ab и/или Fab из слитых белков TTR по настоящему изобретению), а также CD3 (например посредством scFv, Ab или Fab к CD3).

Слитые белки по настоящему изобретению могут также способствовать решению проблем, ассоциированных с регуляторной оценкой/одобрением комбинированных средств лечения. Клинические испытания комбинированных средств лечения могут потребовать более сложных стратегий клинических испытаний для оценки безопасности и эффективности, особенно если ни один из отдельных компонентов не был оценен ранее. Слитые белки по настоящему изобретению способствуют решению таких проблем посредством объединения нескольких компонентов в единую конструкцию.

Способы получения гетеродимерных, гетеротримерных и гетеротетрамерных слитых белков на основе TTR

Способы получения гетеромультимерных (например, гетеродимерных, гетеротримерных и гетеротетрамерных) продуктов слияния на основе TTR по настоящему изобретению обсуждаются в разделе "Примеры".

Как правило, гетеромультимерные (например, гетеродимерные, гетеротримерные и гетеротетрамерные) продукты слияния на основе TTR по настоящему изобретению могут быть получены с применением рекомбинантных способов. Соответственно, настоящее изобретение предусматривает полинуклеотиды, кодирующие гетеромультимерные (например, гетеродимерные, гетеротримерные и гетеротетрамерные) продукты слияния на основе TTR. В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид, кодирующий гетеромультимерный (например, гетеродимерный, гетеротримерный и гетеротетрамерный) продукт слияния на основе TTR. В определенных вариантах осуществления векторы экспрессии содержат контрольные последовательности (например, промоторы, энхансеры), которые функционально связаны с полинуклеотидом, кодирующим гетеромультимерный (например, гетеродимерный, гетеротримерный и гетеротетрамерный) продукт слияния на основе TTR, чтобы поддерживать экспрессию в подходящей клетке-хозяине. В определенных вариантах осуществления вектор экспрессии также содержит полинуклеотидные последовательности, которые обеспечивают независимую от хромосомы репликацию в клетке-хозяине. Иллюстративные векторы включают без ограничения плазмиды, космиды и YACS. В конкретном варианте осуществления вектор представляет собой pTT5.

Как правило, клетки-хозяева млекопитающих используются при получении гетеродимерных, гетеротримерных или гетеротетрамерных слитых конструкций на основе TTR. Клетки-хозяева млекопитаю-

ших также пригодны для получения слитых конструкций Fab-TTR, хотя также могут использоваться клетки, отличные от клеток млекопитающих, такие как прокариотические (бактерии) клетки-хозяева и клетки-хозяева, отличные от клеток млекопитающих (например дрожжи).

В еще одном аспекте настоящее изобретение включает клетку-хозяина, содержащую вектор экспрессии по настоящему изобретению. Способы трансфекции клеток-хозяев вектором экспрессии и культивирования трансфицированных клеток-хозяев в условиях, подходящих для экспрессии гетеромультимерных (например, гетеродимерных, гетеротримерных и гетеротетрамерных) продуктов слияния на основе TTR, известны из уровня техники. Используемая процедура трансфекции может зависеть от хозяина, подлежащего трансформации. Некоторые способы введения гетерологичных полинуклеотидов в клетки млекопитающих известны из уровня техники и включают без ограничения декстранопосредованную трансфекцию, осаждение фосфатом кальция, полибрен-опосредованную трансфекцию, слияние протопластов, электропорацию, инкапсуляцию полинуклеотида(ов) в липосомах и прямую микроинъекцию ДНК в ядра. Определенные линии клеток млекопитающих, доступные в качестве хозяев для экспрессии, известны из уровня техники и включают без ограничения многие иммортализованные линии клеток, доступные из Американской коллекции типовых культур (АТСС), в том числе без ограничения клетки яичника китайского хомячка (СНО; например СНО-K1), клетки линии E5, клетки почки детеныша хомяка (ВНК), клетки почки обезьяны (COS), клетки гепатоклеточной карциномы человека (например, Нер G2), клетки эмбриональной почки человека 293 (НЕК 293) и ряд других линий клеток. В определенных вариантах осуществления линии клеток могут быть выбраны посредством определения того, какие линии клеток характеризуются высокими уровнями экспрессии и продуцируют гетеродимерные, гетеротримерные и гетеротетрамерные продукты слияния на основе TTR.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к способам получения гетеромультимерных (например, гетеродимерных, гетеротримерных и гетеротетрамерных) слитых белков на основе TTR, описанных в данном документе. Например, гетеромультимерные (например, гетеродимерные, гетеротримерные и гетеротетрамерные) слитые белки на основе TTR могут быть получены посредством:

а) культивирования рекомбинантной клетки-хозяина, содержащей полинуклеотид, кодирующий гетеромультимерный (например, гетеродимерный, гетеротримерный и гетеротетрамерный) продукт слияния на основе TTR, и

б) выделения гетеромультимерного (например, гетеродимерного, гетеротримерного и гетеротетрамерного) слитого белка на основе TTR из указанной культуры.

Фармацевтические композиции

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает фармацевтическую композицию, содержащую терапевтически эффективное количество одного или нескольких гетеромультимерных (например, гетеродимерных, гетеротримерных и гетеротетрамерных) слитых белков на основе TTR по настоящему изобретению вместе с фармацевтически эффективным разбавителем, носителем, солюбилизатором, эмульгатором, консервантом и/или адьювантом. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению включают без ограничения жидкие, замороженные и лиофилизированные композиции.

Предпочтительно материалы для составления являются нетоксичными для реципиентов при используемых дозировках и концентрациях. В конкретных вариантах осуществления предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие терапевтически эффективное количество гетеромультимерных (например, гетеродимерных, гетеротримерных и гетеротетрамерных) слитых белков на основе TTR.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать материалы для составления, предназначенные для модифицирования, поддержания или сохранения, например, рН, осмолярности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, адсорбции или проникающей способности композиции. В таких вариантах осуществления подходящие материалы для составления включают без ограничения аминокислоты (такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин, пролин или лизин); противомикробные вещества; антиоксиданты (такие как аскорбиновая кислота, сульфит натрия или гидросульфит натрия); буферы (такие как боратный, бикарбонатный, Tris-HCl, цитратные, фосфатные буферы или буферы на основе других органических кислот); объемобразующие средства (такие как маннит или глицин); хелатирующие средства (такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA)); комплексообразующие средства (такие как кофеин, поливинилпирролидон, бета-циклодекстрин или гидроксипропил-бета-циклодекстрин); наполнители; моносахариды; дисахариды и другие углеводы (такие как глюкоза, манноза или декстрины); белки (такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины); окрашивающие, ароматизирующие и разбавляющие средства; эмульгирующие средства, гидрофильные полимеры (такие как поливинилпирролидон); низкомолекулярные полипептиды; солеобразующие противоионы (такие как ион натрия); консерванты (такие как хлорид бензалкония, бензойная кислота, салициловая кислота, тимеросал, фенолиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновая кислота или пероксид водорода); растворители (такие как глицерин, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль); сахарные спирты (такие как маннит или сорбит); суспендирующие средства; поверхностно-активные вещества или смачивающие средства (такие как Pluronic, PEG, сложные эфиры сорбита, поли-

сорбаты, такие как полисорбат 20, полисорбат, тринитротолуол, трометамин, лецитин, холестерин, тилоксапол); средства, увеличивающие стабильность (такие как сахароза или сорбит); средства, повышающие тоничность (такие как галогениды щелочных металлов, предпочтительно хлорид натрия или калия, маннит, сорбит); среды-носители для доставки; разбавители; вспомогательные вещества и/или фармацевтические адьюванты. См., REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition, (A. R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company.

В определенных вариантах осуществления оптимальную фармацевтическую композицию будет определять специалист в данной области техники в зависимости, например, от предполагаемого пути введения, формата доставки и требуемой дозировки. См., например, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, выше. В определенных вариантах осуществления такие композиции могут влиять на физическое состояние, стабильность, скорость высвобождения *in vivo* и скорость клиренса *in vivo* антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления первичные среда-носитель или носитель в фармацевтической композиции могут быть либо водными, либо неводными по своей природе. Например, подходящей средой-носителем или носителем может быть вода для инъекций, физиологический солевой раствор или искусственная спинномозговая жидкость, возможно, дополненные другими веществами, общепринятыми для композиций для парентерального введения. Нейтральный забуференный солевой раствор или солевой раствор, смешанный с сывороточным альбумином, представляют собой дополнительные иллюстративные среды-носители. В конкретных вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат Tris-буфер со значением pH, составляющим приблизительно 7,0-8,5, или ацетатный буфер со значением pH, составляющим приблизительно 4,0-5,5, и могут дополнительно содержать сорбит или его подходящий заменитель. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения композиции на основе гетеромультимеров TTR (например, гетеродимеров, гетеротримеров и гетеротетрамеров), могут быть получены для хранения посредством смешивания выбранной композиции, характеризующейся требуемой степенью чистоты, с необязательными средствами для составления (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, выше) в форме лиофилизированного осадка или водного раствора. Кроме того, в определенных вариантах осуществления гетеромультимер TTR (например, гетеродимер, гетеротример и гетеротетрамер) может быть составлен в виде лиофилизата с применением соответствующих вспомогательных веществ, таких как сахароза.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть выбраны для парентеральной доставки. В качестве альтернативы могут быть выбраны композиции для ингаляции или для доставки через пищеварительный тракт, например, перорально. Получение таких фармацевтически приемлемых композиций находится в пределах компетентности в данной области техники. Компоненты состава предпочтительно присутствуют в концентрациях, которые приемлемы для места введения. В определенных вариантах осуществления для поддержания композиции при физиологическом pH или при немного более низком значении pH, как правило, pH в диапазоне от приблизительно 5 до приблизительно 8, применяются буферы.

Если предполагается парентеральное введение, то терапевтические композиции для применения в настоящем изобретении могут быть предусмотрены в форме апиrogenного приемлемого для парентерального введения водного раствора, содержащего требуемый гетеромультимер TTR (например, гетеродимер, гетеротример и гетеротетрамер) в фармацевтически приемлемой среде-носителе. Особенно подходящей средой-носителем для парентеральной инъекции является стерильная дистиллированная вода, в которой гетеромультимер TTR (например, гетеродимер, гетеротример и гетеротетрамер) составлен в виде стерильного изотонического раствора, который хранится должным образом. В определенных вариантах осуществления получение может предусматривать составление требуемой молекулы со средством, таким как инъецируемые микросферы, биоразлагаемые частицы, полимерные соединения (такие как полимолочная кислота или полигликолевая кислота), гранулы или липосомы, которые могут обеспечивать контролируемое или замедленное высвобождение продукта, который может доставляться посредством депо-инъекции. В определенных вариантах осуществления также может применяться гиалуроновая кислота, обладающая эффектом содействия продленному пребыванию в кровотоке. В определенных вариантах осуществления для введения требуемого антигенсвязывающего белка могут применяться имплантируемые устройства для доставки лекарственного средства.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть составлены для ингаляции. В этих вариантах осуществления гетеромультимер TTR (например, гетеродимер, гетеротример и гетеротетрамер) преимущественно составляется в виде сухого порошка для ингаляции. В конкретных вариантах осуществления растворы гетеромультимера TTR (например, гетеродимера, гетеротримера и гетеротетрамера) для ингаляции также могут быть составлены с пропеллентом для аэрозольной доставки. В определенных вариантах осуществления растворы могут распыляться. В силу этого ингаляционное введение и способы составления дополнительно описаны в международной патентной заявке № PCT/US94/001875, которая включена посредством ссылки и описывает легочную доставку химически модифицированных белков.

Также предусматривается, что составы можно вводить перорально. Гетеромультимер TTR (например, гетеродимер, гетеротример и гетеротетрамер) вводится таким образом, что он может быть составлен

с носителями, которые обычно используются в составлении твердых лекарственных форм, таких как таблетки и капсулы, или без них. В определенных вариантах осуществления капсула может быть разработана для высвобождения активной части состава в таком месте желудочно-кишечного тракта, в котором биологическая доступность максимальна, а предварительное системное разрушение минимально. Для облегчения абсорбции гетеромультимера TTR (например, гетеродимера, гетеротримера и гетеротетрамера) могут быть включены дополнительные средства. Также могут использоваться разбавители, ароматизаторы, легкоплавкие воски, растительные масла, смазывающие вещества, суспендирующие вещества, вещества для улучшения распадаемости таблеток и связывающие вещества.

Специалистам в данной области техники будут очевидны дополнительные фармацевтические композиции, включая составы, содержащие гетеромультимер TTR (например, гетеродимер, гетеротример и гетеротетрамер), в виде составов, обеспечивающих замедленную или контролируемую доставку. Также специалистам в данной области техники известны методики составления целого ряда других средств для замедленной или контролируемой доставки, таких как липосомные носители, биоразлагаемые микрочастицы или пористые гранулы и депо-инъекции. См., например, международную патентную заявку № PCT/US93/00829, которая включена посредством ссылки и описывает контролируемое высвобождение пористых полимерных микрочастиц для доставки фармацевтических композиций. Препараты с замедленным высвобождением могут включать полупроницаемые полимерные матрицы в виде формованных изделий, например, пленок или микрокапсул. Матрицы с замедленным высвобождением могут включать сложные полиэфиры, гидрогели, полилактиды (раскрытые в патенте США № 3773919 и публикации заявки на европейский патент № EP 058481, каждый из которых включен посредством ссылки), сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма-этил-L-глутамата (Sidman et al., 1983, *Biopolymers* 2:547-556), поли(2-гидроксиэтилметакрилат) (Langer et al., 1981, *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277 и Langer, 1982, *Chem. Tech.* 12:98-105), этиленвинилацетат (Langer et al., 1981, см. выше) или поли-D(-)-3-гидроксимасляную кислоту (публикация заявки на европейский патент № EP 133988). Композиции с замедленным высвобождением могут также включать липосомы, которые могут быть получены с помощью любого из нескольких способов, известных из уровня техники. См., например, Eppstein et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:3688-3692; публикации заявок на европейский патент №№ EP 036676; EP 088046 и EP 143949, включенные посредством ссылки.

Фармацевтические композиции, применяемые для введения *in vivo*, как правило, предусмотрены в виде стерильных препаратов. Стерилизация может быть достигнута посредством фильтрации через мембраны для стерильной фильтрации. Если композицию лиофилизируют, стерилизацию с помощью данного способа можно выполнять либо перед лиофилизацией и восстановлением, либо после них. Композиции для парентерального введения могут храниться в лиофилизованной форме или в виде раствора. Обычно композиции для парентерального введения помещают в контейнер, имеющий стерильное входное отверстие, например, пакет или флакон для внутривенного раствора с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций.

Аспекты настоящего изобретения включают составы на основе самобуферизирующегося гетеромультимера TTR (например, гетеродимера, гетеротримера и гетеротетрамера), которые можно использовать в качестве фармацевтических композиций, как описано в международной патентной заявке WO 06138181A2 (PCT/US 2006/022599), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Как обсуждалось выше, в определенных вариантах осуществления предусмотрены композиции на основе гетеромультимера TTR (например, гетеродимера, гетеротримера и гетеротетрамера), в частности фармацевтические композиции на основе гетеромультимера TTR (например, гетеродимера, гетеротримера и гетеротетрамера), которые содержат, помимо гетеромультимера, одно или несколько вспомогательных веществ, таких как вспомогательные вещества, которые в иллюстративных целях описаны в данном разделе и в других разделах данного документа. В этом отношении в настоящем изобретении могут быть использованы вспомогательные вещества для широкого круга целей, таких как регулирование физических, химических или биологических свойств составов, таких как регулирование вязкости, и/или процессов по настоящему изобретению для повышения эффективности и/или стабилизации таких составов и процессов в отношении разрушения и порчи, например, из-за стрессов, возникающих во время изготовления, доставки, хранения, подготовки к применению, введения и после него.

Разнообразные объяснения доступны в отношении стабилизации белка и материалов для составления и способов, пригодных в этом отношении, такие как Arakawa et al., "Solvent interactions in pharmaceutical formulations", *Pharm Res.* 8(3): 285-91 (1991); Kendrick et al., "Physical stabilization of proteins in aqueous solution", в *RATIONAL DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS: THEORY AND PRACTICE*, Carpenter and Manning, eds. *Pharmaceutical Biotechnology.* 13: 61-84 (2002) и Randolph et al., "Surfactant-protein interactions", *Pharm Biotechnol.* 13: 159-75 (2002), каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, особенно в частях, относящихся к вспомогательным веществам и способам, относящимся к ним же, для составов на основе самобуферизирующегося белка в соответствии с настоящим изобретением, особенно в отношении белковых фармацевтических продуктов и способов для применения на животных и/или людях.

Соли могут быть использованы в соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения для, например, регулирования ионной силы и/или изотоничности состава и/или улучшения растворимости и/или физической стабильности белка или другого ингредиента композиции в соответствии с настоящим изобретением.

Как хорошо известно, ионы могут стабилизировать нативное состояние белков, связываясь с заряженными остатками на поверхности белка и экранируя заряженные и полярные группы в белке и уменьшая силу их электростатических взаимодействий, притягивающих и отталкивающих взаимодействий. Ионы также могут стабилизировать денатурированное состояние белка путем связывания, в частности, денатурированных пептидных связей ($--CONH$) белка. Кроме того, ионное взаимодействие с заряженными и полярными группами в белке также может уменьшить межмолекулярные электростатические взаимодействия и, таким образом, предотвратить или уменьшить агрегацию и нерастворимость белка.

Ионные виды значительно различаются по своему воздействию на белки. Был разработан ряд категориальных ранжирований ионов и их эффектов в отношении белков, которые можно использовать при составлении фармацевтических композиций в соответствии с настоящим изобретением. Одним из примеров является ряд Хофмайстера, который ранжирует ионные и полярные растворенные вещества по их влиянию на конформационную стабильность белков в растворе. Стабилизирующие растворенные вещества называются "космотропными". Дестабилизирующие растворенные вещества называются "хаотропными". Космотропы обычно используются в высоких концентрациях (например, >1 моль/л сульфата аммония) для осаждения белков из раствора ("высаливание"). Хаотропы обычно используются для денатурирования и/или для растворения белков ("всаливание"). Относительная эффективность ионов в отношении "всаливания" и "высаливания" определяет их положение в ряду Хофмайстера.

Свободные аминокислоты можно использовать в составах на основе гетеромультимера TTR (например, гетеродимера, гетеротримера и гетеротетрамера) согласно различным вариантам осуществления настоящего изобретения в качестве объемобразующих средств, стабилизаторов и антиоксидантов, а также для других стандартных путей применения. Лизин, пролин, серин и аланин могут быть использованы для стабилизации белков в составе. Глицин пригоден при лиофилизации для обеспечения правильной структуры и свойств таблетки. Аргинин может быть пригоден для ингибирования агрегации белка как в жидких, так и в лиофилизированных составах. Метионин пригоден в качестве антиоксиданта.

Полиолы включают сахара, например маннит, сахарозу и сорбит, и многоатомные спирты, такие как, например, глицерин и пропиленгликоль, и для обсуждаемых в данном документе целей полиэтиленгликоль (PEG) и родственные вещества. Полиолы являются космотропными. Они представляют собой пригодные стабилизирующие средства как в жидких, так и в лиофилизированных составах для защиты белков от физических и химических процессов разрушения. Полиолы также пригодны для регулирования тоничности составов.

В число полиолов, пригодных в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, входит маннит, обычно применяемый для обеспечения структурной стабильности таблетки в лиофилизированных составах. Он обеспечивает структурную стабильность таблетки. Обычно его применяют с лиопротектором, например сахарозой. Сорбитол и сахароза являются одними из предпочтительных средств для регулирования тоничности и в качестве стабилизаторов для защиты от видов стресса, обусловленных замораживанием-размораживанием, во время транспортировки или получении нерасфасованного продукта в процессе изготовления. Восстанавливающие сахара (которые содержат свободные альдегидные или кетонные группы), такие как глюкоза и лактоза, могут гликировать поверхностные остатки лизина и аргинина. Следовательно, они обычно не входят в число предпочтительных полиолов для использования в соответствии с настоящим изобретением. Кроме того, сахара, которые образуют такие реакционноспособные вещества, такие как сахароза, которая гидролизует до фруктозы и глюкозы в кислых условиях и, следовательно, вызывает гликирование, также не входят в число предпочтительных полиолов по настоящему изобретению в этом отношении. PEG пригоден для стабилизации белков и в качестве криопротектора и может быть использован в настоящем изобретении в этом отношении.

Варианты осуществления составов на основе гетеромультимера TTR (например, гетеродимера, гетеротримера и гетеротетрамера) дополнительно включают поверхностно-активные вещества. Молекулы белка могут быть подвержены адсорбции на поверхностях и денатурации и последующей агрегации на границах раздела воздух-жидкость, твердое вещество-жидкость и жидкость-жидкость. Эти эффекты обычно повышаются обратно пропорционально концентрации белка. Эти вредные взаимодействия обычно повышаются обратно пропорционально концентрации белка и обычно усугубляются физическим перемешиванием, например, возникающим при транспортировке и обращении с продуктом.

Поверхностно-активные вещества обычно используются для предотвращения, минимизации или уменьшения поверхностной адсорбции. Подходящие поверхностно-активные вещества в настоящем изобретении в этом отношении включают полисорбат 20, полисорбат 80, другие полиэтоксилатные сложные эфиры сорбита и жирных кислот и полочсамер 188.

Поверхностно-активные вещества также обычно используются для контроля конформационной стабильности белка. Применение поверхностно-активных веществ в этом отношении является специфичным для белка, поскольку любое данное поверхностно-активное вещество обычно стабилизирует

некоторые белки и дестабилизирует другие.

Полисорбаты чувствительны к окислительному разрушению и часто при поставке содержат достаточное количество пероксидов, чтобы вызвать окисление боковых цепей белковых остатков, особенно метионина. Следовательно, полисорбаты следует использовать осторожно, а при их использовании следует применять их в наименьшей эффективной концентрации. В этом отношении полисорбаты служат примером общего правила, согласно которому вспомогательные вещества следует использовать в их наименьших эффективных концентрациях.

Варианты осуществления составов на основе гетеромультимера TTR (например, гетеродимера, гетеротримера и гетеротетрамера) дополнительно включают один или несколько антиоксидантов. В некоторой степени вредное окисление белков может быть предотвращено в фармацевтических составах путем поддержания надлежащих уровней кислорода и температуры окружающей среды и путем избегания воздействия света. Антиоксидантные вспомогательные вещества также могут быть использованы для предотвращения окислительного разрушения белков. К числу пригодных антиоксидантов в этом отношении относятся восстанавливающие средства, поглотители кислорода/свободных радикалов и хелатирующие средства. Антиоксиданты для применения в терапевтических белковых составах в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно являются водорастворимыми и сохраняют свою активность в течение всего срока годности продукта. EDTA является предпочтительным антиоксидантом в соответствии с настоящим изобретением в этом отношении.

Антиоксиданты могут повредить белки. Например, восстановители, в частности такие как глутатион, могут нарушать внутримолекулярные дисульфидные связи. Таким образом, антиоксиданты для применения в настоящем изобретении выбраны, среди прочего, для устранения или достаточного уменьшения возможности повреждения ими белков в составе.

Составы в соответствии с настоящим изобретением могут включать ионы металлов, которые являются кофакторами белка и которые необходимы для образования белковых координационных комплексов, такие как цинк, необходимый для образования определенных суспензий инсулина. Ионы металлов также могут ингибировать некоторые процессы, которые разрушают белки. Однако ионы металлов также катализируют физические и химические процессы, которые разрушают белки.

Ионы магния (10-120 мМ) могут быть использованы для ингибирования изомеризации аспарагиновой кислоты в изоаспарагиновую кислоту. Ионы Ca^{+2} (не более 100 мМ) могут повысить стабильность дезоксирибонуклеазы человека. Однако Mg^{+2} , Mn^{+2} и Zn^{+2} могут дестабилизировать rhDNase. Аналогично, Ca^{+2} и Sr^{+2} могут стабилизировать фактор VIII, он может быть дестабилизирован Mg^{+2} , Mn^{+2} и Zn^{+2} , Cu^{+2} и Fe^{+2} , а его агрегация может быть повышена ионами Al^{+3} .

Варианты осуществления составов на основе гетеромультимера TTR (например, гетеродимера, гетеротримера и гетеротетрамера) дополнительно включают один или несколько консервантов. Консерванты необходимы для разработки многодозовых составов для парентерального введения, которые предусматривают более одного извлечения из одного и того же контейнера. Их основная функция заключается в ингибировании роста микроорганизмов и обеспечении стерильности продукта на протяжении всего срока годности при хранении или срока применения лекарственного продукта. Широко применяемые консерванты включают бензиловый спирт, фенол и м-крезол. Хотя консерванты имеют долгую историю применения с низкомолекулярными парентеральными препаратами, разработка белковых составов, включающих консерванты, может быть сложной задачей. Консерванты почти всегда оказывают дестабилизирующий эффект в отношении белков (агрегация), и это стало основным фактором ограничения их применения в многодозовых белковых составах. На сегодняшний день большинство белковых лекарственных средств составлялись только для однократного применения. Однако, если возможно получить многодозовые составы, они имеют дополнительное преимущество, заключающееся в обеспечении удобства для пациентов и увеличении рыночной привлекательности. Хорошим примером является гормон роста человека (hGH), в случае с которым разработка составов с добавлением консервантов привела к появлению на рынке более удобных форм выпуска в виде многодозовых шприцев-ручек для инъекций. В настоящее время на рынке доступны по меньшей мере четыре таких устройства в виде шприцев-ручек, содержащих составы на основе hGH с добавлением консервантов. Norditropin (жидкость, Novo Nordisk), Nutropin AQ (жидкость, Genentech) и Genotropin (лиофилизированный--двухкамерный картридж, Pharmacia & Upjohn) содержат фенол, в то время как Somatropе (Eli Lilly) содержит м-крезол.

При составлении и разработке лекарственных форм с добавлением консервантов необходимо учитывать несколько аспектов. Эффективная концентрация консерванта в лекарственном продукте должна быть оптимизирована. Для этого необходимо провести тестирование данного консерванта в лекарственной форме в диапазонах концентраций, которые обеспечивают противомикробную эффективность без нарушения стабильности белка.

Как и предполагалось, разработка жидких составов, содержащих консерванты, является более сложной задачей, чем разработка лиофилизированных составов. Высушенные посредством сублимации продукты можно лиофилизировать без консерванта и восстанавливать с помощью разбавителя, содержащего консервант, в момент применения. Это сокращает время, в течение которого консервант контактирует с белком, значительно минимизируя связанные с этим риски для стабильности. При применении

жидких составов эффективность и стабильность консерванта должны поддерживаться в течение всего срока годности продукта (например, приблизительно 18-24 месяца). Важно отметить, что эффективность консерванта должна быть продемонстрирована в конечном составе, содержащем активное лекарственное средство и все вспомогательные компоненты.

Составы на основе гетеромультимера TTR (например, гетеродимера, гетеротримера и гетеротетрамера), как правило, будут разрабатываться для конкретных путей и способов введения, для конкретных вводимых доз и частоты введения, для конкретных средств лечения конкретных заболеваний, с определенными диапазонами биодоступности и способности сохранения в организме, помимо прочего. Таким образом, составы могут быть разработаны в соответствии с настоящим изобретением для доставки любым подходящим путем, включая без ограничения пероральный, ушной, глазной, ректальный и вагинальный, и парентеральный пути, включая внутривенную и внутриартериальную инъекцию, внутримышечную инъекцию и подкожную инъекцию.

После того, как фармацевтическая композиция была составлена, ее можно хранить в стерильных флаконах в виде раствора, суспензии, геля, эмульсии, твердого вещества, кристалла или в виде обезвоженного или лиофилизированного порошка. Такие составы можно хранить либо в готовой к применению форме, либо в форме (например, лиофилизированной), которую восстанавливают перед введением. Настоящее изобретение также предусматривает наборы для получения единицы введения в виде однократной дозы. Каждый набор по настоящему изобретению может содержать как первый контейнер с сухим белком, так и второй контейнер с водным составом. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены наборы, содержащие одно- и многокамерные предварительно заполненные шприцы (например, шприцы с жидким содержимым и шприцы с лиофилизатом).

Терапевтически эффективное количество подлежащей применению фармацевтической композиции, содержащей гетеромультимер TTR (например, гетеродимер, гетеротример и гетеротетрамер), будет зависеть, например, от терапевтического контекста и целей. Специалист в данной области техники будет принимать во внимание, что соответствующие уровни доз для лечения отчасти будут варьироваться в зависимости от доставляемой молекулы, показания, при котором используется гетеромультимер TTR (например, гетеродимер, гетеротример и гетеротетрамер), пути введения и размера (вес тела, площадь поверхности тела или размер органа) и/или состояния (возраст и общее состояние здоровья) пациента. В определенных вариантах осуществления клиницист может подбирать дозировку и модифицировать путь введения для получения оптимального терапевтического эффекта. Типичная дозировка может варьироваться от приблизительно 0,1 мг/кг до не более приблизительно 30 мг/кг или больше, в зависимости от факторов, упомянутых выше. В конкретных вариантах осуществления дозировка может варьироваться от 1,0 мг/кг до не более приблизительно 20 мг/кг, необязательно от 10 мг/кг до не более приблизительно 10 мг/кг или от 100 мг/кг до не более приблизительно 5 мг/кг.

Терапевтически эффективное количество гетеромультимера TTR (например, гетеродимера, гетеротримера и гетеротетрамера) предпочтительно приводит к снижению тяжести симптомов заболевания, повышению частоты или длительности бессимптомных периодов или предупреждению нарушения или недееспособности вследствие поражения заболеванием.

Фармацевтические композиции могут вводиться с использованием медицинского устройства. Примеры устройств медицинского назначения для введения фармацевтических композиций описаны в патентах США №№ 4475196; 4439196; 4447224; 4447233; 4486194; 4487603; 4596556; 4790824; 4941880; 5064413; 5312335; 5312335; 5383851 и 5399163, все из которых включены в данный документ посредством ссылки.

Пути терапевтического применения гетеродимерных, гетеротримерных и гетеротетрамерных слитых белков на основе TTR

Как проиллюстрировано в разделе "Примеры", было обнаружено, что полиспецифические слитые белки на основе TTR по настоящему изобретению способны связывать два или более эпитопов на одном или нескольких белках. Такие полиспецифические продукты слияния на основе TTR особенно применимы в связи с тем, что они способны активировать несколько биологических сигнальных путей, что позволяет более эффективно лечить заболевания (например рак) по сравнению с традиционными способами лечения.

Полиспецифические слитые белки на основе TTR по настоящему изобретению характеризуются преимуществами по сравнению со многими известными биспецифическими/полиспецифическими подходами. Например, настоящее изобретение предусматривает бивалентное биспецифическое представление антигенсвязывающих доменов, которое снижает или устраняет потерю avidности по сравнению, например, с конструкциями на основе гетеро-IgG. Дополнительные преимущества по сравнению с конструкциями на основе гетеро-IgG заключаются в том, что полиспецифические слитые белки на основе TTR по настоящему изобретению могут быть получены без необходимости в мутациях с заменой пар заряженных аминокислот в Fc (СРМ), которые необходимы для управления гетеродимеризацией тяжелых цепей в конструкциях на основе гетеро-IgG, а также снижения или устранения нежелательных побочных продуктов, таких как продукты неверного спаривания полуантител и легких цепей (присутствующих в конструкциях на основе гетеро-IgG и IgG-Fab). Действительно, слитые белки на основе TTR по настоя-

шему изобретению в значительной степени (а в некоторых случаях и полностью) снижают необходимость в конструировании Ab или Fab, необходимым в случае других конструкций.

По сравнению с конструкциями IgG-Fab и IgG-scFv антигенсвязывающие домены слитых белков на основе TTR по настоящему изобретению оптимально ориентированы таким образом, что N-концевые антигенсвязывающие области находятся на поверхности, и потеря аффинности, вызванная стерическими факторами, снижается или устраняется.

Другое преимущество слитых белков на основе TTR по настоящему изобретению связано с применением нативных форматов IgG, которые способствуют снижению потери аффинности и повышению склонности к агрегации, наблюдаемой при преобразовании mAb в конструкции scFv. Gil and Schrum, *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 4:73-84 (2013).

Кроме того, поскольку слитые белки на основе TTR по настоящему изобретению позволяют эффективно включать множество антигенсвязывающих доменов, доступно быстрое сканирование беспеспецифических (или полиспецифических) комбинаций.

Гетеромультимерные (например, гетеродимерные, гетеротримерные и гетеротетрамерные) слитые белки на основе TTR также демонстрируют улучшенную кластеризацию антигенов по сравнению с отдельным антителом(антителами) и/или Fab. Когда антитела (например, антитела IgG) связывают антигены на клетках-мишенях (например, опухолевых клетках), полученные в результате кластерные домены Fc взаимодействуют с Fc γ R, обнаруженными на иммунных эффекторных клетках, таких как NK-клетки и макрофаги. Эта кластеризация облегчает передачу сигнала посредством Fc γ R, что приводит к инициации клеточноопосредованных эффекторных функций, таких как антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC) и антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP). Таким образом, гетеромультимерные (например, гетеродимерные, гетеротримерные и гетеротетрамерные) слитые белки на основе TTR особенно применимы при нацеливании на лиганды, где высокая аффинность/авидность антитела или Fab приводит к усилению биологического эффекта. Усиление клеточноопосредованных эффекторных функций с помощью гетеромультимерных (например, гетеродимерных, гетеротримерных и гетеротетрамерных) конструкций на основе TTR по настоящему изобретению приводит к повышению способности уничтожать клетки, что применимо, например, в лечении рака.

Соответственно, настоящее изобретение также относится к способам лечения рака с применением гетеродимерных слитых белков и гетеротетрамерных слитых белков, описанных в данном документе.

В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению гетеродимерных слитых белков и гетеротетрамерных слитых белков, описанных в данном документе, в лечении рака.

В еще одних вариантах осуществления настоящее изобретение относится к гетеродимерным слитым белкам и гетеротетрамерным слитым белкам, описанным в данном документе, для применения в лечении рака.

Примеры

Следующие примеры приведены с целью иллюстрации конкретных вариантов осуществления или признаков настоящего изобретения и не предназначены для ограничения его объема.

Пример 1. Общие методики

В примере 1 описаны общие методики, которые были использованы для получения и определения характеристик отрицательно заряженных и положительно заряженных конструкций на основе TTR, обсуждаемых в оставшейся части раздела "Примеры".

Следующие методики использовали для получения отрицательно заряженных и положительно заряженных конструкций на основе TTR, содержащих варианты TTR с одной мутацией в области контакта димер/димер TTR ("C10A/K15A/XX") на субъединицу TTR

Клонирование отрицательно заряженных и положительно заряженных вариантов TTR в *E. coli*

Конструкцию C37979 из реестра крупных молекул Amgen (pAMG21: huTTR (opt-C10A, K15A)) использовали в качестве матрицы для всех отрицательно заряженных и положительно заряженных вариантов TTR (содержащих C10A/K15A/XX). Отрицательно заряженные и положительно заряженные варианты TTR получали с применением стандартных методик молекулярной биологии, включая полимеразную цепную реакцию (ПЦР), сайт-направленный ПЦР-мутагенез, расщепление эндонуклеазами рестрикции и ферментативное лигирование с бактериальными плазмидами экспрессии. Также получали отрицательно заряженные и положительно заряженные варианты TTR, содержащие MKN6GG на N-конце TTR.

Методики, как правило, выполняли согласно способам, которые могут быть упомянуты в *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Sambrook et al., 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Экспрессия отрицательно заряженных и положительно заряженных вариантов TTR в *E. coli*

Клетки BL21, содержащие вектор pAMG21, кодирующий отрицательный и положительно заряженный варианты TTR, выращивали в течение ночи при 30-37°C в объеме Terrific Broth (Teknova T7060), составляющем 50 мл, с 20 мкг/мл канамицина во встряхиваемой колбе объемом 250 мл с дефлектором. На следующий день 35 мл полученной в течение ночи культуры добавляли к 1 л Terrific Broth с 20 мкг/мл канамицина и 50 мкл пеногасителя Sigma Y-30 и инкубировали при 33°C до тех пор, пока OD при

600 нм не достигла значения 0,4. 1 мл аутоиндуктора N-(бета-кетокaproил)-DL-гомосеринлактона Sigma K-3255 (исходный раствор, растворенный в этаноле) добавляли к культуре, которую выдерживали для экспрессии в течение четырех часов при 30-33°C.

Очистка отрицательно заряженных и положительно заряженных вариантов TTR из E. coli

Пасту из замороженных клеток E. coli гомогенизировали в растворе с соотношением 1:10 вес/объем 50 мМ Na-фосфата, 300 мМ NaCl, pH 8,0, с применением портативного гомогенизатора Omni TH (Omni International, Кеннесо, Джорджия, США). Полученную суспензию затем два раза обрабатывали с помощью микрофлюидизатора M-110S (Microfluidics Corporation, Ирвайн, Калифорния, США) при 13800 фунтах/кв. дюйм. Затем лизат центрифугировали при 22000 RCF в течение 1 ч при 4°C. Растворимую фракцию фильтровали через фильтр из ацетата целлюлозы с размером пор 0,45 мкм (Corning Life Sciences, Тьюксбери, Массачусетс, США) и оставляли в качестве исходного материала для очистки посредством FPLC; нерастворимую фракцию утилизировали как отходы.

Колонку Ni-NTA SuperFlow объемом 5 мл (Qiagen, Хильден, Германия), соединенную с KTApurifier (GE Healthcare Bio-Sciences, Мальборо, Массачусетс, США) FPLC, уравнивали 5 объемами колонки (CV) 50 мМ Na-фосфата, 300 мМ NaCl, 10 мМ имидазола, pH 8,0, перед нанесением образца. Отфильтрованный растворимый лизат вводили в колонку, промывали с помощью 15 CV 50 мМ Na-фосфата, 300 мМ NaCl, 10 мМ имидазола, pH 8,0, и постадийно элюировали с помощью 10 CV 50 мМ Na-фосфата, 300 мМ NaCl, 250 мМ имидазола, pH 8,0.

Пул после очистки концентрировали с применением центробежного фильтра VivaSpin с MWCO, составляющей 10 кДа (Sartorius AG, Геттинген, Германия), центрифугировали при 3000 RCF до достижения требуемого объема.

Концентрированный образец подвергали диализу против 10 мМ tris-HCl, pH 8,0, 150 мМ NaCl с применением картриджа для диализа Slide-a-lyzer с MWCO, составляющей 10 кДа (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США), до тех пор, пока расчетное содержание исходного буфера не стало ниже 1%.

РС-аналитика отрицательно заряженных и положительно заряженных вариантов TTR (E. coli)

Количественный анализ белка выполняли посредством измерения УФ-поглощения при 280 нм с применением Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific).

Анализ посредством SDS-PAGE в невозобновляющих условиях выполняли с нагреванием и без нагревания образца. В обоих случаях образец обрабатывали буфером для образцов для SDS-PAGE и проводили SDS-PAGE в 4-20% Tris-Gly (Thermo Fisher Scientific) согласно протоколу производителя. В эксперименте с нагреванием образец и раствор буфера для образцов нагревали при 85°C в течение 5 мин, затем загружали в гель; ненагретый образец загружали непосредственно в гель после добавления буфера для образцов. Гель окрашивали с применением SimplyBlue SafeStain (Thermo Fisher Scientific) согласно протоколу микроволновой обработки производителя.

Анализ посредством HPLC SEC проводили на колонке SEC-3000, 7,8×300 мм (Phenomenex, Торранс, Калифорния, США), соединенной с системой Agilent 1290 Infinity для HPLC (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния, США), в изократическом режиме с 50 мМ NaH₂PO₄, 250 мМ NaCl, подвижной фазой с pH 6,9 со скоростью 1 мл/мин и наблюдением УФ-поглощения при 280 нм.

Димеризация отрицательно заряженных и положительно заряженных вариантов TTR

Очищенные образцы TTR подвергали нормализации до самой низкой общей молярной концентрации в экспериментальной когорте посредством разбавления с помощью 10 мМ tris-HCl, pH 8,0, 150 мМ NaCl. Образцы объединяли в равных объемах и инкубировали в течение ночи при 4°C.

Часть смешанных образцов обрабатывали посредством расщепления каспазой следующим образом. Значения концентрации очищенного образца белка доводили до 2,5 мг/мл посредством разбавления с применением 10 мМ tris-HCl, pH 8,0, 150 мМ NaCl. Получали 5× буфер для расщепления, состоящий из 250 мМ NaCl, 15 мМ 2-меркаптоэтанола, pH 8,0, и его температуру доводили до 25°C на водяной бане, а также 1× буфер для расщепления посредством разбавления 5× буфера водой. Разбавляли исходную аликвоту каспазы-3 (Amgen Inc., Таузенд-Оукс, Калифорния, США) до 0,1 мг/мл с применением 1× буфера для расщепления. Объединяли 4 части белка, 4 части разбавленной каспазы-3, 8 частей 5× буфера для расщепления и 20 частей воды и инкубировали при 25°C на водяной бане в течение 2 ч. Удаляли раствор для расщепления и добавляли 20 частей буфера для образцов для SDS-PAGE (тот же реагент, который указывали ранее для анализа посредством SDS-PAGE). Проводили реакцию расщепления при SDS-PAGE с применением того же протокола, указанного ранее.

Полученные смеси молекул в способе с применением каспазы и без нее анализировали посредством SDS-PAGE в невозобновляющих условиях без нагревания и посредством HPLC SEC.

Клонирование молекул (1) [Ab "A"]=[отрицательно заряженный TTR]₂: [положительно заряженный TTR]₂=[Ab "B"] (2X Ab-TTR); (2) [[Ab "A"] - [отрицательно заряженный TTR]]₂: [[положительно заряженный TTR] - [Ab "B"]]₂ (4X Ab-TTR) и (3) [[Fab "A"] - [отрицательно заряженный TTR]]₂: [[положительно заряженный TTR] - [Fab "B"]]₂ (4X Fab-TTR) (без линкера)

TTR сливали с несколькими сконструированными вариантами полученной из гибридомы тяжелой цепи (HC) антитела к CB1, антитела к G1TR и антитела к TR2 с применением стандартных методик молекулярной биологии, включая полимеразную цепную реакцию (ПЦР), сайт-направленный ПЦР-мутажез, расщепление эндонуклеазой рестрикции и ферментативное лигирование с плазидами экспрессии млекопитающих. Также получали His-меченные молекулы Fab-TTR. Эти клонированные ДНК слитых с TTR вариантов тяжелой цепи и Fab в комбинации с их соответствующими клонированными ДНК легкой цепи (LC) антитела к CB1, антитела к G1TR и антитела к TR2 использовали для трансфекции клетки млекопитающего для экспрессии 2X Ab-TTR, 4X Ab-TTR и 4X Fab-TTR. Методики, как правило, выполняли согласно способам, которые могут быть упомянуты в *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Sambrook et al., 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Последовательности продуктов слияния на основе антитела к TTR и Fab получали с применением набора для бесшовного клонирования GENEART® (GSC) или сборки Golden Gate (GGA). Фрагменты ДНК, которые объединяли, получали посредством сплайсинга с применением ПЦР с перекрывающимися праймерами (SOE-PCR) или заказывали синтетические последовательности у внешнего поставщика. Продукты SOE-PCR, используемые при GSC-клонировании, создавали с применением фланкирующих праймеров в паре с мутагенными палиндромными праймерами, с помощью которых создавали два ПЦР-продукта, которые характеризовались общей перекрывающейся областью размером 15 п. н., окружающей кодон требуемого сайта аминокислотной замены. Продукты SOE-PCR, используемые при GGA, разрабатывали с включением направленных уникальных выступающих концов из 4 пар оснований, которые получали посредством расщепления с помощью BsmBI.

Вкратце, при GGA для разрезания и бесшовного лигирования друг с другом нескольких фрагментов ДНК использовали ферменты рестрикции II типа и ДНК-лигазу T4 (Engler et al., *PLOS One*, Vol. 3(11): e3647, 2008). В этом примере несколько фрагментов ДНК состояли из (i) синтетической последовательности нуклеиновой кислоты (GeneByte, Gen9, Кембридж, Массачусетс), кодирующей консенсусную последовательность Kozak, последовательность сигнального пептида, ген полного антитела, линкер и последовательность TTR, и (ii) остова вектора экспрессии. Реакционные смеси для GGA состояли из 50 нг GeneByte, 20 нг вектора экспрессии, 1 мкл 10× реакционного буфера Fast Digest+0,5 мМ АТФ (Thermo Fisher, Уолтем, Массачусетс), 0,5 мкл Esp31 FastDigest (Thermo Fisher, Уолтем, Массачусетс), 1 мкл ДНК-лигазы T4 (5 ед./мкл, Thermo Fisher, Уолтем, Массачусетс) и воды для доведения объема до 10 мкл. Реакции проводили в ходе 15 циклов, состоящих из стадии расщепления при 37°C продолжительностью 2 мин и стадии лигирования при 16°C продолжительностью 3 мин. После 15 циклов следовала конечная стадия расщепления при 37°C продолжительностью 5 мин и стадия инактивации фермента при 80°C продолжительностью 5 мин.

Экспрессия молекул [Ab "A"]=[отрицательно заряженный TTR]₂: [положительно заряженный TTR]₂=[Ab "B"] (без линкера)

Клетки HEK 293-6E поддерживали в среде FreeStyle F17 (Thermo Fisher Scientific) с добавлением 0,1% (вес./об.) полоксамера 188 (Sigma-Aldrich), 6 мМ L-глутамин (Thermo Fisher Scientific), 25 мкг/мл G418 (Thermo Fisher Scientific) при 36°C во встряхиваемой колбе в инкубаторе при 5% CO₂, влажности 80-90% и перемешивании при 120 об./мин на встряхивателе с амплитудой встряхивания 25 мм. Клетки 293-6E высевали за 2 дня до трансфекции при 0,4×10⁶ клеток/мл. В день трансфекции клетки находились в фазе экспоненциального роста (~ 1,5×10⁶ клеток/мл, жизнеспособность > 95%). Процедуры временной трансфекции выполняли при дозе гена 20% посредством добавления смеси 0,5 мг/л ДНК (0,1 мг/л ДНК гена конструкции, представляющей интерес, + 0,4 мг/л векторной ДНК) и 2 мг/л PEI Max (полиэтиленмин Мах, Polysciences, № по каталогу 24765-2) в культуру клеток. Запатентованные питательные добавки {дрожжевой экстракт (0,5% вес./об.) и глюкоза (3 г/л)} добавляли через 4 ч после трансфекции. Полученные продукты собирали через 6 дней после трансфекции посредством центрифугирования клеток при 4000 об./мин (3485 × g) в течение 40 мин. Надосадочную жидкость фильтровали через фильтр из PES (полиэфирсульфона) с диаметром пор 0,45 мкм.

Очистка молекул [Ab "A"]=[отрицательно заряженный TTR]₂: [положительно заряженный TTR]₂=[Ab "B"] (без линкера)

Колонку rProtein A Fast Flow (GE Healthcare Bio-Sciences, Мальборо, Массачусетс, США), соединенную с FPLC ÄKTApurifier (GE Healthcare Bio-Sciences) FPLC, уравнивали с помощью PBS согласно Дульбекко (DPBS) перед нанесением образца. Отфильтрованную среду для культивирования клеток вводили в колонку, промывали 5 объемами колонки (CV) DPBS и постадийно элюировали с помощью 8 CV 50 мМ HOAc, pH 3,2. Элюат титровали до pH 5,0 с применением 1 M tris, затем фильтровали через вакуумный фильтр из ацетата целлюлозы с диаметром пор 0,45 мкм (Corning Inc., Corning, Нью-Йорк, США). Титрованный и отфильтрованный пул rProtein A разделяли на два отдельных пула для дополнительной очистки.

Половину пула rProtein A разбавляли в соотношении 1:5 по объему с помощью 20 мМ MES, pH 5,0, затем вводили в колонку SP Sepharose High Performance (GE Healthcare Bio-Sciences), соединенную с ÄKTApurifier (GE Healthcare Bio-Sciences) FPLC, предварительно уравниванную с помощью 20 мМ

NaOAc, pH 5,0. Колонку промывали с помощью 5 CV 20 mM NaOAc, pH 5,0, и элюировали с помощью 20 CV с градиентом от 20 mM NaOAc, pH 5,0 до 20 mM NaOAc, 500 mM NaCl, pH 5,0.

Фракции SP-сефарозы анализировали с помощью системы Caliper LabChip GXII для микрокапиллярного электрофореза с применением экспресс-анализа белка LabChip (Perkin Elmer, Уолтем, Массачусетс, США) согласно протоколу производителя. Фракции отбирали для обогащения полосы с примерной молекулярной массой мономерного Ab-TTR по сравнению с разновидностями с несоответствующей молекулярной массой, затем объединяли.

Пул SP-сефарозы подвергали диализу против 10 mM MES, 150 mM NaCl, pH 6,5, с применением картриджа для диализа Slide-a-lyzer с MWCO, составляющей 10 кДа (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США), до тех пор, пока расчетное содержание исходного буфера не стало ниже 1%.

Другую половину пула rProtein A вводили в колонку с Sephadex G-25 (GE Healthcare Bio-Sciences), соединенную с АКТApurifier (GE Healthcare Bio-Sciences) FPLC, предварительно уравновешенную с помощью 20 mM MES, pH 6,5. Колонку элюировали в изократическом режиме с помощью 10 mM MES, 150 mM NaCl, pH 6,5.

РС-аналитика молекул [Ab "A"]=[отрицательно заряженный TTR]₂: [положительно заряженный TTR]₂=[Ab "B"] (без линкера)

Количественный анализ белка выполняли посредством измерения УФ-поглощения при 280 нм с применением Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific).

Анализ посредством SDS-PAGE в невозстанавливающих условиях выполняли посредством обработки образца буфером для образцов для SDS-PAGE (Thermo Fisher Scientific), содержащим 100 mM йод-ацетамида (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США), затем образец загружали непосредственно в гель с 10% Tris-Gly и анализ осуществляли согласно протоколу производителя. Анализ посредством SDS-PAGE выполняли посредством обработки образца буфером для образцов для SDS-PAGE и восстановителем для образцов (Thermo Fisher Scientific). Образец инкубировали при 85°C в течение 5 мин, затем загружали в гель с 10% Tris-Gly и анализ осуществляли согласно протоколу производителя. Гели окрашивали с применением SimplyBlue SafeStain (Thermo Fisher Scientific) согласно протоколу микроволновой обработки производителя.

Анализ посредством HPLC SEC проводили на колонке Zenix-C SEC-300, 7,8×300 мм (Sepax Technologies Inc., Ньюарк, Делавэр, США), соединенной с системой Agilent 1290 Infinity для HPLC (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния, США), в изократическом режиме с 50 mM NaH₂PO₄, 250 mM NaCl, подвижной фазой с pH 6,9 со скоростью 1 мл/мин и наблюдением УФ-поглощения при 280 нм.

DAS-аналитика молекул [Ab "A"]=[отрицательно заряженный TTR]₂: [положительно заряженный TTR]₂=[Ab "B"] (без линкера)

LC-MS в денатурирующих условиях: все данные LC-MS получали с применением системы Agilent 6230 TOF для LC/MS с системой 1290 Infinity для LC. Хроматографическое разделение достигали с применением колонки Zorbax SB300-C8, 3,5 мкм, 2,1×50 мм, работающей при температуре 75°C. Использовали следующие растворители: подвижная фаза А представляла собой воду, содержащую 0,1% об./об. TFA. Подвижная фаза В представляла собой 90% н-пропанол, содержащий 0,1% об./об. TFA. Условия начального градиента составляли 20% подвижной фазы В от 0,0 до 1,0 мин; от 1,0 до 9,0 мин, 20-70% подвижной фазы В; 9,0-10,0 мин, 70-100% подвижной фазы В, где она остается на уровне 100% в течение еще 1 мин. Скорость потока составляла 0,2 мл/мин. Примерно 5 мкг конъюгата IgG1-биотин загружали в систему для LC-MS для каждого из анализов. Данные получали в диапазоне масса/заряд, составляющем 1000-7000. Исходные значения RF фрагментатора, скиммера и октаполя 1 составляли 460 В, 95 В и 800 В (от пика к пику) соответственно. Капиллярное напряжение при ESI составляло 5,9 кВ. Температура газа составляла 340°C. Поток осушающего газа составлял 13 л/мин. Избыточное давление распылителя составляло 25 фунтов/кв. дюйм. Калибровку Оа-ToF выполняли с применением Agilent Tune Mix с применением процедуры автоматической калибровки, осуществляемой с помощью MassHunter Data Acquisition версии В.06.01, сборка 6.01.6157.

Экспрессия молекул [Ab 655-341]=[LX] - [отрицательно заряженный TTR]₂: [[положительно заряженный TTR] - [LX]]₂=[Ab 655-341]

Экспрессию проводили, как описано для молекул [Ab "A"]=[отрицательно заряженный TTR]₂: [положительно заряженный TTR]₂=[Ab "B"].

Очистка молекул [Ab 655-341]=[LX] - [отрицательно заряженный TTR]₂: [[положительно заряженный TTR] - [LX]]₂=[Ab 655-341]

Отфильтрованные среды для культивирования клеток вводили в колонку rProtein A Fast Flow HiTrap (GE Healthcare Bio-Sciences) и колонку для обессоливания HiTrap (GE Healthcare Bio-Sciences) в составе системы для проточной тандемной очистки, уравновешенной с помощью DPBS и 10 mM MES, 150 mM NaCl, pH 6,5 соответственно, соединенной с АКТApurifier (GE Healthcare Bio-Sciences). Колонку с rProtein A промывали с помощью DPBS и постадийно элюировали с помощью 100 mM HOAc, pH 3,6. Элюат с rProtein A заменяли буфером на колонке для обессоливания HiTrap с 10 mM MES, 150 mM NaCl,

pH 6,5.

DAS-аналитика [Ab 655-341]=[LX] - [отрицательно заряженный TTR]₂: [[положительно заряженный TTR] - [LX]]₂=[Ab 655-341]

LC-MS в денатурирующих условиях проводили, как описано для молекул [Ab "A"]=[отрицательно заряженный TTR]₂: [положительно заряженный TTR]₂=[Ab "B"].

Экспрессия молекул (1) [[Fab "A"] - [отрицательно заряженный TTR]]₂: [[положительно заряженный TTR] - [Fab "B"]]₂, (2) [Ab "A"]=[отрицательно заряженный TTR]₂: [положительно заряженный TTR]₂=[Ab "B"] и (3) [Ab "A"]=[отрицательно заряженный TTR]₂: [[положительно заряженный TTR] - [Fab "B"]]₂ (совместная экспрессия)

Среда для роста CHO-K1 состоит из 50% среды CS9 (неселективная, запатентованная Amgen) + 50% ExCell302 (SAFC Biosciences № 14324C) + 2 mM L-глутамин (Gibco № 25030-081). Среда для отбора состоит из среды для роста +10 мкг/мл пуромицина (Gibco № A11138-03) + 500 мкг/мл гигромицина (Invitrogen № 10687-010). Среда для продуцирования состоит из CHO-K1 6DCD (ATO Media Lab, запатентованная Amgen).

Реагенты для трансфекции состоят из липофектамина LTХ (Gibco № 15338-100 (каталожный № 94756)) и среды Opti-MEM I с пониженным содержанием сыворотки крови (Gibco № 31985-070). Условия роста включали рост в суспензии при 36°C+5% CO₂ в увлажненном инкубаторе при встряхивании со скоростью 120 об./мин с применением вентилируемых встряхиваемых колб. Процедура трансфекции была следующей. За день до трансфекции культуру клеток-хозяев разделяли на 7-10 е⁵ VCD/мл. Комплекс ДНК/липофектамин LTХ получали следующим образом. 4 мкг нелинеаризованной ДНК разбавляли в 0,5 мл среды Opti-MEM в 24DWB (2,0 мкг GOI (ген, представляющий интерес) и 2,0 мкг PB200 (гиперактивная транспозаза)). Для процедур трансфекции четырьмя цепями использовали 0,5 мкг каждой цепи и 2,0 мкг PB200 (гиперактивная транспозаза), в общей сложности при 4,0 мкг/трансфекция. Для процедур трансфекции тремя цепями использовали 0,66 мкг каждой цепи и 2,0 мкг PB200 (гиперактивная транспозаза), в общей сложности при 4,0 мкг/трансфекция. 10 мкл липофектамина LTХ разбавляли в 0,5 мл среды Opti-MEM в полипропиленовой пробирке объемом 15 мл и оставляли на 5 мин. Затем разбавленную ДНК объединяли с липофектаминам LTХ и тщательно перемешивали посредством пипетирования. Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 15-20 мин с периодическим перемешиванием. 2е⁶ жизнеспособных клеток/трансфекция переносили в полипропиленовую пробирку объемом 15-50 мл, центрифугировали @ 1200 об./мин в течение 5 мин, среду подвергали аспирации. Затем клетки промывали с помощью 1× PBS посредством полного ресуспендирования и центрифугировали @ 1200 об./мин в течение 5 мин. Затем 1× PBS подвергали аспирации и клетки ресуспендировали в 1 мл Opti-MEM (на трансфекцию). Затем в каждую лунку добавляли 1 мл клеток с последующим добавлением комплекса ДНК/LTХ по каплям в каждую лунку. Клетки инкубировали в течение 5-6 ч со встряхиванием при 235 об./мин, 36°C+5% CO₂. Затем к клеткам добавляли 2,0 мл неселективной среды для роста (среда CHO-K1). Отбор через 72 ч после трансфекции осуществляли посредством помещения клеток в 4 мл среды для отбора посредством полного ресуспендирования. Масштабирование размножения в день 6 осуществляли посредством добавления 1,6 мл культуры DWB непосредственно к 12 мл в вентилируемой центрифужной пробирке объемом 50 мл. Продуцирование в день 10 осуществляли посредством инокуляции партии для продуцирования объемом 40 мл посредством ресуспендирования ~13 мл культуры N-1 в среде для продуцирования. Сбор в день 17 проводили с применением разделения клеток посредством центрифугирования с последующей стерильной фильтрацией кондиционированной среды.

Очистка молекул [[Fab "A"] - [отрицательно заряженный TTR]]₂: [[положительно заряженный TTR] - [Fab "B"]]₂ (совместная экспрессия)

Слитые белки Fab-TTR содержали C-конец 6× his-метки и их захватывали из CM посредством аффинной хроматографии IMAC (1 мл HisTrap Excel, GE Healthcare; 17-3712-05) при скорости потока 2 мл/минута. Затем колонку для IMAC промывали с помощью 5 CV 20 mM фосфата натрия, 250 mM хлорида натрия, pH 7,4, при скорости потока 4 мл/мин посредством постадийного элюирования белка с помощью 20 mM фосфата натрия, 250 mM хлорида натрия, 0,5 M имидазола, pH 7,4, при 2 мл/мин. Колонку для IMAC очищали с помощью 6 M гуанидин-HCl, 50 mM Tris, pH 8 и уравнивали с помощью 20 mM фосфата натрия, 250 mM хлорида натрия, pH 7,4 перед загрузкой следующего образца.

Наконец, все очищенные белки заменяли буфером в 10 mM MES, 150 mM хлорида натрия, pH 6, пропуская через колонку для обессоливания HiTrap объемом 5 мл (GE Healthcare; 17-1408-01) при скорости потока 2 мл/мин. Все операции препаративной хроматографии выполняли с применением устройств для очистки АКТА (GE Healthcare). Затем использовали комбинацию аналитических способов для определения характеристик количества и качества продуцируемых белков, включая количественное определение белка при A280, эксклюзионную хроматографию (SEC), микрокапиллярный электрофорез (MCE) и SDS-PAGE.

Очистка молекул [Ab "A"]=[отрицательно заряженный TTR]₂: [положительно заряженный TTR]₂=[Ab "B"] и [Ab "A"]=[отрицательно заряженный TTR]₂: [[положительно заряженный TTR] - [Fab "B"]]₂ (совместная экспрессия)

Слитые белки антитело-TTR захватывали из CM посредством аффинной хроматографии с белком А (1 мл MabSelect SuRe HiTrap, GE Healthcare, Bio-Sciences, Мальборо, Массачусетс, США; 11-0034-93) при скорости потока 2 мл/мин. Затем колонку с белком А промывали с помощью 5 CV 25 mM Tris, 100 mM хлорида натрия, pH 7,4, при скорости потока 4 мл/мин посредством постадийного элюирования белка 100 mM уксусной кислотой, pH 3,6, при 2 мл/мин. Колонку очищали с помощью 6 M гуанидин-HCl, 50 mM Tris, pH 8 и уравнивали с помощью 25 mM Tris, 100 mM хлорида натрия, pH 7,4, перед загрузкой следующего образца.

Наконец, все очищенные белки заменяли буфером в 10 mM MES, 150 mM хлорида натрия, pH 6, пропуская через колонку для обессоливания HiTrap объемом 5 мл (GE Healthcare; 17-1408-01) при скорости потока 2 мл/минута. Все операции препаративной хроматографии выполняли с применением устройств для очистки АКТА (GE Healthcare).

РС-аналитика молекул (1) [[Fab "A"] - [отрицательно заряженный TTR]]₂: [[положительно заряженный TTR] - [Fab "B"]]₂, (2) [Ab "A"]=[отрицательно заряженный TTR]₂: [положительно заряженный TTR]₂=[Ab "B"] и (3) [Ab "A"]=[отрицательно заряженный TTR]₂: [[положительно заряженный TTR] - [Fab "B"]]₂ (совместная экспрессия)

Количественный анализ при А280 - количественный анализ белка выполняли посредством измерения УФ-поглощения при 280 нм с применением Multiskan Go (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США).

SEC - образцы слитых белков на основе TTR наносили на колонку ACQUITY UPLC BEH для SEC, 200Å, 1,7 мкм, 4,6×300 мм (Waters, Милфорд, Массачусетс, США; 186005226) при скорости потока 0,4 мл/минута в подвижной фазе из 100 mM фосфата натрия, 50 mM хлорида натрия, 7,5% этанола, pH 6,9 и наблюдали УФ-поглощение при 280 нм. Аналитическую SEC выполняли с применением 1290 Infinity HPLC (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния, США). В связи с большой MW этих слитых молекул на основе TTR (249-347 кДа) и примесей, связанных с продуктом, эталонные по MW молекулы использовали для измерения примерных значений времени удерживания при SEC и ожидаемой MW для конкретной слитой молекулы. Эти эталонные молекулы представляли собой молекулы, произведенные Amgen, Inc., и представляли собой 2 различных антитела (каждое по 145 кДа; партии белка BR4214-1 и PL41591), гетеротетрамер антитело-TTR (635 кДа; партия белка PL38002), гетеродимер антитело-TTR (265 кДа; партия белка PL46796) и гетеротетрамер Fab-TTR (248 кДа; партия белка PL38000).

МСЕ - определение характеристик образцов слитых белков на основе TTR посредством микрокапиллярного электрофореза выполняли с применением LabChip GXII (Caliper LifeSciences, Маунтин-Вью, Калифорния, США). Образцы получали в восстановленном и невосстановленном виде согласно рекомендациям производителя. Технология с применением микрофлюидного чипа позволяет автоматически окрашивать, обесцвечивать, электрофоретически разделять и анализировать образцы белка.

SDS-PAGE - образцы слитых белков на основе TTR анализировали на различных одномерных гелях с Tris-глицином, включая 8%, 10% и 4-20% (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США; Wedge Well: XP00080, XP00100, XP04200 соответственно). Образцы получали в невосстановленном виде, без нагревания или с нагреванием при 85°C в течение 10 мин. Гели окрашивали с применением SimplyBlue SafeStain (Invitrogen; LC6060) и сравнивали с эталонным по MW стандартом для идентификации требуемых полос продукта.

DAS-аналитика молекул (1) [[Fab "A"] - [отрицательно заряженный TTR]]₂: [[положительно заряженный TTR] - [Fab "B"]]₂, (2) [Ab "A"]=[отрицательно заряженный TTR]₂: [положительно заряженный TTR]₂=[Ab "B"] и (3) [Ab "A"]=[отрицательно заряженный TTR]₂: [[положительно заряженный TTR] - [Fab "B"]]₂ (совместная экспрессия)

LC-MS в денатурирующих условиях проводили, как описано для молекул [Ab "A"]=[отрицательно заряженный TTR]₂: [положительно заряженный TTR]₂=[Ab "B"].

SEC-Native-MS: все эксперименты QToF проводили с помощью инструмента Synapt G1 HDMS, работающего в режиме ESI для положительно заряженных ионов. Этот инструмент преобразовывали в инструмент с RF-ограничивающей дрейфовой трубкой, подобный тому, который описан в Bush et al., Anal Chem 2010, 82:9557-9565. Все критические значения напряжения и давления инструмента являются следующими: капиллярное напряжение 3,1 кВ; пробоотборный конус 200 В, экстракционный конус 1 В; температура блока источника 25°C; энергия соударений в ловушке 50 В; перенос энергии соударения 20 В; входное напряжение ловушки 2,0 В; напряжение смещения ловушки 5 В; выходное напряжение ловушки 0,0 В; входное напряжение при IMS -20 В; выходное напряжение при IMS 21 В; входное напряжение при переносе 1,0 В; выходное напряжение при переносе 1,0 В; скорость переноса 248 м/с; амплитуда волны переноса 3,0 В; RF-амплитуда источника (от пика к пику) 450 В; трехволновые RF-амплитуды ловушки (от пика к пику) 380 В, IMS 250 В, напряжение переноса 380 В; обратное давление источника 6,0 мбар; давление ловушки/переноса сC4F8, 2,00e-2 мбар (указан манометр Пирани; скорость потока 4,0 мл/мин). Управление устройством и сбор данных осуществляли с помощью MassLynx 4.1 SCN 872.

SEC выполняли с применением насосной системы Agilent 1200 и Waters BEH, 2,1×50 мм, 300 Å, работающей при скорости потока 75 мкл/мин при значениях температуры окружающей среды. Подвижная

фаза представляла собой 200 мМ ацетат аммония. Разделение посредством SEC проводили с применением изократического способа в течение 6 мин. Для анализов вводили 25-50 мкг материала. Использовали 200 мМ ацетат аммония, поскольку он представляет собой летучий буфер, поэтому он совместим с масс-спектрометром. Управление инструментом осуществляли с помощью ChemStation.

Следующие методики использовали для получения отрицательно заряженных и положительно заряженных конструкций на основе TTR, содержащих варианты TTR с двумя мутациями в области контакта димер/димер TTR ("C10A/K15A/XX/YY") на субъединицу TTR

Клонирование димеров Fab-TTR с вариантами TTR, содержащими две мутации в области контакта димер/димер TTR

Клонирование димеров Fab-TTR с вариантами TTR, содержащими две мутации в области контакта димер/димер TTR, осуществляли с применением способов, аналогичных способам, описанным в разделе, описывающем клонирование (1) [Ab "A"]=[отрицательно заряженный TTR]₂: [положительно заряженный TTR]₂=[Ab "B"] (2X Ab-TTR); (2) [[Ab "A"] - [отрицательно заряженный TTR]]₂: [[положительно заряженный TTR] - [Ab "B"]]₂ (4X Ab-TTR) и (3) [[Fab "A"] - [отрицательно заряженный TTR]]₂: [[положительно заряженный TTR] - [Fab "B"]]₂ (4X Fab-TTR) (без линкера).

Экспрессия димеров Fab-TTR с вариантами TTR, содержащими две мутации в области контакта димер/димер TTR

Процедуры трансфекции проводили в объеме 50 мл. Клетки НЕК 293-6Е поддерживали в среде FreeStyle F17 (Thermo Fisher Scientific) с добавлением 0,1% (вес./об.) полоксамера 188 (Sigma-Aldrich), 6 мМ L-глутамин (Thermo Fisher Scientific), 25 мкг/мл G418 (Thermo Fisher Scientific) при 36°C во встряхиваемой колбе в инкубаторе при 5% CO₂, влажности 80-90% и перемешивании при 120 об./мин на встряхивателе с амплитудой встряхивания 25 мм. Клетки 293-6Е высевали за 2 дня до трансфекции при 0,4×10⁶ клеток/мл. В день трансфекции клетки находились в фазе экспоненциального роста (~ 1,5×10⁶ клеток/мл, жизнеспособность > 95%). Процедуры временной трансфекции выполняли посредством добавления смеси 0,5 мг/л ДНК и 2 мг/л PEI Max (полиэтиленимин Max, Polysciences, № по каталогу 24765-2) в культуру клеток. Запатентованные питательные добавки {дрожжевой экстракт (0,5% вес./об.) и глюкоза (3 г/л)} добавляли через 4 ч после трансфекции. Полученные продукты собирали через 6 дней после трансфекции посредством центрифугирования клеток при 4000 об./мин (3485 × g) в течение 40 мин. Надосадочную жидкость фильтровали через фильтр из PES (полиэфирсульфона) с диаметром пор 0,45 мкм.

Очистка димеров Fab-TTR с вариантами TTR, содержащими две мутации в области контакта димер/димер TTR

Отфильтрованные среды для культивирования клеток вводили в колонку HisTrap excel (GE Healthcare Bio-Sciences) и колонку для обессоливания HiTrap (GE Healthcare Bio-Sciences) в составе системы для проточной тандемной очистки, уравновешенной с помощью 20 мМ Na-фосфата, 500 мМ NaCl, pH 7,4, и 10 мМ MES, 150 мМ NaCl, pH 6,0, соответственно, соединенной с ÄKTApurifier (GE Healthcare Bio-Sciences). Колонку HisTrap excel промывали с помощью 20 мМ Na-фосфата, 500 мМ NaCl, pH 7,4 и постадийно элюировали с помощью 20 мМ Na-фосфата, 500 мМ NaCl, 500 мМ имидазола, pH 7,4. Элюат HisTrap excel заменяли буфером на колонке для обессоливания HiTrap с 10 мМ MES, 150 мМ NaCl, pH 6,0.

РС димеров Fab-TTR с вариантами TTR, содержащими две мутации в области контакта димер/димер TTR

Количественный анализ белка выполняли посредством измерения УФ-поглощения при 280 нм с применением микропланшетного фотометра MultiSkan FC (Thermo Fisher Scientific).

Анализ посредством микрокапиллярного электрофореза в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях выполняли с помощью системы Caliper LabChip GXII с применением экспресс-анализа белка LabChip (Perkin Elmer) согласно протоколу производителя.

Анализ посредством HPLC-SEC проводили на колонке ACQUITY UPLC BEH450 SEC, 2,5 мкм, 7,8×300 мм (Waters Corp., Милфорд, Массачусетс, США), соединенной с системой Agilent 1290 Infinity для HPLC (Agilent Technologies), работающей в изократическом режиме с 100 мМ NaH₂PO₄, 50 мМ NaCl, 7,5% EtOH, pH 6,9, подвижной фазой со скоростью 0,4 мл/мин и наблюдением УФ-поглощения при 280 нм.

Гетеродимеризация [[Fab "A"] - [отрицательно заряженный TTR с заменой двух аминокислот]] и [[положительно заряженный TTR с заменой двух аминокислот] - [Fab "B"]]: смешивание и анализ отдельно полученных конструкций

Очищенные образцы TTR-Fab подвергали нормализации до 0,2 мг/мл посредством разбавления с помощью 10 мМ MES, 150 мМ NaCl, pH 6,0. Образцы объединяли в равных объемах и инкубировали в течение ночи при 4°C. Полученные смеси молекул анализировали посредством HPLC-SEC.

Совместная экспрессия [[Fab "A"] - [отрицательно заряженный TTR с заменой двух аминокислот]] и [[положительно заряженный TTR с заменой двух аминокислот] - [Fab "B"]]

Процедуры трансфекции проводили индивидуально и после завершения (через 1-4 ч) конструкции [[Fab "A"] - [отрицательно заряженный TTR с заменой двух аминокислот]] и [[положительно заряженный

TTR с заменой двух аминокислот] - [Fab "B"] объединяли и получали совместно в объеме 4 мл. Клетки HEK 293-6E поддерживали в среде FreeStyle F17 (Thermo Fisher Scientific) с добавлением 0,1% (вес/объем) полоксамера 188 (Sigma-Aldrich), 6 mM L-глутамин (Thermo Fisher Scientific), 25 мкг/мл G418 (Thermo Fisher Scientific) при 36°C во встряхиваемой колбе в инкубаторе при 5% CO₂, влажности 80-90% и перемешивании при 120 об./мин на встряхивателе с амплитудой встряхивания 25 мм. Клетки 293-6E высевали за 2 дня до трансфекции при 0,4×10⁶ клеток/мл. В день трансфекции клетки находились в фазе экспоненциального роста (~ 1,5×10⁶ клеток/мл, жизнеспособность > 95%). Процедуры временной трансфекции выполняли посредством добавления смеси 0,5 мг/л ДНК и 2 мг/л PEI Max (полиэтиленимин Max, Polysciences, № по каталогу 24765-2) в культуру клеток. Запатентованные питательные добавки {дрожжевой экстракт (0,5% вес./об.) и глюкоза (3 г/л)} добавляли через 4 ч после трансфекции. Полученные продукты собирали через 6 дней после трансфекции посредством центрифугирования клеток при 4000 об./мин (3485 × g) в течение 40 мин. Надосадочную жидкость фильтровали через фильтр из PES (полиэфирсульфона) с диаметром пор 0,45 мкм.

Очистка совместно экспрессируемых [[Fab "A"] - [отрицательно заряженный TTR с заменой двух аминокислот]] и [[положительно заряженный TTR с заменой двух аминокислот] - [Fab "B"]]

Отфильтрованные среды для культивирования клеток вводили в колонку HisTrap excel (GE Healthcare Bio-Sciences) и колонку для обессоливания HiTrap (GE Healthcare Bio-Sciences) в составе системы для проточной тандемной очистки, уравниваемой с помощью 20 mM Na-фосфата, 500 mM NaCl, pH 7,4, и 10 mM MES, 150 mM NaCl, pH 6,0, соответственно, соединенной с ÄKTApurifier (GE Healthcare Bio-Sciences). Колонку HisTrap excel промывали с помощью 20 mM Na-фосфата, 500 mM NaCl, pH 7,4, и постадийно элюировали с помощью 20 mM Na-фосфата, 500 mM NaCl, 500 mM имидазола, pH 7,4. Элюат HisTrap excel заменяли буфером на колонке для обессоливания HiTrap с 10 mM MES, 150 mM NaCl, pH 6,0.

РС-аналитика совместно экспрессируемых [[Fab "A"] - [отрицательно заряженный TTR с заменой двух аминокислот]] и [[положительно заряженный TTR с заменой двух аминокислот] - [Fab "B"]]

Количественный анализ белка выполняли посредством измерения УФ-поглощения при 280 нм с применением микропланшетного фотометра MultiSkan FC (Thermo Fisher Scientific). Анализ посредством микрокапиллярного электрофореза в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях выполняли с помощью системы Caliper LabChip GXII с применением экспресс-анализа белка LabChip (Perkin Elmer) согласно протоколу производителя. Анализ посредством HPLC-SEC проводили на колонке ACQUITY UPLC BEH450 SEC, 2,5 мкм, 7,8×150 мм (Waters Corp., Милфорд, Массачусетс, США), соединенной с системой Agilent 1290 Infinity для HPLC (Agilent Technologies), работающей в изократическом режиме с 100 mM NaH₂PO₄, 50 mM NaCl, 7,5% EtOH, pH 6,9, подвижной фазой со скоростью 0,4 мл/мин и наблюдением УФ-поглощения при 280 нм.

Пример 2. Оценка гетеротетрамеров TTR, содержащих варианты TTR с одной мутацией в области контакта димер/димер TTR ("C10A/K15A/XX") на субъединицу TTR, продуцируемых в *E. coli*

18 вариантов TTR с заряженными аминокислотами (C10A/K15A/XX) TTR (SEQ ID NO: 1) получали для определения того, какие мутации с заменой заряженных аминокислот приведут к значительному отталкиванию в области контакта димер/димер TTR (см. фиг. 4). Каждый из вариантов TTR содержал мутации C10A и K15A и третью мутацию, обозначенную как "XX". В этих экспериментах XX представляла собой K15R, L17R, V20R, R21E, G22R, S23R, P24R, D51R, S52R, I84R, T106R, A108R, S112R, Y114R, S115R, T119R, V121R или S123R.

Девять вариантов TTR (P24R, I84R, L17R, V121R, V20R, G22R, S112R, T119R, Y114R и S115R) продемонстрировали существенное ослабление связывания в области контакта димер/димер TTR, что указывает на тот факт, что тетрамер TTR расщеплялся на соответствующие димеры TTR в присутствии SDS (хаотроп) без нагревания (см. фиг. 5, гели "без нагревания"). Шесть вариантов (V20R, G22R, S112R, T119R, Y114R и S115R) также нарушают взаимодействие димер/димер в неденатурирующих (нативных) условиях согласно оценке посредством SEC (см. фиг. 6). Кроме того, было обнаружено, что четыре варианта (P24R, I84R, L17R и V121R) преимущественно образуют тетрамеры TTR в неденатурирующих условиях SEC и они продемонстрировали более низкие температуры плавления, что также указывает на ослабление связывания в области контакта димер/димер в этих вариантах.

Шесть наиболее предпочтительных сайтов мутаций в области контакта димер/димер (фиг. 6, выделены красным цветом) выбирали для получения дополнительных вариантов TTR с оценкой образования гетеротетрамеров TTR, содержащих две различные последовательности мономеров TTR. В этих экспериментах требуемые гетеротетрамеры TTR включают [1] один димер TTR, который как таковой состоит из двух мономеров TTR, при этом каждый мономер представляет собой "отрицательно заряженный" вариант TTR, и [2] один димер TTR, который как таковой состоит из двух мономеров TTR, при этом каждый мономер представляет собой "положительно заряженный" вариант TTR. Предпочтительные шесть сайтов мутаций в области контакта димер/димер выбирали на основании их способности образовывать гетеротетрамеры в условиях SEC и SDS-PAGE. Сайты мутаций, которые в первую очередь приводили к образованию димеров в условиях SDS-PAGE, выбирали в качестве исходного значения отсечки (т.е.

L17R, V121R, V20R, G22R, S112R, T119R, Y114R, и S115R). Y114R и S115R в дальнейшем не рассматривали в связи с явно низким выходом белка.

Отрицательно заряженные варианты TTR содержали мутации C10A/K15A/XX, где каждая из XX представляла собой L17D, L17E, V20D, V20E, G22D, G22E, S112D, S112E, T119D, T119E, V121D или V121E. Сходным образом, положительно заряженные варианты TTR содержали мутации C10A/K15A/XX, где каждая из XX представляла собой L17R, L17K, V20R, V20K, G22R, G22K, S112R, S112K, T119R, T119K, V121R или V121K. Таким образом, в общей сложности получали 24 варианта с заменой заряженных аминокислот в области контакта (12 отрицательно заряженных и 12 положительно заряженных) (фиг. 7).

Положительно заряженные варианты смешивали с отрицательно заряженными вариантами (попарно) и оценивали в отношении образования гетеротетрамеров TTR посредством SDS-PAGE и SEC. Многие из пар вариантов демонстрировали некоторую склонность к образованию требуемого гетеротетрамера, как указано с помощью ненулевого значения SEC на фиг. 7 (со значением, представляющим % образования гетеротетрамера). Действительно, некоторые пары демонстрировали очень высокую склонность к образованию гетеротетрамера с образованием тетрамера в количестве 40-100%.

Многие из этих гетеротетрамеров TTR были устойчивы к разрушению хаотропом SDS, на что указывали результаты SDS-PAGE, также показанные на фиг. 7. Пары положительно заряженных/отрицательно заряженных аминокислот, которые демонстрировали высокую склонность к образованию стабильного гетеротетрамера (перекрестные ссылки на данные SEC и SDS-PAGE), включают L17R/T119D, L17K/T119D, L17K/V121E, V20R/V20D, V20R/V20E, V20K/V20D, V20K/V20E, V121R/L17D, V121R/L17E и V121K/L17D.

Пары положительно заряженных/отрицательно заряженных аминокислот, которые продемонстрировали высокую склонность к образованию стабильных тетрамеров TTR, дополнительно оценивали посредством SDS-PAGE. В данном эксперименте для каждой пары оценивали [1] отрицательно заряженный (т.е. основной) вариант; [2] положительно заряженный (т.е. кислый) вариант; [3] комбинацию отрицательно заряженных и положительно заряженных вариантов (которая должна образовывать тетрамер) и [4] комбинацию отрицательно заряженных и положительно заряженных вариантов, подверженных воздействию каспазы (фиг. 8). Как продемонстрировано на фиг. 8, отдельные отрицательно заряженные и положительно заряженные варианты мигрировали на дно геля, в то время как комбинация отрицательно заряженного и положительно заряженного вариантов мигрировала вниз в геле только частично. Это дополнительно демонстрирует, что отрицательно заряженные и положительно заряженные варианты в комбинации образуют высокомолекулярные разновидности (HMW), которые, вероятно, представляют собой требуемый гетеротетрамер. Обработка комбинации отрицательно заряженного и основного вариантов каспазой (которая отщепляет полигистидиновую метку только от положительно заряженных вариантов в связи с включением последовательности DEVD) приводит к образованию в основном однородной полосы, которая проходит немного ниже, чем нерасщепленный тетрамер, демонстрируя, что положительный компонент присутствует, и демонстрируя, что тетрамеры преимущественно являются однородными и, вероятно, представляют собой гетеротетрамеры.

Гетеротетрамеры, содержащие пары L17R/T119D, L17K/T119D, L17K/V121E, V20R/V20D, V20R/V20E, V20K/V20D, V20K/V20E, V121R/L17D, V121R/L17E и V121K/L17D, затем подвергали воздействию условий при pH 5,0 с определением того, способны ли они поддерживать свое тетрамерное состояние (посредством SEC) в условиях, подобных тем, которые встречаются в фармацевтических составах (фиг. 9). Действительно, единственный пик на фиг. 9 указывает на то, что гетеротетрамеры были способны поддерживать свое тетрамерное состояние.

Оценивали температуру плавления трех гетеротетрамеров. В каждом случае гетеротетрамер был стабилен до по меньшей мере 92°C, что указывает на то, что гетеротетрамер является очень термостабильным (фиг. 10).

Пример 3. Оценка конструкций гетеротетрамеров TTR с Fab, Ab и смешанных конструкций с Fab/Ab, содержащих варианты TTR с одной мутацией в области контакта димер/димер TTR ("C10A/K15A/XX") на субъединицу TTR, продуцируемых в клетках млекопитающих

Оценивали способность к образованию конструкций гетеротетрамеров TTR с Fab, Ab и смешанных конструкций с Fab/Ab. В этих конструкциях тетрамеры TTR, содержащие два положительно заряженных варианта TTR и два отрицательно заряженных варианта TTR (как описано выше), могут быть использованы для получения гетеротетрамеров TTR, прикрепленных к четырем Fab, 2 Ab или 1 Ab и 2 Fab. См. фиг. 2a, 2b и 2c соответственно. Мутации с заменой пар заряженных аминокислот в конструкциях Fab можно использовать для управления образованием соответствующих пар Fab HC/LC. Одним из преимуществ таких гетеротетрамерных конструкций на основе TTR является то, что они позволяют осуществлять сборку множества фрагментов, нацеливающихся на антиген (например Ab и/или Fab), посредством слияния мономерных звеньев TTR с C-концом Ab и/или Fab. Это ориентирует Ab и/или Fab таким образом, что их антигенсвязывающие домены будут с меньшей вероятностью подвергаться влиянию стерических препятствий, наблюдаемому в случае других бивалентных биспецифических платформ (например в конструкциях IgG-Fab и IgG-scFv) обычно вследствие слияния N-конца Fab или scFv с C-концом IgG.

Гетеротетрамерные конструкции TTR-Ab

Получали биспецифические гетеротетрамерные конструкции TTR-Ab. В этих конструкциях одно Ab (655-341 Ab) было специфическим в отношении внеклеточного домена рецептора 2 TRAIL (лиганд, индуцирующий апоптоз, родственник фактору некроза опухоли) человека (TR-2, рецептор клеточной смерти 5), в то время как другое Ab (DNP-3B1) было специфическим в отношении DNP. Иллюстративная биспецифическая гетеротетрамерная конструкция TTR-Ab показана на фиг. 11, где каждая тяжелая цепь Ab 655-341 (штриховка линиями) присоединена к N-концу отрицательно заряженных мономеров TTR (совместно образуя отрицательно заряженный димер TTR), и каждая тяжелая цепь Ab DNP-3B1 (сплошная штриховка) присоединена к N-концу положительно заряженных мономеров TTR (совместно образуя положительно заряженный димер TTR).

Четыре отрицательно заряженных варианта TTR сливали с Ab 655-341, а четыре положительно заряженных варианта TTR сливали с Ab DNP-3B1 (фиг. 11). Все продукты слияния Ab-TTR получали без линкера между Ab и мономером TTR. Эти варианты продуцировали в клетках млекопитающих (клетки 293-6E HEK) для секреции в среду. Получали два набора трансформированных клеток: один, продуцирующий продукт слияния Ab 655-341/отрицательно заряженный TTR ($[Ab\ 655-341]=[отрицательно\ заряженный\ TTR]_2$), и один, продуцирующий продукт слияния Ab DNP-3B1/положительно заряженный TTR ($[положительно\ заряженный\ TTR]_2=[Ab\ DNP-3B1]$).

Интересно, что в отличие от тетрамеров TTR, продуцируемых в *E. coli* (пример 2), значительное количество секретируемых конструкций представляли собой самоассоциированные продукты слияния Ab 655-341/отрицательно заряженный TTR (т.е. $[Ab\ 655-341]=[отрицательно\ заряженный\ TTR]_2$; $[отрицательно\ заряженный\ TTR]_2=[Ab\ 655-341]$), самоассоциированные продукты слияния Ab DNP-3B1/положительно заряженный TTR (т.е. $[Ab\ DNP-3B1]=[положительно\ заряженный\ TTR]_2$; $[положительно\ заряженный\ TTR]_2=[Ab\ DNP-3B1]$) или другие разновидности с НМВ. Свободные продукты слияния Ab 655-341/отрицательно заряженный TTR ($[Ab\ 655-341]=$ продукты слияния $[отрицательно\ заряженный\ TTR]_2$) и Ab DNP-3B1/положительно заряженный TTR ($[положительно\ заряженный\ TTR]_2=[Ab\ DNP-3B1]$) составляли 11-32% секретируемых конструкций (фиг. 12). Быстрая замена буфера снижала количество разновидностей с НМВ, хотя это преимущественно приводило к повышению количества самоассоциированных соединений.

Эффект добавления линкера между тяжелой цепью Ab и мономером TTR исследовали с применением тех же восьми вариантов с заряженными аминокислотами. Оценивали пять линкеров размером от 2 до 10 аминокислот (фиг. 13). Преимущественно секретируемые содержащие линкер слитые разновидности Ab/TTR также были самоассоциированными (например $[Ab\ 655-341]=[LX]: [отрицательно\ заряженный\ TTR]_2$; $[отрицательно\ заряженный\ TTR]: [LX]_2=[Ab\ 655-341]$) и представляли собой разновидности с НМВ. Свободные продукты слияния Ab 655-341/отрицательно заряженный TTR и продукты слияния Ab DNP-3B1/положительно заряженный TTR ($[Ab\ 655-341]=[LX]: [отрицательно\ заряженный\ TTR]_2$ и $[положительно\ заряженный\ TTR]: [LX]_2=[Ab\ DNP-3B1]$) составляли до 31% секретируемых конструкций (фиг. 14 и 15). Примечательно, что более короткие линкеры обычно приводили к более высоким титрам и выходу (т.е. к большему количеству продуцируемого белка) и более низким уровням разновидностей с НМВ (фиг. 16). Кроме того, продукты слияния на основе отрицательно заряженного TTR приводили к умеренно более высоким выходам и более низким уровням разновидностей с НМВ. Ни один из содержащих линкер продуктов слияния Ab-TTR не образовывал свободного продукта слияния Ab 655-341/отрицательно заряженный TTR или продукта слияния Ab DNP-3B1/положительно заряженный TTR в качестве преобладающего продукта. Другие наблюдения включали то, что более короткие линкеры приводили к получению более высоких уровней устойчивых к SDS самоассоциированных продуктов слияния Ab/TTR; V20K, V20R и V121K приводили к получению более высоких уровней чувствительных к SDS самоассоциированных продуктов слияния Ab/TTR; T119D, V20D, V121E и L17D приводили к получению продуктов слияния с более высокими титрами/выходами и меньшими количествами свободных продуктов слияния Ab/TTR, и отрицательно заряженные варианты, по-видимому, приводили к получению более низких количеств разновидностей с НМВ.

В свете этих наблюдений было выдвинута гипотеза, что клетки млекопитающих не способны эффективно продуцировать "нететрамеризованный" TTR. Это означает, что клетки млекопитающих могут испытывать сложности при продуцировании $[Ab\ 655-341]=[отрицательно\ заряженный\ TTR]_2$ или $[положительно\ заряженный\ TTR]_2=[Ab\ DNP-3B1]$ (с линкерами или без них), поскольку такие конструкции содержат только два мономера TTR (по сравнению со встречающимся в природе TTR, который содержит четыре мономера TRR). Для изучения этого явления пять комбинаций продуктов слияния Fab 655-341/отрицательно заряженный TTR и продуктов слияния Fab DNP-3B1/положительно заряженный TTR совместно продуцировали в линии клеток млекопитающих (CHO K1). В этих конструкциях HC Fab присоединяли к TTR посредством линкера GG (фиг. 17).

Совместное продуцирование $[Fab\ 655-341] - [GG] - [отрицательно\ заряженный\ TTR]$ и $[положительно\ заряженный\ TTR] - [GG] - [Fab\ DNP-3B1]$ в CHO K1 приводило к образованию значительного количества требуемого $[[Fab\ 655-341] - [GG] - [отрицательно\ заряженный\ TTR]]_2$; $[[положительно\ заряженный\ TTR] - [GG] - [DNP-Fab\ 3B1]]_2$ (78-88%) и сниженного количества разновидностей с НМВ (в

каждом случае ниже 5%) (фиг. 18). Было обнаружено, что образование Fab является очень эффективным для всех пар мутаций, однако при использовании пары L17D/V121R было выявлено незначительное преимущество. Кроме того, оказалось, что пара V20R/V20D может приводить к образованию более слабо связанного гетеротетрамера, который может быть разрушен с помощью SDS.

С применением продуктов слияния Ab- и Fab-TTR, а также неслитых Ab в качестве стандартов для SEC, можно увидеть, что молекула 15524 ([Fab 655-341] - [GG] - [TTR(C10A/K15A/L17D)]) и [TTR(C10A/K15A/V121R)] - [GG] - [Fab DNP-3B1]) характеризуется временем удерживания, сходным с временем удерживания гомомультимера 4X-Fab, и значительно более коротким, чем ожидалось для продукта слияния 2X-Fab-TTR (который должен элюироваться после контрольных Ab) (фиг. 19). Кроме того, если 15524 оценивается посредством MS, сопряженной с SEC, молекулярная масса элюируемых разновидностей соответствует ожидаемой (фиг. 20).

Тот же подход предпринимали для определения того, приведет ли совместная экспрессия Ab-содержащих продуктов слияния TTR к образованию необходимого гетеротетрамера TTR [Ab 655-341]=[LX] - [отрицательно заряженный TTR]₂: [[положительно заряженный TTR] - [LX]]₂=[Ab DNP-3B1]. В общей сложности тестировали пять вариантов TTR с заряженными аминокислотами и три длины линкера (X=0, 4 и 10 аминокислот), в общей сложности 15 комбинаций (фиг. 21). Значительное количество необходимого гетеротетрамера TTR было образовано для многих комбинаций, оно составляло до 70% (фиг. 22). Кроме того, линкер из 4 аминокислот приводил к получению более высоких титров и выходов по сравнению с линкером из 0 аминокислот. С применением продуктов слияния Ab- и Fab-TTR, а также неслитых Ab в качестве стандартов для SEC, можно заметить, что молекула 15539 ([Ab 655-341]=[GGAGGGAGGG] - [TTR (C10A/K15A/L17D)]): [[TTR(C10A/K15A/V121K)] - [GGAGGGAGGG]]₂=[Ab DNP-3B1]), как было обнаружено, характеризуется временем удерживания основного пика, почти идентичным времени удерживания гомомультимера 2X-Ab-TTR (фиг. 23). Кроме того, если конструкцию оценивали посредством MS, сопряженной с SEC, молекулярная масса элюируемых разновидностей соответствовала молекулярной массе требуемого гетеротетрамера TTR (фиг. 24). Было выявлено, что в среднем линкер L4, по-видимому, приводит к высокому выходу в сочетании с высоким предпочтительным продуцированием требуемого продукта. Кроме того, комбинации мутаций L17K/T119D, V20K/V20D и V20R/V20D, по-видимому, приводят к высокой экспрессии и выходу. Наконец, комбинации мутаций L17K/V121E, V121K/L17D и V20K/V20D оказались наиболее эффективными в отношении управления требуемой сборкой гетеротетрамера TTR. См. фиг. 25.

Затем авторы настоящего изобретения попытались определить, может ли совместная экспрессия отрицательно заряженных и положительно заряженных вариантов TTR (4 каждой мутации), слитых с Ab и Fab, в одной и той же линии клеток приводить к продуцированию конструкций Ab-Fab-TTR (т.е. конструкций [Ab "A"]=[отрицательно заряженный TTR]₂: [[положительно заряженный TTR]=[Fab "B"]]₂). В общей сложности тестировали пять вариантов TTR в комбинации с тремя длинами линкеров (X=0, 4 и 10 аминокислот) и двумя Ab/Fab, в общей сложности 30 комбинаций (фиг. 26). Количество продуктов слияния на основе Ab, которые образовывали требуемую конструкцию Ab-Fab-TTR, при определении посредством SEC для многих комбинаций составляло не более 45,6% (фиг. 27). Кроме того, линкеры из 4 аминокислот и 10 аминокислот, по-видимому, приводят к получению большего количества требуемой конструкции Ab-Fab-TTR по сравнению с линкером из 0 аминокислот (на основании титра и выхода очищенного белка). С применением продуктов слияния Ab- и Fab-TTR, а также неслитых Ab в качестве стандартов для SEC, было обнаружено, что молекула 15545 ([Ab 655-341]=[GGGG] - [TTR(C10A/K15A/V20D)]): [[TTR(C10A/K15A/V20R)] - [GG] - [DNP-3B1-Fab]]₂) приводила к получению пика с удерживанием между гомомультимером 2X-Ab-TTR и гомомультимером 4X-Fab-TTR, как и ожидалось (фиг. 28). Кроме того, если эта молекула оценивается посредством MS, сопряженной с SEC, молекулярная масса элюируемых разновидностей соответствует требуемой конструкции (фиг. 29). Было обнаружено, что в среднем линкер L10 был предпочтительнее в конструкции Ab-Fab-TTR. Кроме того, по-видимому, мутации L17K/T119D TTR являются предпочтительными в конструкции Ab-Fab-TTR. См. фиг. 30.

Пример 4. Оценка конструкций гетеротетрамеров TTR с Fab, Ab и смешанных конструкций с Fab/Ab, содержащих варианты TTR с двумя мутациями в области контакта димер/димер TTR ("C10A/K15A/XX/YY") на субъединицу TTR, в клетках млекопитающих

Продукты слияния Ab- и Fab-TTR с двумя мутациями с заменой заряженных аминокислот в области контакта получали отдельно в клетках млекопитающих, как ранее описано для мутаций с заменой одной заряженной аминокислоты в области контакта. Титр, выход после аффинной хроматографии и характеристики оценивали посредством SEC, как описано ранее для мутаций с заменой одной заряженной аминокислоты в области контакта. Очищенные варианты с одной и двумя мутациями с заменой заряженных аминокислот затем смешивали тем же способом, что и при смешивании матриц, и смеси оценивали посредством SEC, как ранее описано для вариантов с заменой одной заряженной аминокислоты.

Продукты слияния Ab- и Fab-TTR с мутациями с заменой одной и двух заряженных аминокислот в области контакта получали посредством совместного культивирования клеток млекопитающих с противоположно заряженными вариантами TTR, как ранее описано для мутаций с заменой одной заряженной

аминокислоты в области контакта. Выход после аффинной хроматографии и характеристики оценивали посредством SEC, как описано ранее для мутаций с заменой одной заряженной аминокислоты в области контакта.

Результаты данных экспериментов можно найти на фиг. 31-40. Как можно видеть на фиг. 35 и 36, определенные комбинации вариантов приводили к заметному повышению количества образованного 4X-Fab по сравнению с количеством, полученным в случае простой смеси отдельно продуцируемых молекул перед смешиванием (определено посредством взятия среднего значения уровней для 4X-Fab перед смешиванием и вычитания этого значения из наблюдаемого значения для 4X-Fab). На фиг. 37 представлена иллюстрация этого явления посредством демонстрации того, что пик SEC 4X-Fab в случае смесей является намного большим, чем пики 4X-Fab перед смешиванием. Кроме того, определенные условия совместного культивирования приводили к образованию более высоких количеств 4X-Fab (фиг. 38 и 39). На фиг. 40 изображено, что пик 4X-Fab при совместном культивировании значительно больше, чем пики молекул 4X-Fab в случае раздельного культивирования, что указывает на возможное повышение количества образованного 4X-Fab в присутствии противоположно заряженных вариантов.

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
1	AA TTR человека	GPTGTGESKCPLMVKVLDAVRGSPAINVAVHVFRKAADDTWEP FASGKTSESGELHGLTTEEEFVEGIYKVEIDTKSYWKALGISPFHE HAEVVFTANDSGPRRYTIAALLSPYSYSTTAVVTNPKE
2	AA TTR мыши	GPAGAGESKCPLMVKVLDAVRGSPAVDVAVKVFKKTSEGSWEP FASGKTAESGELHGLTTDEKFVEGVYRVELDTKSYWKTLGISPF HEFADVFTANDSGHRHYTIAALLSPYSYSTTAVVSNPQN
3	NA, кодирующ	ACAGAAGTCCACTCATTCTTGGCAGGATGGCTTCTCATCGTCT

	ая TTR мышь	GCTCCTCCTCTGCCTTGCTGGACTGGTATTTGTGTCTGAGGCT GGCCCTACGGGCACCGGTGAATCCAAGTGCCTCTGATGGTC AAAGTTCTAGATGCTGTCCGAGGCAGTCCTGCCATCAATGTG GCCGTGCATGTGTTTCAGAAAGGCTGCTGATGACACCTGGGAG CCATTTGCCTCTGGGAAAACCAGTGAGTCTGGAGAGCTGCAT GGGCTCACAACTGAGGAGGAATTTGTAGAAGGGATATACAAA GTGGAATAGACACCAATCTTACTGGAAGGCACTTGGCATC TCCCCATTCCATGAGCATGCAGAGGTGGTATTCACAGCCAAC GACTCCGGCCCCCGCGCTACACCATTGCCGCCCTGCTGAGCC CCTACTCCTATTCCACCACGGCTGTCGTCACCAATCCCLAAGGA ATGAGGGACTTCTCCTCCAGTGGACCTGAAGGACGAGGGATG GGATTTTCATGTAACCAAGAGTATTCATTTTACTAAAGCACT GTTTTCACCTCATATGCTATGTTAGAAGTCCAGGCAGAGACA ATAAAACATTCTGTGAAAGGC
4	AA LC Ab DNP 3B1	<u>MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARDIQMTQSPSSLASEGDRVIT</u> CRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPLRFSGS GSGTEFTLTISSLQPEDFATYY CLQYNSYPWTF FGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF s YPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVT HQLSSPVTKSFNRGEC
5	NA, кодирующ ая LC Ab DNP 3B1	<u>ATGGACATGAGGGTGCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTG</u> <u>CTGTGGCTGAGAGGTGCGCGCTGTGACATCCAGATGACCCAG</u> TCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGAAGGAGACAGAGTCACCA TCACTTGCCGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGG CTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCGCTGAT CTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATTAAGGT TCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATCACTCTCACAATCA GCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACA GTATAATAGTTACCCGTGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGG TGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTT CCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTT GTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAAGTA CAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAG GAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAG CCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAA

		ACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAG CTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
6	AA LC Ab DNP 3B1 с CPM S230E (EU S176E)	<u>MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCDIQMTQSPSSLSASEGDRVTIT</u> CRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPLRFSGS GSGTEFTLTISLQPEDFATYY CLQYNSYPWTF GQGQTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSYSLSTLTLTKADYEEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
7	NA, кодируюш ая LC Ab DNP 3B1 с CPM S230E (EU S176E)	<u>ATGGACATGAGGGTGCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTG</u> <u>CTGTGGCTGAGAGGTGCGCGCTGTGACATCCAGATGACCCAG</u> TCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGAAGGAGACAGAGTCACCA TCACTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGG CTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCGCTGAT CTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATTAAGGT TCAGCGCAGTGGATCTGGGACAGAATCACTCTCACAAATCA GCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACA GTATAATAGTTACCCGTGGACGTT TCGGCCAAGGGACCAAGG TGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTT CCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTT GTGTGCCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTA CAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAG GAGAGTGCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAG CCTCGAAAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAA ACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAG CTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
8	AA HC Ab DNP 3B1	<u>MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVQLQESGPGLVKPSSETLSLT</u> CTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKLEWIGYIYYSGNTNSNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARTYYDSSGYYR AFDIWGQGT MVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT

		VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
9	NA, кодирующ ая HC Ab DNP 3B1	<p><u>ATGGACATGAGGGTGCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTG</u> <u>CTGTGGCTGAGAGGTGCGCGCTGTCAGGTGCAGCTGCAGGAG</u> TCGGGCCCAGGACTGGTTAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTC ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTAGTTACTACTGG AGCTGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGAT TGGGTATATCTATTACAGTGGGAACACCAACTCCAACCCC TCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAA GAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGA CACGGCCGTGTATTACTGTGCGGAGAACCTACTATGATAGTA GTGGTACTACTACCGTGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGG ACAATGGTACCGTCTCTAGTGCTCCACCAAGGGCCCATCG GTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCA CAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAAC CGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCG TGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTC CCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCAC CCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACAC CAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAATCTTGTGACAAAAC TCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGG ACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCCTC ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGAC GTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCAC CGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTG CAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAAC CATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTA CACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGT CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATA CAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT</p>

10	AA HC Ab DNP 3B1 с CPM S230K (EU S183K)	<p><u>MDMRVPAQLLGLLLWLRGARCQVQLQESGPGLVKPSETLSLT</u> CTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKLEWIGYIYYSGNTNSNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARTYYDSSGYYR AFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTEPAVLQSSGLYSLKSVVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>
11	NA, кодирующ ая HC Ab DNP 3B1 с CPM S230K (EU S183K)	<p><u>ATGGACATGAGGGTGCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTG</u> CTGTGGCTGAGAGGTGCGCGCTGTCAGGTGCAGCTGCAGGAG TCGGGCCCAGGACTGGTTAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTC ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTAGTTACTACTGG AGCTGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGACTGGAGTGGAT TGGGTATATCTATTACAGTGGAAACACCAACTCCAACCCC TCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAA GAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGA CACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAACCTACTATGATAGTA GTGGTTACTACTACCGTGCTTTTGATATCTGGGGCCAAAGGG ACAATGGTCACCGTCTCTAGTGCCTCCACCAAGGGCCCATCG GTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCA CAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTCCCCGAAC CGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGCG TGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTC CCTCAAGAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCAC CCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACAC CAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAAC TCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGG ACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCTC ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGAC GTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCCTCAC</p>

		CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTG CAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAAC CATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTA CACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGT CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATC GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAATA CAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTATAGCAAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT
12	AA HC Fab DNP 3B1	<u>MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVQLQESGPLVKPSETLSLT</u> CTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKLEWIGYIYYSGNTNSNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARTYYDSSGYYYR A FDIWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
13	AA HC Fab DNP 3B1	<u>ATGGACATGAGGGTGCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTG</u> <u>CTGTGGCTGAGAGGTGCGCGCTGT</u> CAGGTGCAGCTGCAGGAG TCGGGCCCAGGACTGGTTAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTC ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGT A GT A CT A CT G A GCTGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGACTGGAGTGGAT TGGGTATATCTATTACAGTGGGAACACCAACTCCAACCCC T CCCT C AAGAGT C GAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAA GAACCAAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGA CACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAACCT A CT A T G AT A G T G T G G T A CT A CT A CC G T G CT T T T GATATCTGGGGCCAAGGG ACAATGGTCACCGTCTCTAGTGCTCCACCAAGGGCCCATCG GTCTTCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCA CAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAAC CGGTGACGGTGTCTGGAATCAGGCGCCCTGACCAGCGGCG TGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTC CCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCAC CCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACAC CAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT
14	AA HC	<u>MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVQLQESGPLVKPSETLSLT</u>

	Fab DNP 3B1 с CPM S230K (EU S183K)	CTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKLEWIGYIYYSGNTNSNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARTYYDSSGYYR AFDIW GGQTMVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLKSVVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTRKVDKKVEPKSC
15	NA, кодирующая HC Fab DNP 3B1 с CPM S230K (EU S183K)	<u>ATGGACATGAGGGTGCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTG</u> <u>CTGTGGCTGAGAGGTGCGCGCTGTCAGGTGCAGCTGCAGGAG</u> TCGGGCCAGGACTGGTTAAGCCTTCGGAGACCCCTGTCCCTC ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGT AGTTACTACTGG AGCTGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGAT TGGGTATATCTATTACAGTGGGAACACCAACTCCAACCCC TCCCTCAAGAGT CGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAA GAACCACTTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGA CACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA ACCTACTATGATAGTA GTGGTTACTACTACCGTGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGG ACAATGGTCACCGTCTCTAGTGCCTCCACCAAGGGCCCATCG GTCTTCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGCA CAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCAGAAC CGGTGACGGTGTCTGGA ACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCG TGCACACCTTCCC GGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTC CCTCAAGAGCGTGGT GACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCAC CCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACAC CAAGGTGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT
16	AA LC Ab 655-341	<u>METPAQLLFLLLLWLPDITGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRA</u> SQGISRSELA WYQKPGQAPSLLIY GASSRAT GIPDRFSGSGSGT DFTLTISRLEPEDFAVYYC QQFGSSPWTF FGQGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPY PREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDYSLSSLTSLKADY EKHK VYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
17	NA, кодирующая LC Ab 655-341	<u>ATGGAAACCCAGCGCAGCTTCTTCTCCTCCTGCTACTCTGGC</u> <u>TCCAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAG</u> GCACCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGGCCACCCCTCCTCCTG CAGGGCCAGTCAGGGTATTAGTAGAAGCGAATTAGCCTGG TACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGCCTCCTCATCTAT GGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTACAG

		TGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAG ACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAACAATT TGGTAGTTCACCGTGGACGTT CGGCCAAGGGACCAAGGTGG AAATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTCTAGCGTTGT GTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACA GTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGA GAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCC TCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAC ACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCT CGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
18	AA LC Ab 655-341 c CPM S230K (EU S176K)	<u>METPAQLLFLLLWLPDITGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRA</u> SQGISRSELA WYQKPGQAPSLLIY GASSRAT GIPDRFSGSGGT DFTLTISRLEPEDFAVYYC QQFGSSPWT FGQGTKVEIKRTVAAP SVFIPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDYSLKSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
19	NA, кодирующ ая LC Ab 655-341 c CPM S230K (EU S176K)	<u>ATGGAACCCAGCGCAGCTTCTCTCCTCCTGCTACTCTGGC</u> <u>TCCCAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAG</u> GCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCTCTCCTG CAGGGCCAGTCAAGGTATTAGTAGAAGCGAATTAGCCTGG TACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGCCTCCTCATCTAT GGTGCATCCAGCAGGGCCACT GGCATCCCAGACAGGTTTCAG TGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAG ACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAACAATT TGGTAGTTCACCGTGGACGTT CGGCCAAGGGACCAAGGTGG AAATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTCTAGCGTTGT GTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACA GTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGA GAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCC TCAAGAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAA CACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGC TCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
20	AA HC Ab	<u>MKHLWFFLLLVAAPRWLSQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS</u>

	655-341	<p>GGSSSGDYFWSWIRQLPGKGLEWIGHIHNSGTTYNPSLKSRV TISVDTSKKQFSLRLSSVTAADTAVYYCARDDRGGDYAYGMDV WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>
21	NA, кодирующ ая HC Ab 655-341	<p><u>ATGAAGCACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCA</u> <u>GATGGGTCCTGTCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAG</u> GACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGT CTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGATTACTTCTGGAGCT GGATCCGCCAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGC ACATCCATAACAGTGGGACCACCTACTACAATCCGTCCT CAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAAGCA GTTCTCCCTGAGGCTGAGTTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCC GTATATTACTGTGCGAGAGATCGAGGGGGTACTACGCTTA TGGTATGGACGCTCTGGGGCCAAGGACCACGGTCACCGTCT CCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCCGCTTCCCCCTGGCACC CTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTG CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTG GAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGC TGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTG ACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC AACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAG AGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACC GTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCT TTCCCCCAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACC CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGA CTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAA</p>

		AGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAA AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATC CCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCT GGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTC CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCT CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT
22	AA HC Ab 655-341 с CPM S230E (EU S183E)	<u>MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSQVQLQESGPLVKPSQTL</u> SLTCTVS GGSSISG GDY FWSWIRQLPGKLEWIGH HIHNSGTTYNP SLKSRV TISVDTSKKQFSLRLSSVTAADTAVYYCARD DRGGDYAYGMDV WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLESVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
23	NA, кодируюш ая HC Ab 655-341 с CPM S230E (EU S183E)	<u>ATGAAGCACCTGTGGTTCTTCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCA</u> <u>GATGGGTCCCTGTCCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAG</u> GACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGT CTCTGGTGGCTCCATCAGCA CTGGTGATTACTTCTGGAGCT GGATCCGCCAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGC ACATCCATAACAGTGGGACCACCTACTACAATCCGTCCT CAAGAGT CGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAAGCA GTTCTCCCTGAGGCTGAGTTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCC GTATATTACTGTGCGAGAGAT CGAGGGGGT ACTAC GCTTA TGGTATGGACGTCT GGGGCCAAGGGACCACGGTCAACCGTCT CCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCACC CTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGCACAGCGCCCTGGGCTG CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTG GAACTCAGGCGCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGC TGTCTACAGTCTCAGGACTTACTCCCTCGAGAGCGTGGTG

		<p>ACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC AACGTGAATCACAAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAG AGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACC GTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTC TTCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACC CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGA CTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAA AGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAAACATCTCCAAGGCCAA AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATC CCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCT GGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTC CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTATAGCAAAGCT CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT</p>
24	AA HC Fab 655- 341	<p><u>MKHLWFLLLVAAPRWVLSQVQLQESGPLVKPSQTL</u>SLTCTVS GGSSISSGDYFWSWIRQLPGKLEWIGHHIHNSGTTYNPSLKSRV TISVDTSKKQFSLRLLSSVTAADTAVYYCARDDRGGDYAYGMDVDV WGQGTTVVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTSVWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC</p>
25	NA, кодируюш ая HC Fab 655-341	<p><u>ATGAAGCACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCA</u> GATGGGTCCTGTCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAG GACTGGTGAAGCTTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGT CTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGATTACTTCTGGAGCT GGATCCGCCAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGC ACATCCATAACAGTGGGACCACCTACTACAATCCGTCCCT CAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAAGCA GTCTCCCTGAGGCTGAGTTCTGTGACTGCCCGCGGACACGGCC GTATATTACTGTGCGAGAGATCGAGGGGGTACTACGCTTA TGGTATGGACCTTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCT CCTCAGCCTCCACCAAGGGCCATCCGTCTCCCCCTGGCACC CTCTCCAAGAGCACTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG CCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTACGGTGTCGTG GAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCTGCACACCTTCCCGGC TGCTCTACAGCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT</p>

		ACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC AACGTGAATCACAAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAG AGTTGAGCCCAAATCTTGT
26	AA HC Fab 655- 341 c CPM S230E (EU S183E)	MKHLWFLLLVAA PRWVLSQVQLQESGPGLVKPSQTL SLT CTV S GG SISSGDYF WSWIRQLPGKGLEWIGH HIHNSGTTYNP SLKSRV TISVDTSKKQFSLRLSSVTAADTAVYYCARD DRGGDYAYGMDV WGQGT TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLESVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSC
27	NA, кодирующ ая HC Fab 655-341 c CPM S230E (EU S183E)	<u>ATGAAGCACCTGTGGTCTCTCTCTCTGCTGGTGGCAGCTCCCA</u> <u>GATGGGTCTCTGCC</u> AGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAG GACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGT CTCTGGTGGCTCCATCAGCAG TGGTGATTACTTCTGGAGCT GGATCCGCCAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGC ACATCCATAACAGTGGGACCACCTACTACAATCCGTCCT CAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAAGCA GTTCTCCCTGAGGCTGAGTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCC GTATATTACTGTGCGAGAGAT CGAGGGGGTACTACGCTTA TGGTATGGACGCTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCT CCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCCGCTTCCCCCTGGCACC CTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTG GAACTCAGGGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGC TGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCGAGAGCGTGGTG ACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC AACGTGAATCACAAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAG AGTTGAGCCCAAATCTTGT
28	NA, кодирующ ая LC Ab DNP (конструк ция на основе TTR)	<u>ATGGACATGAGGGTGCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTG</u> <u>CTGTGGCTGAGAGGTGCGCGCTGTGACATCCAGATGACCCAG</u> TCTCCATCTCCCTGTCTGCATCTGAAGGAGACAGAGTACCA TCACTT GCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTAGG CTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCTAAGCGCCTGAT CTAT GCTGCATCCAGTTTGCAAAGT GGGGTCCCATTAAGGT TCAGCGCAGTGGATCTGGGACAGAATCACTCTCACAAATCA GCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTGCAACTTATTACTGTCT TACA GTATAATAGTTACCCGTGGACGTT CGGCCAAGGGACCAAGG

		TGGAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTT CCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGAACTGCCTCTGTT GTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTA CAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAG GAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAG CCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAA ACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAG CTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
29	AA LC Ab DNP (конструк ция на основе TTR)	<u>MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC</u> DIQMTQSPSSLSASEGDRVIT CRASQGI RNDL GWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPLRFSGS GSGTEFTLTISSLQPEDFATYY CLQYNSYPWTF GGQTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
30	NA, кодирующ ая HC Ab DNP (конструк ция на основе TTR)	<u>ATGGACATGAGGGTGCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTG</u> <u>CTGTGGCTGAGAGGTGCGCGCTGT</u> CAGGTGCAGCTGCAGGAG TCGGGCCCAGGACTGGTTAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTC ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGT AGTTACTACTGG AGCTGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGAT TGGGTATATCTATTACAGTGGGAACACCAACTCCAACCCC TCCCTCAAGAGT CGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAA GAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGA CACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAAC CTACTATGATAGTA GTGGTTACTACTACCGTGCCTTTTGATATCTGGGGCCAAAGG ACAATGGTCACCGTCTCTAGTGCCTCCACCAAGGGCCCATCG GTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGCA CAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAAC CGGTGACGGTGTCTGGAAC TACAGGCGCCCTGACCAGCGGGC TGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTC CCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCAC CCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACAC CAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAAC TCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGG ACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTC ATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGAC

		<p>GTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTG CAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAAC CATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTA CACCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGT CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATA CAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGAG GCGGTCCAACCTGGTACTGGTGAATCTAAAGCTCCTCTTATGGT TGCAGTCAAAGATGCTGTTTCGTGGTTCCCGGCAATTAATGTT GCTGTACATGTTTTCCGTAAAGCTGCTGACGACACCTGGGAA CCGTTCCGCTAGCGGTAACCTCCGAATCCGGTGAACCTGCAC GGTCTGACCACCGAAGAAGAATTCGTTGAAGGTATCTACAAA GTTGAAATCGACACCAAATCCTACTGGAAAGCTTTGGGTATC TCCCGTTCCACGAACACGCTGAAGTTGTTTACCAGCTAACG ACTCCGGTCCGCGTCGTTACACGATCGCTGCTCTGCTGTCCCC GTACTCCTACTCCACCACCGCTGTTGTTACCAACCCGAAAGAA</p>
31	AA LC Ab DNP 3B1 (конструк ция на основе TTR)	<p><u>MDMRVPAQLLGLLLWLRGARCQVQLQESGGLVKPSETLSLT</u> CTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKLEWIGYIYYSGNTNSNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARTYYDSSGYYR AFDIWGQTMVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGPTGTG ESKAPLMVAVKDAVRGSPAINVAVHVFKAADDTWEPFASGKTSSES GELHGLTTEEEFVEGIYKVEIDTKSYWKALGISPFHEHAEEVFTANDS</p>

		GPRRYTIAALLSPYSYSTTAVVTNPKE
32	НА, кодирующ ая LC Ab 655-341 (конструк ция на основе TTR)	<u>ATGGA AACCCAGCGCAGCTTCTCTCCTCCTGCTACTCTGGC</u> <u>TCCAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAG</u> GCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGACCACCTCCTCTG <u>CAGGGCCAGTCAGGGTATTAGTAGAAGCGAATTAGCCTGG</u> TACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGCCTCCTCATCTAT <u>GGTG CATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAG</u> TGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAG ACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAACAATT <u>TGGTAGTTCACCGTGGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGG</u> AAATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTCTAGCGTTGT GTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACA GTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGA GAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCC TCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAC ACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCT CGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
33	AA LC Ab 655-341 (конструк ция на основе TTR)	<u>METPAQLLFLLLWLPD TTGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRA</u> <u>SQGISRSELA WYQQKPGQAPSLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGT</u> DFLTISRLEPEDFAVYYCQQFGSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
34	НА, кодирующ ая HC Ab 655-341 (конструк ция на основе TTR)	<u>ATGAAGCACCTGTGGTTCTTCTCCTCCTGCTGGTGGCAGTCCCA</u> <u>GATGGGTCCCTGTCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAG</u> GACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGT CTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGATTACTTCTGGAGCT GGATCCGCCAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGC <u>ACATCCATAACAGTGGGACCACCTACTACAATCCGTCCCT</u> <u>CAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAAGCA</u> GTTCTCCCTGAGGCTGAGTTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCC GTATATTACTGTGCGAGAGATCGAGGGGGTGACTACGCTTA <u>TGGTATGGACGCTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCT</u> CCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCACC

		<p>CTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTG GAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGC TGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTG ACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC AACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAG AGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTACACATGCCACC GTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTC TCCCCCAAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCCTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGA CTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAA AGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAA AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATC CCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCT GGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAATGGGCAGCCGAGAAACAACAAGACCACGCCTC CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTATAGCAAGCT CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGAGGCGGTCCAATGG TACTGGTGAATCTAAAGCTCCTCTTATGGTTGCAGTCGATGAT GCTGTTCTGGTTCCCCGCAATTAATGTTGCTGTACATGTTT TCCGTAAGCTGCTGACGACACCTGGGAACCGTTCGCTAGCG GTAAAACCTCCGAATCCGGTGAAGTGCACGGTCTGACCACCG AAGAAGAATTCGTTGAAGGTATCTACAAAGTTGAAATCGACA CCAAATCCTACTGGAAAGCTTTGGGTATCTCCCGTTCCACGA ACACGCTGAAGTTGTTTTACCGCTAACGACTCCGGTCCGCGT CGTTACACGATCGCTGCTCTGCTGTCCCGTACTCCTACTCCA CCACCGCTGTTGTTACCAACCCGAAAGAA</p>
35	AA LC Ab 655-341 (конструк ция на	<p>MKHLWFLLLVAAPRWVLSQVQLQESGPLVKPSQTLSTCTVS GGSSISGDYFWSWIRQLPGKLEWIGHIHNSGTTYYNPSLKSrv TISVDTSKKQFSLRLSSVTAADTAVYYCARDRGGDYAYGMDV</p>

	основе TTR)	WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTEFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGPTGTGESKA PLMVAVDVAVRGSPAINVAVHVFRKAADDTWEPFASGKTSSEGLH GLTTEEFVEGIYKVEIDTKSYWKALGISPFHEHAIEVFTANDSGPRR YPIAALLSPYSYTTAVVTNPKE
36	NA, кодирующ ая LC Fab 655-341 (конструк ция на основе TTR)	<u>ATGGAACCCAGCGCAGCTTCTCTCCTCTGCTACTCTGGC</u> <u>TCCCAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAG</u> GCACCCTGTCTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTG <u>CAGGGCCAGTCAGGGTATTAGTAGAAGCGAATTAGCCTGG</u> TACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGCCTCCTCATCTAT <u>GGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGTTACG</u> TGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAG ACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAACAATT <u>TGGTAGTTCACCGTGGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGG</u> AAATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTCTAGCGTTGT GTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAAGTACA GTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGA GAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCC TCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAC ACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCT CGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
37	AA LC Fab 655- 341 (конструк ция на основе TTR)	<u>METPAQLLFLLLWLPDITGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRA</u> <u>SQGISRSELA</u> WYQQKPGQAPSLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGT DFTLTISRLEPEDFAVYYCQQFGSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
38	NA,	<u>ATGAAGCACCTGTGGTCTCTCCTCTGCTGGTGGCAGCTCCCA</u>

	кодирующ ая HC Fab 655-341 (конструк ция на основе TTR)	<p> <u>GATGGGTCCTGTCC</u>CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAG GACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGT CTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGATTACTTCTGGAGCT GGATCCGCCAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGC ACATCCATAACAGTGGGACCACCTACTACAATCCGTCCCCT CAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAAGCA GTTCTCCCTGAGGCTGAGTTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCC GTATATTACTGTGCGAGAGATCGAGGGGGTGACTACGCTTA TGGTATGGACGCTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCT CCTCAGCCTCCACCAAGGGCCATCCGTCTTCCCCCTGGCACC CTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTG GAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGC TGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTG ACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC AACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAG AGTTGAGCCCAAATCTTGTGGAGGAGGTCCAACTGGTACTGG TGAATCTAAAGCTCCTCTTATGGTTGCAGTCGATGATGCTGTT CGTGGTTCCCCGCAATTAATGTTGCTGTACATGTTTTCCGTA AAGCTGCTGACGACACCTGGGAACCGTTCGCTAGCGGTA CCTCCGAATCCGGTGAACTGCACGGTCTGACCACCGAAGAAG AATTCGTTGAAGGTATCTACAAAGTTGAAATCGACACCAAT CCTACTGGAAAGCTTTGGGTATCTCCCCGTTCCACGAACACGC TGAAGTTGTTTTACCGCTAACGACTCCGGTCCGCGCTCGTTAC ACGATCGCTGCTCTGCTGTCCCCGTACTCTACTCCACCACCG CTGTTGTTACCAACCCGAAAGAAGGGCGTCACCATCACCATC ACCAC </p>
39	AA HC Fab 655- 341 (конструк ция на основе TTR)	<p> MKHLWF<u>FLLLVA</u>APRWVLSQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS GGSISSGDYFWSWIRQLPGKLEWIGHHIHNSGTTYNPSLKSRV TISVDTSKKQFSLRLSSVTAADTAVYYCARDRGGDYAYGMDV WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCGGGPTGTGESKAPLMVAVD DAVRGSPAINVAVHVFRKAADDTWEPFASGKTSESGELHGLTTEEEF VEGIYKVEIDTKSYWKALGISPFHEHAEVVFTANDSGPRRYTIAALLSP </p>

		YSYSTAVVITNPKEGGHHHHHH
40	NA, кодирующ ая LC Fab DNP 3B1 (конструк ция на основе TTR)	<u>ATGGACATGAGGGTGCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTG</u> <u>CTGTGGCTGAGAGGTGCGCGCTGTGACATCCAGATGACCCAG</u> TCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGAAGGAGACAGAGTCACCA TCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTAGG CTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGAT CTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATTAAGGT TCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATCACTCTCACAAATCA GCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACA GTATAATAGTTACCCGTGGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGG TGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTCATCTT CCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGAACTGCCTCTGTT GTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTA CAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCAATCGGGTAACTCCCAG GAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAG CCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAA ACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAG CTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
41	AA LC Fab DNP 3B1 (конструк ция на основе TTR)	<u>MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCDIQMTQSPSLSASEGDRVTIT</u> <u>CRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPLRFSGS</u> GSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQYNSYPWTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
42	NA, кодирующ ая HC Fab DNP 3B1 (конструк ция на основе TTR)	<u>ATGGACATGAGGGTGCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTG</u> <u>CTGTGGCTGAGAGGTGCGCGCTGTGAGGTGCAGCTGCAGGAG</u> TCGGGCCAGGACTGGTTAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTC ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTAGTTACTACTGG AGCTGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGAT TGGGTATATCTATTACAGTGGGAACACCAACTCCAACCCC TCCCTCAAGAGT CGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAA GAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGA CACGGCCGTGATTACTGTGCGAGAACCTACTATGATAGTA GTGGTTACTACTACCGTGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGG ACAATGGTCACCGTCTCTAGTGCCTCCACCAAGGGCCCATCG

		GTCTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCA CAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAAC CGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCG TGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTC CCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCAC CCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACAC CAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGGAGGAG GTCCAACCTGGTACTGGTGAATCTAAAGCTCCTCTTATGGTTGC AGTCAAAGATGCTGTTTCGTGGTTCCCCGGCAATTAATGTTGCT GTACATGTTTTCCGTAAGCTGCTGACGACACCTGGGAACCG TTCGCTAGCGGTAACCTCCGAATCCGGTGAAGTGCACGGT CTGACCACCGAAGAAGAATTCGTTGAAGGTATCTACAAAGTT GAAATCGACACCAAATCCTACTGGAAAGCTTTGGGTATCTCC CCGTTCCACGAACACGCTGAAGTTGTTTTACCAGTAAACGACT CCGGTCCGCGTCTGTTACAGATCGCTGCTGCTGCTGCCCGTA CTCTACTCCACCACCGTGTGTTACCAACCCGAAAGAAGG CGGTCACCATCACCATCACCAC
43	AA HC Fab DNP 3B1 (конструк ция на основе TTR)	MDMRVPAQLLGLLLWLRGARCQVQLQESGPGLVKPSSETLSLT CTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKLEWIGYIYYSGNTNSNP SLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCART YYDSSGYYR AFDIW QGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCGG GPTGTGESKAPLM VAVKDAVRGSPAINVAHVFRKAADDTWEPFASGKTSSESGELHGLTT EEEFVEGIYKVEIDTKSYWKALGISPFHEHAEVVFTANDSGPRRYTIA ALLSPYSYSTTAVVTNPKEGGHHHHHH
44	NA, кодирующ ая TTR человека	GGTCCAACCTGGTACCGGTGAATCCAAGTGTCTCTGATGGTC AAAGTTCTAGATGCTGTCCGAGGCAGTCTGCCATCAATGTG GCCGTGCATGTGTTAGAAAGGCTGCTGATGACACCTGGGAG CCATTTGCCTCTGGGAAAACCAGTGAGTCTGGAGAGCTGCAT GGGCTCACAACCTGAGGAGGAATTTGTAGAAGGGATATACAAA GTGGAAATAGACACCAAATCTTACTGGAAGGCACCTGGCATC TCCCATTCCATGAGCATGCAGAGGTGGTATTACAGCCAAC GACTCCGGCCCCCGCGCTACACCATGCGCCCTGCTGAGCC CCTACTCCTATTCCACCACGGCTGTCGTCACCAATCCCAAGGA
		A

Подчеркивание=сигнальный пептид (сигнальный пептид может быть удален из любой аминокислотной последовательности или последовательности нуклеиновой кислоты, раскрытой в данном документе. Соответственно, последовательность с сигнальным пептидом и без него рассматривается конкретно для каждой аминокислотной последовательности и последовательности нуклеиновой кислоты, упомянутых в данном документе).

Жирный шрифт=CDR

Жирный шрифт+подчеркивание=линкер

Курсив=часть TTR слитого белка

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Белковый комплекс на основе транстиретина (TTR), где указанный белковый комплекс на основе TTR содержит субъединицы A, B, C и D TTR;

где субъединицы A и B TTR димеризуются с образованием димера AB TTR;

где субъединицы C и D TTR димеризуются с образованием димера CD TTR;

где димеры AB и CD TTR дополнительно димеризуются с образованием тетрамера ABCD TTR и

где каждая из A, B, C и D содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, за исключением того, что по меньшей мере одна аминокислота в области контакта между димером AB TTR и димером CD TTR подвергнута мутации таким образом, что образование тетрамера ABCD является более предпочтительным, чем образование тетрамера ABAB или тетрамера CDCD, и

где обе из А и В, обе из С и D или все четыре из А, В, С и D содержат мутацию в одном или нескольких аминокислотных положениях, выбранных из перечня, содержащего 6, 7, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 50, 51, 52, 53, 54, 56, 57, 60, 61, 62, 63, 78, 82, 83, 84, 85, 100, 101, 102, 103, 104, 106, 108, 110, 112, 113, 114, 115, 117, 119, 121, 123, 124, 125, 126 и 127 из SEQ ID NO: 1.

2. Белковый комплекс на основе TTR по п.1, где каждая из А, В, С и D содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1 со следующими мутациями: С10А, К15А или обеими мутациями из С10А и К15А.

3. Белковый комплекс на основе TTR по п.1 или 2, где обе из А и В, обе из С и D или все четыре из А, В, С и D содержат мутацию в одном или нескольких аминокислотных положениях, выбранных из перечня, содержащего 15, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 51, 52, 84, 106, 108, 112, 114, 115, 119, 121 и 123 из SEQ ID NO: 1.

4. Белковый комплекс на основе TTR по любому из пп.1-3, где обе из А и В, обе из С и D или все четыре из А, В, С и D содержат мутацию в одном или нескольких аминокислотных положениях, выбранных из перечня, содержащего 15, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 51, 52, 84, 106, 108, 112, 114, 115, 119, 121 и 123 из SEQ ID NO: 1,

где указанная аминокислота подвергнута мутации с заменой на аспарат или глутамат.

5. Белковый комплекс на основе TTR по любому из пп.1-3, где обе из А и В, обе из С и D или все четыре из А, В, С и D содержат мутацию в одном или нескольких аминокислотных положениях, выбранных из перечня, содержащего 15, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 51, 52, 84, 106, 108, 112, 114, 115, 119, 121 и 123 из SEQ ID NO: 1,

где указанная аминокислота подвергнута мутации с заменой на аргинин, лизин или гистидин.

6. Белковый комплекс на основе TTR по любому из пп.1-5, где А и В содержат мутацию в одном или нескольких аминокислотных положениях, выбранных из перечня, содержащего 15, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 51, 52, 84, 106, 108, 112, 114, 115, 119, 121 и 123 из SEQ ID NO: 1,

где указанная аминокислота подвергнута мутации с заменой на аспарат или глутамат.

7. Белковый комплекс на основе TTR по любому из пп.1-6, где С и D содержат мутацию в одном или нескольких аминокислотных положениях, выбранных из перечня, содержащего 15, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 51, 52, 84, 106, 108, 112, 114, 115, 119, 121 и 123 из SEQ ID NO: 1,

где указанная аминокислота подвергнута мутации с заменой на аргинин, лизин или гистидин.

8. Белковый комплекс на основе TTR по любому из пп.1-3, где

А и В содержат мутацию в одном или нескольких аминокислотных положениях, выбранных из перечня, содержащего 15, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 51, 52, 84, 106, 108, 112, 114, 115, 119, 121 и 123 из SEQ ID NO: 1, где указанная аминокислота подвергнута мутации с заменой на аспарат или глутамат, и

С и D содержат мутацию в одном или нескольких аминокислотных положениях, выбранных из перечня, содержащего 15, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 51, 52, 84, 106, 108, 112, 114, 115, 119, 121 и 123 из SEQ ID NO: 1, где указанная аминокислота подвергнута мутации с заменой на аргинин, лизин или гистидин.

9. Белковый комплекс на основе TTR по любому из пп.1-6 и 8, где А и В содержат по меньшей мере одну мутацию в SEQ ID NO: 1, где указанная мутация выбрана из перечня, содержащего К15D, L17D, V20D, R21D, G22D, S23D, P24D, S52D, I84D, T106D, A108D, S112D, Y114D, S115D, T119D, V121D, S123D, K15E, L17E, V20E, R21E, G22E, S23E, P24E, D51E, S52E, I84E, T106E, A108E, S112E, Y114E, S115E, T119E, V121E и S123E.

10. Белковый комплекс на основе TTR по п.9, где А и В содержат по меньшей мере одну мутацию в SEQ ID NO: 1, где указанная мутация выбрана из перечня, содержащего L17D, L17E, V20D, V20E, G22D, G22E, S112D, S112E, T119D, T119E, V121D и V121E.

11. Белковый комплекс на основе TTR по любому из пп.1-5, 7 и 8, где С и D содержат по меньшей мере одну мутацию в SEQ ID NO: 1, где указанная мутация выбрана из перечня, содержащего К15R, L17R, V20R, G22R, S23R, P24R, D51R, S52R, I84R, T106R, A108R, S112R, Y114R, S115R, T119R, V121R, S123R, L17K, V20K, R21K, G22K, S23K, P24K, D51K, S52K, I84K, T106K, A108K, S112K, Y114K, S115K, T119K, V121K, S123K, K15H, L17H, V20H, R21H, G22H, S23H, P24H, D51H, S52H, I84H, T106H, A108H, S112H, Y114H, S115H, T119H, V121H и S123H.

12. Белковый комплекс на основе TTR по п.11, где С и D содержат по меньшей мере одну мутацию в SEQ ID NO: 1, где указанная мутация выбрана из перечня, содержащего L17R, L17K, L17H, V20R, V20K, V20H, G22R, G22K, G22H, S112R, S112K, S112H, T119R, T119K, T119H, V121R, V121K и V121H.

13. Белковый комплекс на основе TTR по любому из пп.1-12, где обе из А и В, обе из С и D или все четыре из А, В, С и D независимо содержат одну указанную мутацию.

14. Белковый комплекс на основе TTR по любому из пп.1-12, где обе из А и В, обе из С и D или все четыре из А, В, С и D независимо содержат две указанные мутации.

15. Белковый комплекс на основе TTR по любому из пп.1-14, где каждая из А, В, С и D содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1 со следующими мутациями:

обе из А и В содержат С10А/К15А/Л17D, и обе из С и D содержат С10А/К15А/Л17R;

обе из А и В содержат С10А/К15А/Л17Е, и обе из С и D содержат С10А/К15А/Л17R;

обе из А и В содержат С10А/К15А/V20D, и обе из С и D содержат С10А/К15А/Л17R;

присоединен к 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 антигенсвязывающим белкам посредством линкера.

24. Белковый комплекс на основе TTR по любому из пп.19-22, где указанный белковый комплекс на основе TTR непосредственно присоединен к 1, 2, 3 или 4 антигенсвязывающим белкам или присоединен к 1, 2, 3 или 4 антигенсвязывающим белкам посредством линкера.

25. Белковый комплекс на основе TTR по п.24, где указанный линкер представляет собой линкер на основе аминокислот, содержащий 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 или 60 аминокислот.

26. Белковый комплекс на основе TTR по п.25, где указанный линкер представляет собой линкер на основе аминокислот, содержащий 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 аминокислот.

27. Белковый комплекс на основе TTR по п.26, где указанный линкер представляет собой линкер на основе аминокислот, содержащий 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот.

28. Белковый комплекс на основе TTR по п.27, где указанный линкер представляет собой линкер на основе аминокислот, содержащий 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот.

29. Белковый комплекс на основе TTR по п.25, где указанный линкер представляет собой G, GG, GGG, GGGG, GGGGG, GGGGGG, GGGGGGG, GGGGGGGG, GGGGGGGGG или GGGGGGGGGG.

30. Белковый комплекс на основе TTR по п.25, где указанный линкер представляет собой $G(G_xB_y)_rG_z$ и где

G представляет собой глицин;

B представляет собой любую аминокислоту;

x равняется 1-15;

y равняется 1-5;

z равняется 1-15 и

r равняется 1-20.

31. Белковый комплекс на основе TTR по п.29, где

B представляет собой Q, S, A, E, P, T, K, R, D или N;

x равняется 4;

y равняется 1;

z равняется 4 и

r равняется 1.

32. Белковый комплекс на основе TTR по п.25, где указанный линкер выбран из перечня, содержащего GG, GGGG, GGGSGG, GGGSGGGG и GGAGGGAGGG.

33. Белковый комплекс на основе TTR по любому из пп.19-32, где указанный белковый комплекс на основе TTR присоединен к двум антигенсвязывающим белкам, где указанные антигенсвязывающие белки связывают разные антигены.

34. Белковый комплекс на основе TTR по любому из пп.19-32, где указанный белковый комплекс на основе TTR присоединен к четырем антигенсвязывающим белкам, где указанные антигенсвязывающие белки связываются с по меньшей мере двумя разными антигенами.

35. Белковый комплекс на основе TTR по любому из пп.19-34, где антигенсвязывающие белки представляют собой антитела.

36. Белковый комплекс на основе TTR по любому из пп.19-34, где антигенсвязывающие белки представляют собой Fab или scFv.

37. Белковый комплекс на основе TTR по п.36, где антигенсвязывающие белки представляют собой Fab.

38. Белковый комплекс на основе TTR по любому из пп.19-34, где антигенсвязывающие белки представляют собой смесь антител и Fab.

39. Фармацевтическая композиция, содержащая белковый комплекс на основе TTR по любому из пп.1-38.

40. Способ лечения рака с применением белкового комплекса на основе TTR по любому из пп.1-38.

41. Применение белкового комплекса на основе TTR по любому из пп.1-38 в лечении рака.

42. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая субъединицу TTR, субъединицу TTR, слитую или связанную с антигенсвязывающим белком или пептидом (таким как антитело или Fab), или белковый комплекс на основе TTR по любому из пп.1-38.

43. Набор выделенных нуклеиновых кислот, кодирующих субъединицу TTR, субъединицу TTR, слитую или связанную с антигенсвязывающим белком или пептидом (таким как антитело или Fab), или белковый комплекс на основе TTR по любому из пп.1-38.

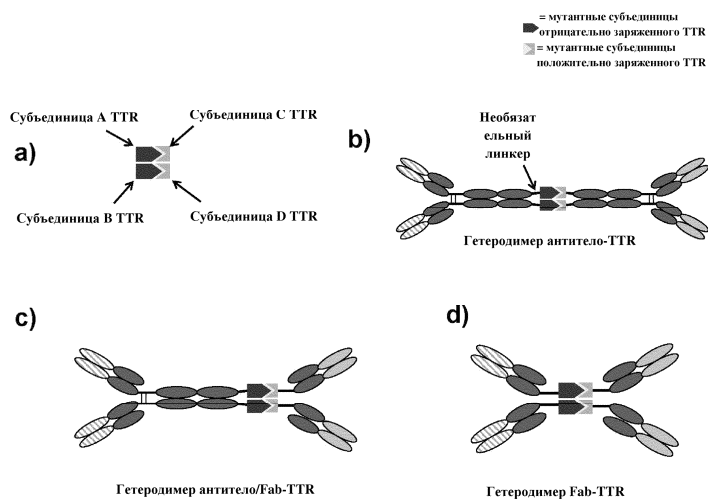
44. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п.42 или набор выделенных нуклеиновых кислот по п.43.

45. Рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п.42, набор выделенных нуклеиновых кислот по п.43 или вектор по п.44.

46. Рекомбинантная клетка-хозяин по п.45, где указанная клетка-хозяин представляет собой клетку яичника китайского хомячка (CHO), клетку E5, клетку почки новорожденного хомячка (ВНК), клетку почки обезьяны (COS), клетку гепатоцеллюлярной карциномы человека или клетку эмбриональной почки человека 293 (HEK 293).

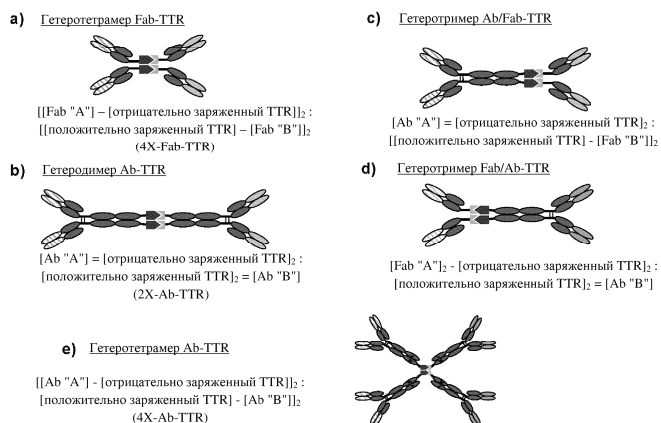
47. Способ получения белкового комплекса на основе TTR по любому из пп.1-38, при этом указанный способ включает:

- культивирование рекомбинантной клетки-хозяина по п.45 или 46 и
- выделение белкового комплекса на основе TTR из указанной культуры.



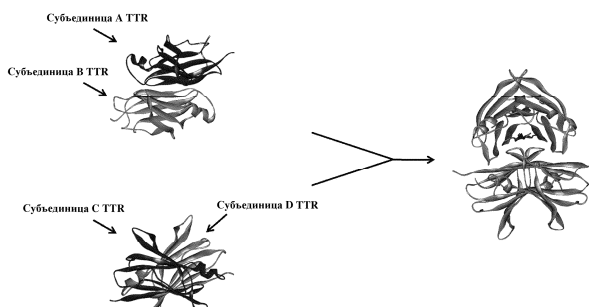
Фиг. 1

Иллюстративный гетеромерный TTR – бивалентные биспецифические конструкции Ab/Fab



Фиг. 2

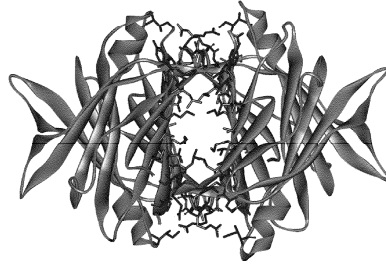
Области контакта при димеризации и тетрамеризации TTR



Фиг. 3

Остатки в области контакта при тетрамеризации исследовали для идентификации остатков, которые способны модулировать связывание

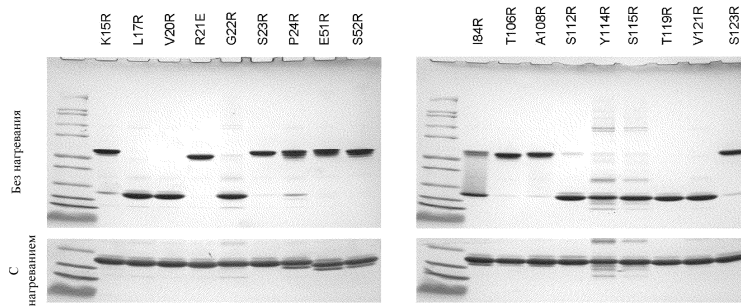
K15R I84R
 L17R T106R
 V20R A108R
 R21E S112R
 G22R Y114R
 S23R S115R
 P24R T119R
 D51R V121R
 S52R S123R



Мономеры TTR содержали мутации С10А/К15А в дополнение к перечисленным выше в МК-6Н-GG-DEVD-TTR

Фиг. 4

Многие варианты демонстрируют диссоциацию тетрамера в присутствии SDS



Фиг. 5

Влияние неденатурирующих условий на варианты TTR

Вариант	Выход (мг)	SEC	SDS-PAGE	TM
K15R	132	Тетрамер	Тетрамер	>95
R21E	120	Тетрамер	Тетрамер	= ниже 5С
S23R	126	Тетрамер	Тетрамер	>95
E51R	75	Тетрамер	Тетрамер	>95
S52R	93	Тетрамер	Тетрамер	>95
T106R	106	Тетрамер	Тетрамер	>95
A108R	127	Тетрамер	Тетрамер	>95
T123R	137	Тетрамер	Тетрамер	>95
P24R	127	Тетрамер	Тет./димер	91
I84R	138	Тетрамер	Тет./димер	87
L17R	134	Тетрамер	Димер	55
V121R	88	Тетрамер	Димер	54
V20R	155	Димер	Димер	ND
G22R	81	Димер	Димер	ND
S112R	83	Димер	Димер	ND
T119R	142	Димер	Димер	ND
Y114R	21	Димер	Димер	ND
S115R	27	Димер	Димер	ND

Фиг. 6

Несколько комбинаций вариантов TTR образуют гетеротетраммерные комплексы

Вариант	L17D	L17E	V20D	V20E	G22D	G22E	S112D	S112E	T119D	T119E	V121D	V121E
L17R	89	85	29	79	27	33	53	25	100	100	83	85
L17K	89	85	80	73	33	27	54	25	100	100	84	100
V20R	78	72	96	92	5	2	13	1	19	6	4	66
V20K	87	78	96	92	15	12	44	37	69	44	22	79
G22R	40	3	0	0	3	1	4	2	1	1	0	36
G22K	37	2	0	0	2	2	3	1	1	1	0	27
S112R	3	4	10	8	5	4	7	3	5	5	4	4
S112K	0	0	6	4	2	1	3	1	0	2	2	0
T119R	94	90	0	3	3	1	5	2	87	92	1	83
T119K	85	77	3	4	6	1	5	4	52	48	5	40
V121R	100	100	0	0	44	42	0	0	78	57	46	89
V121K	100	93	0	0	48	49	0	0	80	62	60	88

Вариант	L17D	L17E	V20D	V20E	G22D	G22E	S112D	S112E	T119D	T119E	V121D	V121E
L17R	T/D	D	T*/D	D	D	D	D	D	T	T/D	T/D	T/D
L17K	T/D	D	T*/D	D	D	D	D	D	T	T/D	T/D	T
V20R	D	D	T	D	D	D	T*/D	D	D	D	D	D
V20K	T*/D	T*/D	T	D	D	D	T*/D	T*/D	T*/D	T*/D	T*/D	T*/D
G22R	T*/D	D	T*/D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
G22K	T*/D	D	T*/D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
S112R	D	D	T*/D	T*/D	D	D	D	D	D	D	D	D
S112K	D	D	T*/D	T*/D	D	D	D	D	D	D	D	D
T119R	T*/D	D	T*/D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
T119K	T*/D	D	T*/D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
V121R	T	T	T*/D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
V121K	T	T/D	T*/D	D	D	D	D	D	D	D	D	D

"D" относится к образованию преимущественно димера

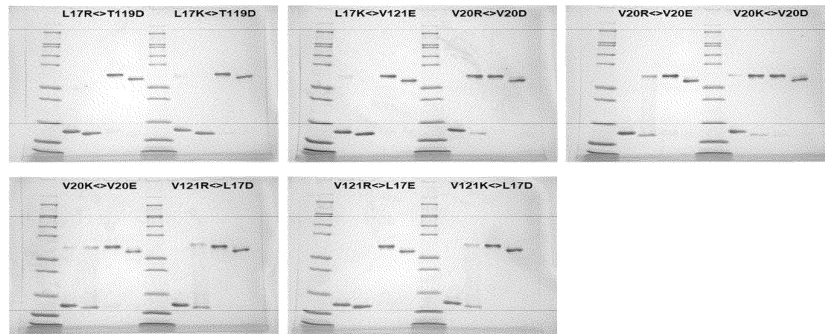
"T" относится к образованию преимущественно гетеротетрамера

T-/D, T/D и T/D- означают больше димера, чем гетеротетрамера, примерно равное количество димера/гетеротетрамера и образование большего количества гетеротетрамера, чем димера соответственно

T* относится к тетрамерам, вероятно содержащим значительное количество гомотетрамера (т. е. к тетрамерам, содержащим четыре отрицательно заряженных варианта TTR или четыре положительно заряженных варианта TTR)

Фиг. 7

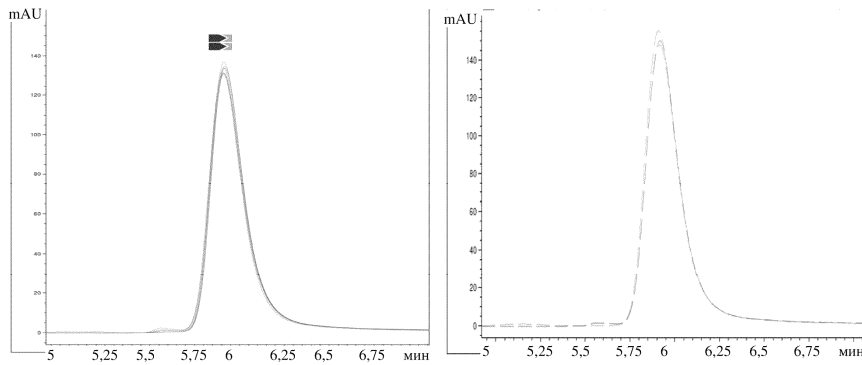
Гетеродимеризация, подтвержденная протеолизом и SDS-PAGE



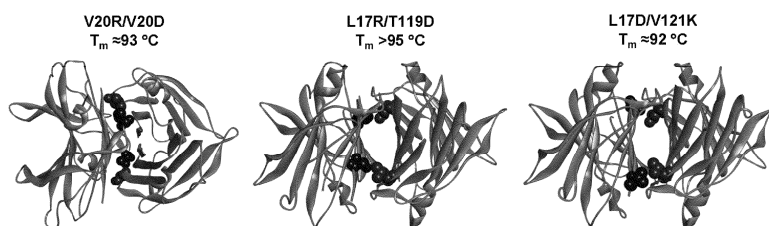
Дорожки (слева направо): Маркеры, основной вариант, кислый вариант, комбинация, комбинация+ калпаза
 основной вариант = 6H-GG-DEVD-TTR
 кислый вариант = 6H-GG-TTR

Фиг. 8

Гетеродимеры демонстрируют стабильность при pH 5,0 по результатам анализа посредством SEC

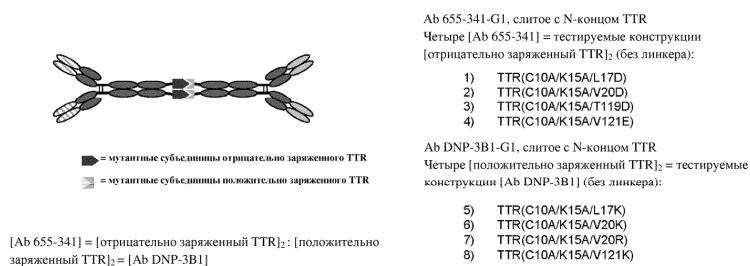


Фиг. 9

Гетеротетрамеры TTR успешно получали в *E. coli*

Фиг. 10

Экспрессия гетеродимера Ab-TTR по отдельности



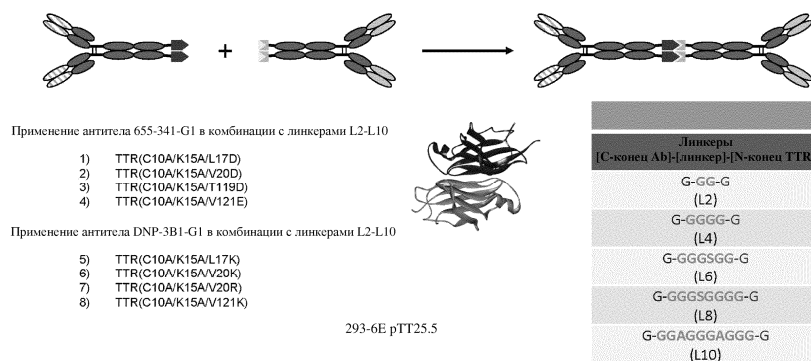
Фиг. 11

Продукт слияния Ab-TTR демонстрирует нестабильность и самодимеризацию по результатам SEC

Конструкция	Белок А > SP-HP			Белок А > замена буфера G25		
	Самеоассоциированный (%)	Свободный продукт слияния Ab/TTR (%)	HMW (%)	Самеоассоциированный (%)	Свободный продукт слияния Ab/TTR (%)	HMW (%)
DNP-3B1-L17K	38	32	28	68	7	16
DNP-3B1-V20K	39	19	38	62	20	8
DNP-3B1-V20R	47	12	38	75	21	1
DNP-3B1-V121K	32	33	35	64	10	16
655-341-L17D	56	23	18			
655-341-V20D	62	17	19			
655-341-T119D	69	11	18			
655-341-V121E	57	12	28			

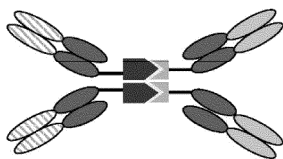
Фиг. 12

Набор удлиненных линкеров и гетеродимеры Ab-TTR при культивировании по отдельности



Фиг. 13

Совместная экспрессия гетеротетрамера Fab-TTR



Совместное продуцирование [Fab 655-341] – [GG] – [отрицательно заряженный TTR] и [положительно заряженный TTR] – [GG] – [Fab DNP-3B1] (каждый в слитом виде с N-концом TTR посредством линкера GG):

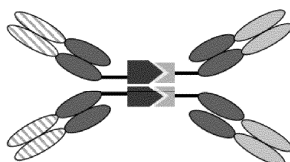
- TTR(C10A/K15A/L17D) + TTR(C10A/K15A/V121R)
- TTR(C10A/K15A/V20D) + TTR(C10A/K15A/V20K)
- TTR(C10A/K15A/V20D) + TTR(C10A/K15A/V20R)
- TTR(C10A/K15A/T119D) + TTR(C10A/K15A/L17K)
- TTR(C10A/K15A/V121E) + TTR(C10A/K15A/L17K)

Фиг. 17

Совместная экспрессия гетеротетрамера Fab-TTR

BioReg	Линкер	Мутация 3В1	Мутация 655	Выход (мг/л)	SEC, НММВ (%)	SEC, требуемое количество тетрамера +/- Fab-TTR (%)	SEC, LMW (%)	SEC-MS	SDS PAGE
15527-1	G2	L17K	T119D	234,0	3,3	83,6	13,12	4,0	2,0
15528-1	G2	L17K	V121E	206,3	2,3	82,3	15,34	4,0	3,0
15524-1	G2	V121R	L17D	222,3	0,1	87,7	12,16	4,0	3,0
15525-1	G2	V20K	V20D	196,9	3,4	83,1	13,43	4,0	3,0
15526-1	G2	V20R	V20D	190,8	4,6	78,1	17,33	4,0	1,0

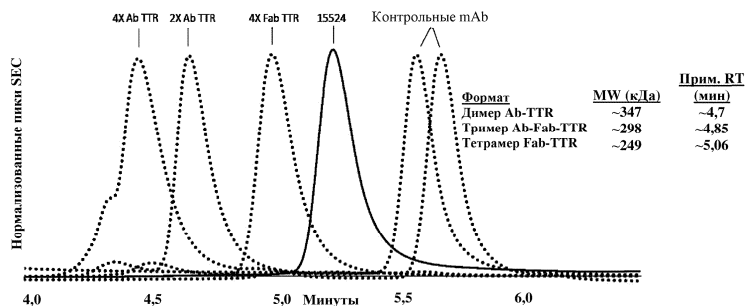
Требуемое количество тетрамера +/- Fab-TTR:



SEC-MS, ключевое значение	
4	Требуемый продукт >> другой продукт
3	Требуемый продукт >= другой продукт
2	Требуемый продукт < другой продукт
1	Требуемый продукт << другой продукт

Фиг. 18

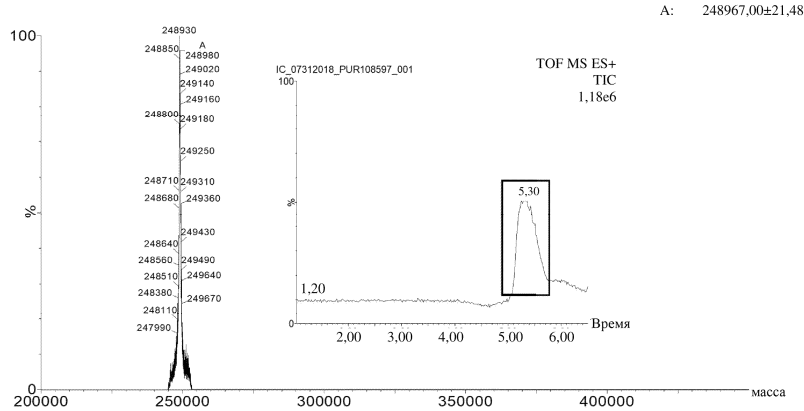
Совместная экспрессия гетеротетрамера Fab-TTR 15524 по результатам SEC со стандартами



4X Ab TTR = контрольный [Ab 655-341]₄ – [TTR (C10A/K15A)]
 2X Ab TTR = контрольный [Ab 655-341]₂ – [TTR (C10A/K15A)]
 4X Fab TTR = контрольный [Fab 655-341]₄ – [TTR (C10A/K15A)]
 15524 = [[Fab 655-341] – [GG] – [отрицательно заряженный TTR]]₂ : [[положительно заряженный TTR] – [GG] – [Fab DNP-3B1]]₂

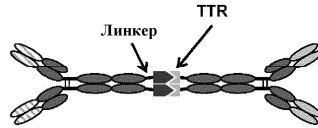
Фиг. 19

Совместная экспрессия гетеротетрамеров Fab-TTR по результатам SEC-MS и SDS-PAGE 15524



Фиг. 20

Совместная экспрессия гетеродимера Ab-TTR



Совместная экспрессия [Ab 655-341] = [[LX] – [отрицательно заряженный TTR]]₂ и [[положительно заряженный TTR] – [LX]]₂ = [Ab DNP-3B1] (Каждый в слитом виде с N-концом TTR посредством линкера):

- TTR(C10A/K15A/L17D) + TTR(C10A/K15A/V121R); X = 0, 4 и 10
- TTR(C10A/K15A/V20D) + TTR(C10A/K15A/V20K); X = 0, 4 и 10
- TTR(C10A/K15A/V20D) + TTR(C10A/K15A/V20R); X = 0, 4 и 10
- TTR(C10A/K15A/T119D) + TTR(C10A/K15A/L17K); X = 0, 4 и 10
- TTR(C10A/K15A/V121E) + TTR(C10A/K15A/L17K); X = 0, 4 и 10

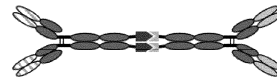
Без линкера (X = 0)
GGGG (X = 4)
GGAGGGAGGG (X = 10)

Фиг. 21

Совместная экспрессия гетеродимера Ab-TTR (отсортировано по линкеру)

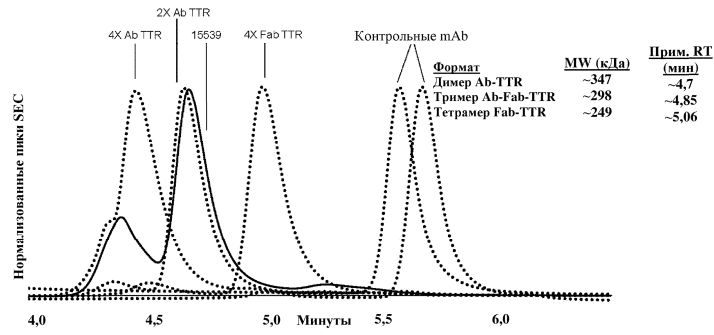
BioReg	Линкер	Мутация 3B1	Мутация 655	Титр (мг/л)	Выход (мг/л)	SEC, HMW (%)	SEC, требуемое количество гетеротетрамера TTR (X)	SEC, неассоциированный димер TTR (%)	SEC-MS
15534-1	L0	V121K	L17D	90,4	80,7	35,3	59,1	5,6	2,0
15535-1	L0	V20K	V20D	141,7	120,8	27,8	61,7	10,5	4,0
15536-1	L0	V20R	V20D	122,0	112,0	37,1	57,1	5,8	2,0
15537-1	L0	L17K	T119D	156,4	122,3	42,9	49,9	7,2	2,0
15538-1	L0	L17K	V121E	98,2	89,6	20,9	70,2	8,9	2,0
15529-1	L4	V121K	L17D	147,6	134,7	49,4	46,0	4,6	2,0
15530-1	L4	V20K	V20D	236,8	174,5	38,6	54,0	7,4	2,0
15531-1	L4	V20R	V20D	259,0	182,7	44,0	51,3	1,8	3,0
15532-1	L4	L17K	T119D	218,1	161,6	49,1	45,8	5,1	2,0
15533-1	L4	L17K	V121E	198,9	140,3	25,8	68,4	5,8	3,0
15539-1	L10	V121K	L17D	143,2	119,7	26,4	66,1	7,5	4,0
Без эксп.	L10	V20K	V20D						
15540-1	L10	V20R	V20D	213,2	175,1	60,5	33,9	5,6	2,0
15541-1	L10	L17K	T119D	214,8	162,1	56,9	38,7	4,3	3,0
15542-1	L10	L17K	V121E	179,7	134,1	35,7	58,2	6,1	3,0

SEC-MS, ключевое значение	
4	Требуемый продукт >> другой продукт
3	Требуемый продукт >= другой продукт
2	Требуемый продукт < другой продукт
1	Требуемый продукт << другой продукт



Фиг. 22

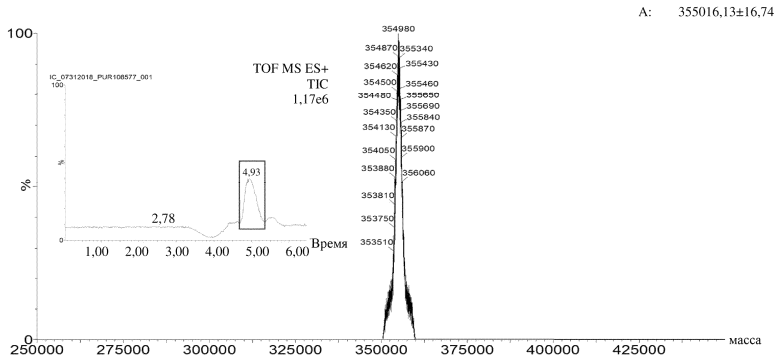
Совместная экспрессия гетеродимера Ab-TTR 15539 по результатам SEC со стандартами



4X Ab TTR = контрольный [Ab 655-341]₄-[TTR (C10A/K15A)]
 2X Ab TTR = контрольный [Ab 655-341]₂-[TTR (C10A/K15A)]
 4X Fab TTR = контрольный [Fab 655-341]₄-[TTR (C10A/K15A)]
 15539 = [Ab 655-341] = [[GGAGGGAGGG] - [TTR(C10A/K15A/L17D)]]₂ : [[TTR(C10A/K15A/V121K) - [GGAGGGAGGG]]₂ = [Ab DNP-3B1]

Фиг. 23

Совместная экспрессия гетеродимера Ab-TTR 15539-1 (L10/A), MS, SEC и NR SDS-PAGE нативных белков



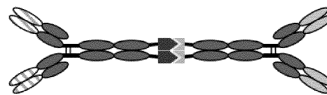
Фиг. 24

Средние уровни совместной экспрессии гетеродимера Ab-TTR

Линкер	Титр (мг/л)	Выход (мг/л)	SEC, % HMW	SEC, % 2X-Ab	SEC, % 1X-Ab	SEC-MS
L0	121,7	105,1	32,8	59,6	7,6	2,4
L4	212,1	158,8	41,4	53,1	5,5	2,4
L10	187,7	147,8	44,9	49,2	5,9	3,0

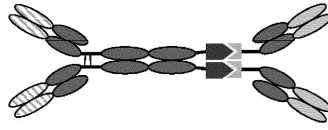
Мутация	Титр (мг/л)	Выход (мг/л)	SEC, % HMW	SEC, % 2X-Ab	SEC, % 1X-Ab	SEC-MS
L17K/T119D	196,4	148,7	49,7	44,8	5,5	2,3
L17K/V121E	158,9	121,3	27,5	65,6	6,9	2,7
V121K/L17D	127,1	111,7	37,0	57,1	5,9	2,7
V20K/V20D	189,3	147,7	33,2	57,9	8,9	3,0
V20R/V20D	198,1	156,6	47,2	47,4	5,4	2,3

SEC-MS, ключевое значение	
4	Требуемый продукт >> другой продукт
3	Требуемый продукт >= другой продукт
2	Требуемый продукт < другой продукт
1	Требуемый продукт << другой продукт



Фиг. 25

Совместная экспрессия гетеротримера Ab-Fab-TTR (REQ100397)



Совместная экспрессия [Ab 655-341]₄ - [отрицательно заряженный TTR]₂ и [[положительно заряженный TTR] - [GG] - [Fab DNP-3B1]]₂:

- TTR(C10A/K15A/L17D) + TTR(C10A/K15A/V121K)
- TTR(C10A/K15A/V20D) + TTR(C10A/K15A/V20K)
- TTR(C10A/K15A/V20D) + TTR(C10A/K15A/V20R)
- TTR(C10A/K15A/T119D) + TTR(C10A/K15A/L17K)
- TTR(C10A/K15A/V121E) + TTR(C10A/K15A/L17K)
- TTR(C10A/K15A/L17D) + TTR(C10A/K15A/V121K)
- TTR(C10A/K15A/V20D) + TTR(C10A/K15A/V121R)
- TTR(C10A/K15A/V20D) + TTR(C10A/K15A/V20R)
- TTR(C10A/K15A/T119D) + TTR(C10A/K15A/L17K)
- TTR(C10A/K15A/V121E) + TTR(C10A/K15A/L17K)

Линкеры LX:

Без линкера (X = 0)

GGGG (X = 4)

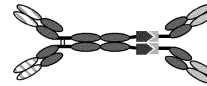
GGAGGGAGGG (X = 10)

Фиг. 26

Совместная экспрессия гетеротримера Ab-Fab-TTR (отсортировано по линкеру)

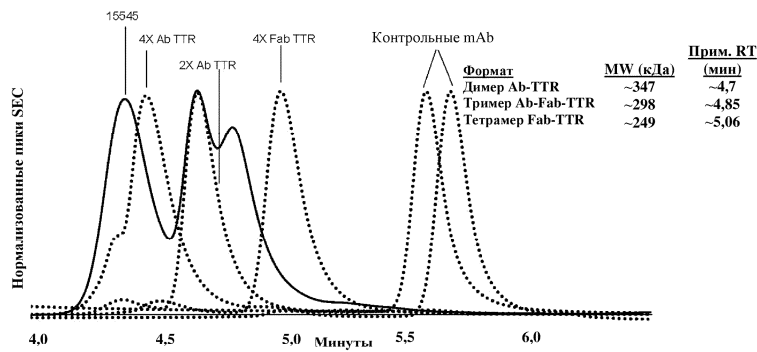
№№Reg	Ab-номер	Fab-номер	Мутации в TTR: DNP-3B1-Ab	Мутации в TTR: DNP-3B1-Fab	Мутации в TTR: DNP-3B1-Fab с 655-Fab	Темп (ml/min)	Выход (mg/dl)	SEC, HDW (%)	SEC, трюбовое содержание (Ab/Fab, %)	SEC, LMW (%)	SEC-MS
15548-1	L10	G2		L17D	V121E	81.4	87.3	72.4	73.7	2.2	1.0
15549-1	L10	G2		V20D	V20K	76.9	84.3	78.1	77.0	3.8	2.0
15550-1	L10	G2		V20D	V20R	87.2	91.4	86.3	89.9	3.2	2.0
15551-1	L10	G2		T119D	L17K	121.4	127.7	108.0	104.0	3.8	2.0
15552-1	L10	G2		V121E	L17K	76.7	73.0	77.5	76.2	4.3	2.0
15563-1	L10	G2	V121K			88.0	88.0	85.4	81.4	2.9	2.0
15564-1	L10	G2	V20K			127.8	133.4	125.5	120.0	2.6	2.0
15565-1	L10	G2	V20R			107.0	103.4	67.9	2.9	2.1	4.0
15566-1	L10	G2	L17K			118.5	103.7	62.5	3.4	2.9	2.0
15567-1	L10	G2	L17K		V121E						
15543-1	L4	G2		L17D	V121E	116.5	129.1	84.5	108	5.5	2.0
15544-1	L4	G2		V20D	V20K	153.1	130.0	84.4	124	2.8	2.0
15545-1	L4	G2		V20D	V20R	153.1	129.2	86.6	78.8	3.0	2.0
15546-1	L4	G2		T119D	L17K	141.6	148.8	85.0	110.0	3.5	2.0
15547-1	L4	G2		V121E	L17K	134.8	118.1	75.5	20.5	4.0	2.0
15548-1	L4	G2	V121K			196.7	135.2	72.8	23.8	3.3	2.0
15549-1	L4	G2	V20K			210.5	158.6	81.8	15.6	2.6	2.0
15550-1	L4	G2	V20R			196.8	166.6	85.6	12.4	2.6	2.0
15561-1	L4	G2	L17K			169.4	158.1	71.3	25.6	2.5	2.0
15562-1	L4	G2	L17K		V121E	187.3	154.1	75.4	23.8	3.0	2.0
15553-1	L10	G2		L17D	V121E	170.0	140.1	66.0	28.1	5.0	2.0
15554-1	L10	G2		V20D	V20K	199.9	155.7	76.7	20.0	2.4	2.0
15555-1	L10	G2		V20D	V20R	180.2	143.4	72.8	25.9	3.2	2.0
15556-1	L10	G2		T119D	L17K	179.4	151.6	58.6	38.9	2.4	2.0
15557-1	L10	G2		V121E	L17K	158.3	139.0	55.6	48.1	3.9	2.0
15563-1	L10	G2	V121K			188.4	145.4	73.6	23.8	3.0	2.0
15564-1	L10	G2	V20K			210.0	159.7	71.2	19.8	2.8	2.0
15565-1	L10	G2	V20R			179.4	168.6	71.3	26.3	2.2	4.0
15566-1	L10	G2	L17K			118.0	108.8	55.5	29.1	2.6	2.0
15567-1	L10	G2	L17K		V121E	181.0	147.9	63.8	28.6	3.4	2.0

SEC-MS, ключевое значение	
4	Требуемый продукт >> другой продукт
3	Требуемый продукт => другой продукт
2	Требуемый продукт <= другой продукт
1	Требуемый продукт << другой продукт



Фиг. 27

Совместная экспрессия гетеротримера Ab-Fab-TTR 15545 по результатам SEC со стандартами



4X Ab TTR = контрольный [Ab 655-341]₄ - [TTR (C10A/K15A)]

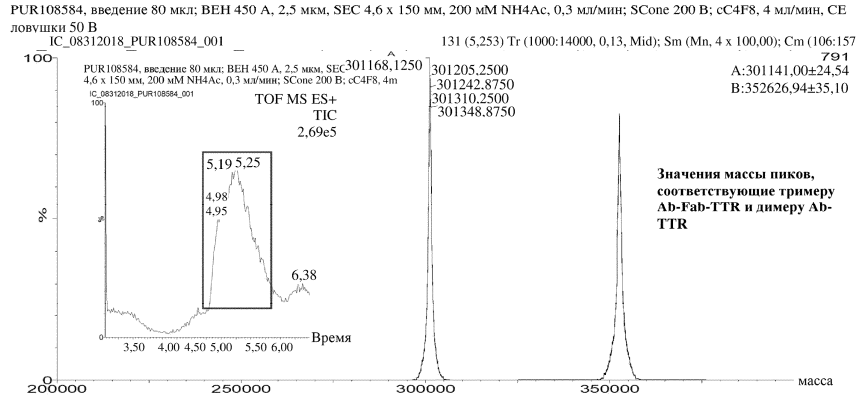
2X Ab TTR = контрольный [Ab 655-341]₂ - [TTR (C10A/K15A)]

4X Fab TTR = контрольный [Fab 655-341]₄ - [TTR (C10A/K15A)]

15545 = [Ab 655-341] = [[GGGG] - [TTR(C10A/K15A/V20D)]]₂ : [[TTR(C10A/K15A/V20R)] - [GG] - [Fab DNP-3B1]]₂

Фиг. 28

Гетеротример Ab-Fab-TTR 15545-1 (L4C6-), MS, SEC и NR SDS-PAGE нативных белков



Фиг. 29

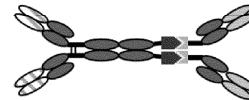
Средние уровни совместной экспрессии гетеротримера Ab-Fab-TTR

	Титр (мл/л)	Выход (мл/л)	SEC, % HMW	SEC, % Ab-Fab	SEC, % LMW	SEC-MS
L0	95,7	94,0	67,6	28,5	3,9	2,1
L4	167,5	140,3	75,3	21,5	3,2	2,2
L10	186,5	149,7	67,8	29,3	2,9	2,2

L17K/T119D	159,8	139,1	62,1	34,9	3,0	2,0
L17K/V121E	146,1	122,2	67,0	29,3	3,7	2,0
V121K/L17D	135,6	113,7	71,3	26,1	2,6	2,0
V121R/L17D	132,3	118,9	77,6	17,1	5,2	1,7
V20K/V20D	163,0	133,6	79,0	17,7	3,4	2,0
V20R/V20D	154,9	133,4	68,4	28,8	2,7	3,0

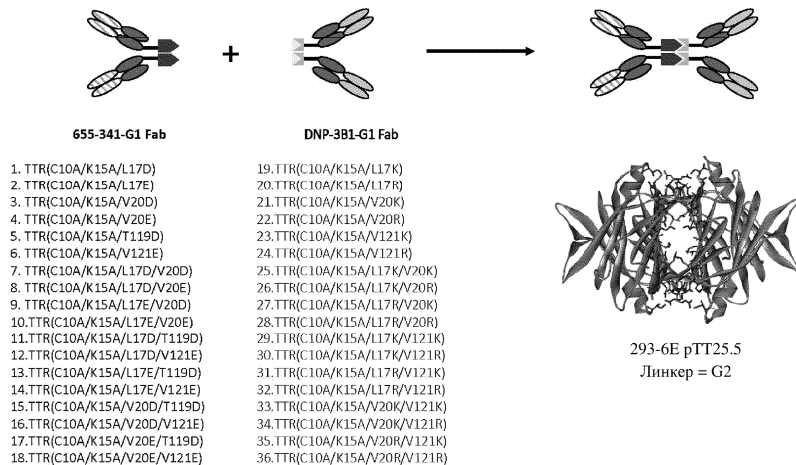
Ab 655	138,4	121,8	69,6	26,5	3,9	1,9
Ab 3B1	166,0	137,0	71,0	26,2	2,8	2,4

SEC-MS, ключевое значение	
4	Требуемый продукт >> другой продукт
3	Требуемый продукт = другой продукт
2	Требуемый продукт < другой продукт
1	Требуемый продукт << другой продукт



Фиг. 30

Экспрессия мутантных гетеротетрамеров Fab-TTR с двумя мутациями в области контакта по отдельности, без смешивания (REQ-54634A)

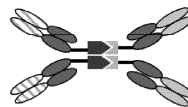


Фиг. 31

Экспрессия мутантных гетеротетрамеров Fab-TTR с одной и двумя мутациями в области контакта по отдельности (SEC, T = 0 и ≈ 12 месяцев)

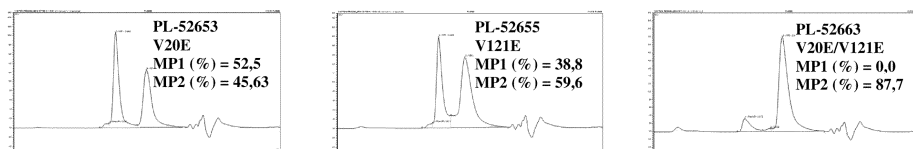
IPS	Минус	Вариант	Титр (тит/л)	Выход (мг/л)	SEC, % HMW	SEC, % 4X-Fab	SEC, % 2X-Fab	NR-MCE, % 3X-Fab	SEC, разницы в соотношении с HMW	SEC, разницы 4X-Fab	SEC, разницы 2X-Fab
IPS-33040	655	L17D	84	4,5	5,8	76,3	16,4	100,0	9,0	22,4	12,3
IPS-33041	655	L17E	31,6	37,9	2,3	38,7	59,0	99,7	32,2	-28,3	-5,4
IPS-33042	655	V20D	18,1	32,3	2,2	73,7	24,1	69,2	15,8	-23,1	4,7
IPS-33043	655	V20E	18,3	25,3	1,9	32,5	45,6	94,2	2,2	-13,9	8,9
IPS-33044	655	T119D	23,5	30,4	3,8	31,7	60,9	73,6	14,1	-15,2	-0,2
IPS-33045	655	V121E	16,3	24,7	1,6	38,8	59,6	100,0	0,8	-16,0	8,8
IPS-33046	655	L17D/V20D	60,5	2,9	62,5	0,0	37,5	98,0	11,9	0,0	-11,9
IPS-33047	655	L17D/V20E	65,5	3,6	40,0	0,0	58,7	98,2	15,7	0,0	-16,2
IPS-33050	655	L17D/T119D	71,1	4,8	53,8	0,0	42,3	98,3	9,5	0,0	-9,1
IPS-33051	655	L17D/V121E	7,21	6,3	21,2	0,0	76,4	100,0	5,7	0,0	-9,3
IPS-33049	655	L17E/V20E	73,6	4,7	37,8	0,0	60,8	89,0	7,2	0,0	-14,4
IPS-33052	655	L17E/T119D	72,8	4,8	50,7	0,0	44,7	100,0	13,8	0,0	-13,8
IPS-33053	655	L17E/V121E	7,66	4,5	14,4	0,0	83,3	100,0	6,0	0,0	-3,7
IPS-33054	655	V20D/T119D	82,8	4,9	13,8	12,5	68,8	98,8	11,0	-7,1	-7,7
IPS-33055	655	V20D/V121E	82,6	4,5	14,1	4,8	79,8	97,5	11,7	-3,0	-10,6
IPS-33056	655	V20E/T119D	7,36	4,0	11,0	5,8	79,2	100,0	9,3	0,0	-10,1
IPS-33057	655	V20E/V121E	11,1	13,7	10,7	0,0	89,7	97,5	5,2	0,0	-10,1
IPS-33059	3B1	L17K	113,6	4,0	1,6	40,1	58,3	90,0	3,7	-15,3	11,1
IPS-33059	3B1	L17R	107,5	3,9	0,4	6,3	93,3	95,4	-0,4	2,4	-2,6
IPS-33060	3B1	V20K	14,2	8,5	29,0	5,0	61,9	89,5	10,3	-1,4	-11,1
IPS-33061	3B1	V20R	56,7	3,3	20,0	5,0	66,4	94,0	28,7	-5,0	-15,1
IPS-33062	3B1	V121K	24,7	23,1	1,3	75,3	22,3	95,4	1,7	-14,0	11,6
IPS-33063	3B1	V121R	19,7	12,4	1,5	39,1	59,4	100,0	0,0	-16,3	16,4
IPS-33064	3B1	L17K/V20K	53,9	3,3	39,0	0,0	50,7	94,5	6,2	0,0	-4,0
IPS-33065	3B1	L17K/V20R	7,2	9,0	13,7	0,0	79,1	94,5	1,0	0,0	-0,3
IPS-33068	3B1	L17K/V121K	19,9	10,0	17,8	0,0	77,3	94,2	2,3	0,0	-6,1
IPS-33069	3B1	L17K/V121R	17	8,0	28,4	0,0	63,9	92,5	3,1	4,0	-10,3
IPS-33066	3B1	L17R/V20K	12,7	5,3	20,0	0,0	74,8	93,2	-0,6	0,0	-3,7
IPS-33067	3B1	L17R/V20R	16,6	10,4	9,6	0,0	85,6	95,9	0,6	0,0	-4,1
IPS-33070	3B1	L17R/V121K	24,1	12,2	11,3	0,0	85,4	95,9	0,8	0,0	-6,4
IPS-33071	3B1	L17R/V121R	19	7,7	13,3	0,0	81,2	94,0	-0,7	0,0	-2,0
IPS-33075	3B1	V20R/V121R	14,5	5,0	24,7	0,0	68,8	90,8	-0,7	0,0	-5,7

- Двойные мутации, эффективные для предупреждения образования гомотетрамеров Fab-TTR, особенно отрицательно заряженных вариантов
- Длительная инкубация при 4°C оказывает лишь умеренное влияние на распределение SEC, указывая на то, что молекулы являются стабильными



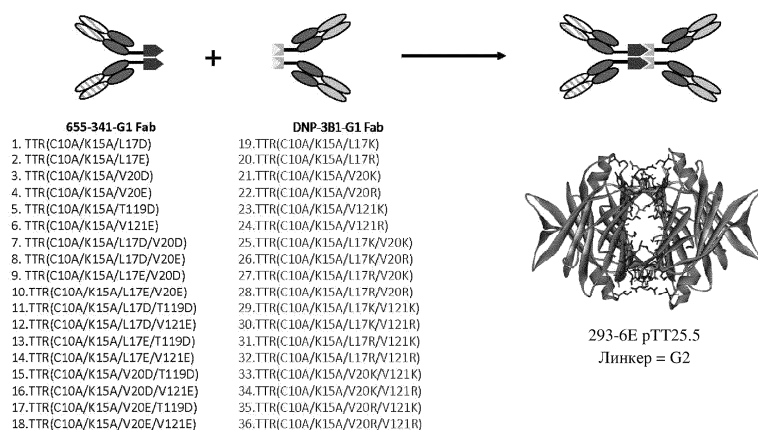
Фиг. 32

Варианты Fab-TTR с комбинацией мутаций в значительной степени снижают количество 4X-Fab-TTR и повышают количество 2x-Fab-TTR



Фиг. 33

Экспрессия мутантных гетеротетрамеров Fab-TTR с двумя мутациями в области контакта по отдельности, после очистки смеси (REQ-54634B)



Фиг. 34

Мутантные варианты гетеротетрамера Fab-TTR с одной и двумя мутациями после очистки смеси

Пол. вариант с мутацией 3B1	Отр. вариант с мутацией 655	SEC, % HMW	SEC, % 2X-Fab	SEC, % 4X-Fab	Помещение % 4X-Fab
L17K/V12IK	L17D	154	293	545	163
L17K/V12IK	L17D	166	307	544	63
L17K/V12IK	L17D	146	281	544	163
L17K/V12IK	L17D	145	294	515	154
V12IK	L17D	167	154	679	-79
V12IK	L17D	152	353	628	51
V30K	L17D	145	342	486	84
V17K	L17D/V119D	194	411	358	155
L17K/V12IK	L17D/V119D	473	266	205	305
L17K/V12IK	L17D/V119D	531	343	91	91
L17K/V30K	L17D/V119D	662	308	0	0
L17K/V30K	L17D/V119D	658	326	0	0
L17K/V30K	L17D/V119D	222	493	277	344
L17K/V12IK	L17D/V119D	472	256	233	233
L17K/V12IK	L17D/V119D	486	268	206	206
L17K/V30K	L17D/V119D	524	389	41	41
L17K/V30K	L17D/V119D	581	453	0	0
V12IK	L17D/V119D	483	315	0	372
V12IK	L17D/V119D	443	414	105	300
V30K/V12IK	L17D/V119D	360	394	0	0
L17K	L17D/V12IE	204	665	0	284
L17K/V12IK	L17D/V12IE	214	477	214	214
L17K/V12IK	L17D/V12IE	377	574	84	84
L17K/V30K	L17D/V12IE	292	530	62	62
L17K/V30K	L17D/V12IE	295	657	0	0
L17K	L17D/V12IE	146	714	81	50
L17K/V12IK	L17D/V12IE	180	613	136	136
L17K/V12IK	L17D/V12IE	194	648	99	99
L17K/V30K	L17D/V12IE	248	664	0	0
L17K/V30K	L17D/V12IE	213	745	0	0
V12IK	L17D/V12IE	146	322	87	151
V12IK	L17D/V12IE	268	530	0	106
V30K/V12IK	L17D/V12IE	364	583	0	0
L17K/V12IK	L17D/V20D	623	257	0	0
L17K/V12IK	L17D/V20D	594	314	0	0
L17K/V30K	L17D/V20D	724	213	0	0
L17K/V30K	L17D/V20D	817	183	0	0
L17K/V12IK	L17D/V20D	492	547	0	0
L17K/V12IK	L17D/V20D	437	508	0	0
L17K/V30K	L17D/V20D	498	438	0	0
L17K/V30K	L17D/V20D	455	504	0	0
V12IK	L17D/V20D	253	305	176	200
V12IK	L17D/V20D	304	386	146	146
V30K	L17D/V20D	541	373	2	0
V30K	L17D/V20D	483	432	23	33
V30K/V12IK	L17D/V20D	483	432	23	33
L17K/V12IK	L17D/V20E	396	664	0	0

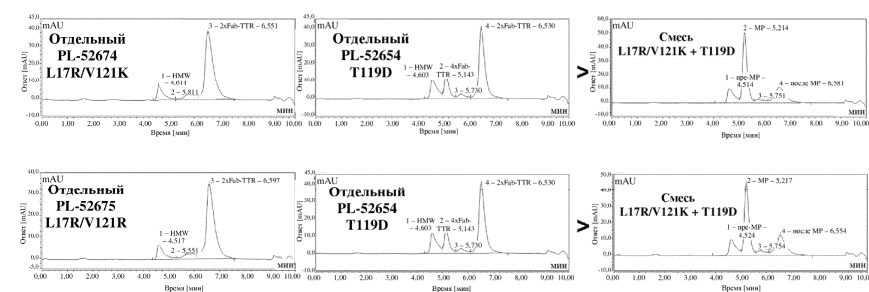
Фиг. 35

Мутантные варианты гетеротетрамера Fab-TTR с одной и двумя мутациями после очистки смеси

Пол. вариант с мутацией 3B1	Отр. вариант с мутацией 655	SEC, % HMW	SEC, % 2X-Fab	SEC, % 4X-Fab	Помещение % 4X-Fab
L17K/V12IK	L17E/V20E	44.4	53.8	0.0	0.0
L17K/V12IK	L17E/V20E	39.2	57.9	0.0	0.0
L17R/V12IK	L17E/V20E	40.2	56.7	0.0	0.0
L17K/V20K	L17E/V20E	41.2	55.6	0.0	0.0
L17R/V20K	L17E/V20E	39.6	58.0	0.0	0.0
V12IK	L17E/V20E	45.7	43.2	2.6	-35.0
V17IK	L17E/V20E	44.8	55.7	0.0	-10.6
V20K	L17E/V20E	43.6	57.4	0.0	-2.5
V20K	L17E/V20E	42.6	47.9	0.0	-2.5
V30K/V12IK	L17E/V20E	41.9	54.9	0.0	0.0
L17K	T119D	32	47.9	45.2	9.3
L17K/V12IK	T119D	22.7	62.5	11.5	-8.4
L17K/V12IK	T119D	23.3	50.5	18.1	2.2
L17K/V20K	T119D	22.2	61.0	11.7	-4.2
L17K/V20K	T119D	21.7	61.3	12.2	-3.6
L17R	T119D	17.8	61.3	11.4	-7.6
L17R/V12IK	T119D	15.8	26.7	32.4	36.5
L17R/V12IK	T119D	15.9	28.9	39.4	38.5
L17R/V20K	T119D	18.3	28.8	45.9	30.1
L17R/V20K	T119D	15.1	38.7	41.5	25.6
L17K	V12IE	7.9	65.6	22.1	-17.3
L17K/V12IK	V12IE	10.1	60.6	23.7	4.3
L17K/V12IK	V12IE	14.0	68.8	10.6	-8.8
L17K/V20K	V12IE	20.6	56.1	13.0	-6.4
L17K/V20K	V12IE	16.4	56.4	20.6	7.7
L17R	V12IE	1.6	64.2	33.4	10.9
L17R/V12IK	V12IE	6.8	82.1	6.6	-12.8
L17R/V12IK	V12IE	6.4	80.0	6.9	-17.5
L17K/V20K	V12IE	0.0	76.0	9.9	-9.5
L17R/V20K	V12IE	5.9	80.2	8.0	-11.5
L17K/V20K	V20D	29.6	34.8	27.8	-0.0
L17K/V20K	V20D	21.9	22.3	33.8	10.0
L17R/V20K	V20D	18.1	40.9	32.1	-8.7
L17R/V20K	V20D	13.7	52.6	26.9	-9.9
V20K	V20D	28.3	29.0	36.0	-5.4
V20K	V20D	26.8	26.5	29.4	0.2
V30K/V12IK	V20D	19.1	27.6	46.2	-9.3
L17K	V30E/T119D	11.6	64.3	19.1	-7.3
L17K/V12IK	V30E/T119D	24.5	58.4	11.1	3.8
L17K/V12IK	V30E/T119D	25.4	58.2	6.2	0.9
L17K/V20K	V30E/T119D	24.5	57.7	6.5	0.2
L17K/V20K	V30E/T119D	25.3	59.3	5.8	-0.5
L17R	V30E/T119D	12.7	51.3	30.3	20.9
L17R/V12IK	V30E/T119D	22.8	60.5	9.9	3.7
L17R/V12IK	V30E/T119D	23.3	62.5	8.0	1.8
L17K/V20K	V30E/T119D	23.9	46.5	23.1	10.8
L17R/V20K	V30E/T119D	26.5	60.2	5.3	-1.0
V20K	V30E/T119D	25.9	53.5	13.5	4.8

Фиг. 36

Экспрессия индивидуальных молекул гетеродимеров AB-TTR по отдельности (без совместного культивирования), определенная посредством SEC



Фиг. 37

Пары индивидуальных молекул гетеродимеров Fab-TTR при совместном культивировании (REQ-55327)

Table with 6 columns: Пил. вариант с мутацией ВВ, Оп. вариант с мутацией АБ, Вязк (мПа), SEC, % HMM, SEC, % 2X-Fab, SEC, % 4X-Fab. It contains two large data tables side-by-side, each listing various protein variants and their properties.

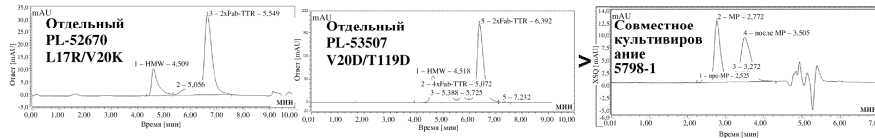
Фиг. 38

Пары индивидуальных молекул гетеродимеров Fab-TTR при совместном культивировании (REQ-55327)

Table with 6 columns: Пил. вариант с мутацией ВВ, Оп. вариант с мутацией АБ, Вязк (мПа), SEC, % HMM, SEC, % 2X-Fab, SEC, % 4X-Fab. It contains two large data tables side-by-side, listing various protein variants and their properties.

Фиг. 39

SEC гетеродимеров АВ-TTR при совместном культивировании



Фиг. 40