

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **048161**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2024.10.30**

**(51)** Int. Cl. **C07K 16/24** (2006.01)

**(21)** Номер заявки  
**201891322**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2016.12.14**

---

**(54) АНТИТЕЛА, СПЕЦИФИЧНЫЕ ДЛЯ TL1A, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

---

**(31)** **62/268,432; 62/333,063;**  
**PCT/US2016/052006**

**(56)** US-A1-2012114654  
WO-A2-2014144600  
WO-A1-2014161845

**(32)** **2015.12.16; 2016.05.06; 2016.09.15**

**(33)** **US**

**(43)** **2019.01.31**

**(86)** **PCT/US2016/066722**

**(87)** **WO 2017/106383 2017.06.22**

7: "Fab-based bispecific antibody formats with robust biophysical properties and biological activity", MABS, LANDES BIOSCIENCE, US, vol. 3, 1 January 2015 (2015-01-01), pages 470-482, XP009185560, ISSN: 1942-0870, DOI: 10.1080/19420862.2015.1022694 figure all; example all; table all

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**АМГЕН ИНК. (US)**

STEVEN M LEWIS ET AL: "Generation of bispecific IgG antibodies by structure-based design of an orthogonal Fab interface", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 32, no. 2, 1 February 2014 (2014-02-01), pages 191-198, XP055240003, US ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt.2797 figure all; example all; table all

**(72)** Изобретатель:  
**Хсу Хайлин, Каннан Гунасекаран,  
Уолкер Кеннет В., Хортгер Мишель,  
Белоуски Эдвард Дж. (US)**

CAIN ET AL: "Crossing over to bispecificity", SCIENCE-BUSINESS EXCHANGE: SCIBX/FROM THE MAKERS OF BIOCENTURY AND NATURE, NATURE PUBLISHING GROUP, USA, vol. 4, no. 28, 1 January 2011 (2011-01-01), pages 1-3, XP009168797, DOI: 10.1038/SCIBX.2011.783 figure all; example all; table all

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

---

**(57)** Данное изобретение относится к антителу, специфичному для TL1A, которое содержит один или два переменных домена легкой цепи и один или два переменных домена тяжелой цепи. Данное изобретение дополнительно относится к применению антител, специфичных для TL1A, их получению, а также фармацевтическим композициям на их основе.

---

**B1**

**048161**

**048161 B1**

### Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка заявляет приоритет заявки № PCT/US2016/052006, поданной 15 сентября 2016 года, и предварительных заявок США № 62/268432, поданной 16 декабря 2015 года, и 62/333063, поданной 6 мая 2016 года. Каждая из вышеуказанных заявок таким образом включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

### Область техники

Данное изобретение относится к биофармацевтическим препаратам, в частности к терапевтическим антигенсвязывающим белкам, способам их применения, фармацевтическим композициям на их основе и способам их получения. В частности, данное изобретение относится к терапевтическим антигенсвязывающим белкам, которые способны связываться с цитокинами TL1A и TNF- $\alpha$ .

### Краткое описание перечня последовательностей

В данный документ посредством ссылки в полном объеме включен Перечень последовательностей под названием "A-1937-WO-PCT\_ST25.txt", содержащий от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 2136, который включает последовательности нуклеиновых кислот и/или аминокислотные последовательности, раскрытые в данном документе. Перечень последовательностей подан согласно данному документу в текстовом формате ASCII через файловую систему EFS и, таким образом, составляет как бумажную, так и машиночитаемую его форму. Список последовательностей был впервые создан с применением PatentIn 22 ноября 2016 года и имеет размер 3,45 МБ.

### Уровень техники

Цитокины представляют собой растворимые белки небольшого размера, которые опосредуют множество биологических эффектов, касающихся иммунной системы. Такие биологические эффекты включают индукцию пролиферации, развития, дифференциация и/или миграции иммунных клеток; регулирование роста и дифференциации многих типов клеток; воспалительный ответ через локальное или системное накопление иммунных клеток; и действия по защите хозяина. См., Например, Arai et al., *Annu. Rev. Biochem.* 59: 783 (1990); Mosmann, *Curr. Opin. Immunol.* 3: 311 (1991); Paul et al., *CeU*, 76: 241 (1994)). Такие иммунные эффекты могут вызывать патологические последствия, когда эффект приводит к чрезмерному и/или хроническому воспалению, как при аутоиммунных расстройствах (таких как рассеянный склероз) и раковых/неопластических заболеваниях. Oppenheim et al., eds., *Cytokine Reference*, Academic Press, San Diego, Calif. (2001); von Andrian et al., *New Engl. J. Med.*, 343: 1020 (2000); Davidson et al., *New Engl. J. Med.*, 345: 340 (2001); Lu et al., *Mol. Cancer Res.* 4:221 (2006); Dalglish et al., *Cancer Treat Res.*, 130: 1 (2006).

TL1A (TNFSF15) представляет собой цитокин, член семейства TNF- $\alpha$ , участвующий в активации Т-клеток (Richard et al., *J Leukoc Biol.* 2015 Sep, 98(3): 333-45). Это лиганд для Death Receptor 3 (DR3), также известного как TNFRSF25. TL1A в основном экспрессируется на низком базальном уровне в моноцитах, дендритных клетках и эндотелиальных клетках, но в высокой степени индуцируется после стимуляции иммунным комплексом и цитокинами и микробами. В нескольких исследованиях, посвященных полногеномному поиску ассоциаций, ПГПА (GWAS), был продемонстрирован однонуклеотидный полиморфизм, ОНП (SNP) TL1A, связанный с болезнью Крона в различных этнических группах. Кроме того, сообщалось о связи ОНП TL1A, ассоциирующихся с риском воспалительного заболевания кишечника, ВЗК (IBD), со степенью тяжести болезни Крона (Hirano, *IBD* 19: 526, 2013). В доклинических исследованиях введение белка TL1A усугубляло развитие колита у склонных к колиту мышей *mdrl1a<sup>-/-</sup>*, но не у мышей дикого типа. В целом данные о геноме человека и данные доклинической модели колита демонстрируют, что TL1A играет важную роль в развитии ВЗК, и его блокирование будет оказывать благоприятное воздействие при лечении ВЗК.

Фактор некроза опухоли  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) представляет собой цитокин, участвующий в регуляции различных физиологических и патологических процессов (Buetler, et al., *J Rheumatol Suppl.* 57: 16-21, 1999). Они связаны с регрессией опухолей, септическим шоком, кахексией и рядом воспалительных и аутоиммунных состояний. Fransen et al. (июнь 1985 г.), "Molecular cloning of mouse tumor necrosis factor cDNA and its eukaryotic expression", *Nucleic Acids Res.* 13 (12): 4417-29; Kriegler et al. (April 1988), "A novel form of TNF- $\alpha$ /cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF- $\alpha$ ", *Cell* 53 (1): 45-53. Ингибиторы TNF- $\alpha$  представляют собой класс терапевтических средств, одобренных для лечения ревматоидного артрита, псориатического артрита, ювенильного идиопатического артрита, анкилозирующего спондилоартрита, бляшечного псориаза, болезни Крона и язвенного колита (Sethi et al., *Adv Exp Med Biol.* 2009;647:37-51). Ингибиторы TNF- $\alpha$  включают этанерсепт, адалимумаб, сертолизумаб пэгол, инфликсимаб и голимумаб.

Около 50% пациентов отвечают на лечение ингибиторами TNF. Однако только у около 40% из этих пациентов ответ сохраняется после одного года лечения. Поэтому существует настоятельная потребность в терапевтических средствах с более выраженным эффектом и долговременным ответом. Мы выдвигаем гипотезу о том, что направленное действие на несколько воспалительных путей, таких как TNF и TL1A, вероятно, приведет к увеличению степени выраженности эффекта с предусмотренным профилем безопасности.

### Сущность изобретения

Данное изобретение относится к разработке антигенсвязывающих белков, особенно полностью человеческих антител, которые специфически связываются с TL1A. Предпочтительные антигенсвязывающие белки обладают высокой аффинностью связывания с TL1A человека и яванского макака и блокируют опосредованную TL1A активацию NF- $\kappa$ B и активацию Т-клеток. Указанные антигенсвязывающие белки можно применять в качестве терапевтических средств для лечения воспалительного заболевания кишечника (ВЗК) и других аутоиммунных и воспалительных состояний. Изобретение дополнительно относится к биспецифическим антигенсвязывающим белкам, особенно к биспецифическим антителам. Биспецифические антигенсвязывающие белки по изобретению содержат единицу, связывающуюся с TL1A, и единицу, связывающуюся с TNF- $\alpha$ . Блокирующие TL1A белки и блокирующие TNF- $\alpha$  белки оказывают различное действие в исследованиях, в которых измеряют ингибирование индукции цитокинов IFN $\gamma$ , IL-5, IL-6, IL-8 и IL-10. TL1A, но не TNF- $\alpha$ , индуцирует активацию Т-клеток *in vivo*. TL1A и TNF- $\alpha$  индуцируют NF- $\kappa$ B в разных типах клеток в моноцитах периферической крови человека, МПК (PBMC). Кроме того, TL1A и TNF- $\alpha$  индуцируют различные цитокины в МПК человека. TL1A и TNF- $\alpha$  индуцируют некоторые из одних и тех же генов, но в разных типах клеток (16 перекрывающихся генов, индуцируемых TL1A в цельной крови и TNF- $\alpha$  в клетках NCM460, 13 перекрывающихся генов, индуцируемых TL1A в цельной крови и TNF- $\alpha$  в МПК). Существует выраженная генетическая связь между TL1A и воспалительным заболеванием кишечника (ВЗК), причем агенты против TNF клинически валидированы для лечения ВЗК. Указанные биспецифические антигенсвязывающие белки, таким образом, пригодны для лечения ВЗК и других аутоиммунных и воспалительных состояний. По этим и другим причинам биспецифические антигенсвязывающие белки, которые специфически связываются с TL1A и TNF- $\alpha$ , являются предпочтительными.

Одним из форматов таких биспецифических антигенсвязывающих белков являются гетеродимерные иммуноглобулины (гетеро Ig). Такие антигенсвязывающиеся белки гетеро Ig содержат одну пару тяжелой цепи-легкой цепи, направленно действующую на TL1A, и другую, направленно действующую на TNF- $\alpha$ .

Другим форматом таких биспецифических антигенсвязывающих белков являются молекулы IgG-scFv. В IgG-scFv каждая тяжелая цепь антитела, которая специфически связывается с одной мишенью, соединена с одноцепочечным антителом (scFv), которое специфически связывается с другой мишенью. Часть scFv может быть соединена с тяжелой цепью части IgG непосредственно или через пептидный линкер. В формате IgG-scFv IgG направленно действует на TL1A, а часть scFv - на TNF- $\alpha$ , или наоборот. Биспецифические антигенсвязывающие белки в формате IgG-scFv обладают преимуществом бивалентности в отношении их целевых антигенов.

Дополнительным форматом таких биспецифических антигенсвязывающих белков являются молекулы IgG-Fab. В этом формате антигенсвязывающий белок имеет такую структуру, что молекула Fab, которая связывается с одной мишенью, слита с каждой тяжелой цепью молекулы IgG, которая связывается с другой мишенью. Одна цепь части Fab может быть соединена, непосредственно или через пептидный линкер, с С-концом тяжелой цепи части IgG. Полученная молекула обладает преимуществом четырехвалентности и биспецифичности. Все вариации формата IgG-Fab предпочтительно содержат последовательности CDR из табл. 21.2A и 21.2B, приведенных ниже. Предпочтительные последовательности тяжелой и легкой цепей молекул IgG-Fab представлены в табл. 21.1 ниже.

Другие форматы биспецифических антигенсвязывающих белков также включены в данное изобретение. Одним из таких форматов являются молекулы IgG-Fab. В этом формате каждая тяжелая цепь антитела, которое специфически связывается с одной мишенью, соединена с фрагментом Fab, который специфически связывается с другой мишенью. В формате IgG-Fab IgG направленно действует на TL1A, а часть Fab - на TNF- $\alpha$ , и наоборот. Биспецифические антигенсвязывающие белки в формате IgG-Fab обладают преимуществом бивалентности в отношении их целевых антигенов. Другие форматы биспецифических антигенсвязывающих белков, включенные в данное изобретение, описаны ниже.

Кроме того, изобретение относится к выделенным нуклеиновым кислотам, кодирующим TL1A-специфические антигенсвязывающие белки по изобретению, а также к векторам, содержащим нуклеиновые кислоты, клеткам-хозяевам, содержащим векторы, и способам получения и применения TL1A-специфических антигенсвязывающих белков. Изобретение дополнительно относится к выделенным нуклеиновым кислотам, кодирующим биспецифические антигенсвязывающие белки по изобретению, а также к векторам, содержащим нуклеиновые кислоты, клеткам-хозяевам, содержащим векторы, и способам получения и применения биспецифических антигенсвязывающих белков. В других вариантах реализации данное изобретение относится к композициям, содержащим TL1A-специфические антигенсвязывающие белки, биспецифические антигенсвязывающие белки, и наборам, содержащим анти-TL1A или биспецифические антигенсвязывающие белки, а также промышленным изделиям, содержащим анти-TL1A или биспецифические антигенсвязывающие белки.

TL1A-специфические антигенсвязывающие белки и биспецифические антигенсвязывающие белки, описанные в данном документе, можно применять для приготовления фармацевтических композиций

или лекарственных средств для лечения состояний, связанных с TL1A, и/или, в случае биспецифических антигенсвязывающих белков, состояний, связанных с TNF- $\alpha$ . Таким образом, в данном изобретении дополнительно предлагаются фармацевтические композиции, содержащие TL1A-специфический антигенсвязывающий белок или биспецифический антигенсвязывающий белок и фармацевтически приемлемый разбавитель, вспомогательное вещество или носитель.

Кроме того, изобретение относится к способам лечения с применением TL1A-специфических антигенсвязывающих белков. TL1A-специфические антигенсвязывающие белки по данному изобретению пригодны для ингибирования провоспалительного цитокина TL1A. Антитела можно применять для уменьшения, ограничения, нейтрализации или блокирования провоспалительных эффектов TL1A. Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретение относится к лечению ВЗК и других аутоиммунных или воспалительных состояний с применением TL1A-специфических антигенсвязывающих белков.

Изобретение дополнительно относится к способам лечения с применением биспецифических антигенсвязывающих белков. Биспецифические антигенсвязывающие белки по данному изобретению пригодны для ингибирования провоспалительных цитокинов, TL1A и TNF- $\alpha$ . Биспецифические связывающие белки можно применять для уменьшения, ограничения, нейтрализации или блокирования провоспалительных эффектов TL1A. Подобным образом, биспецифические антигенсвязывающие белки можно применять для уменьшения, ограничения, нейтрализации или блокирования провоспалительных эффектов TNF- $\alpha$ . Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретение относится к лечению ВЗК и других аутоиммунных или воспалительных состояний с применением TL1A-специфических/TNF-специфических антигенсвязывающих белков.

#### Краткое описание чертежей

На фиг. 1 приведено схематическое изображение четырех форматов биспецифических гетеро-Ig, применяемых для генерации анти-TL1A/анти-TNF- $\alpha$  биспецифических антигенсвязывающих белков. Как проиллюстрировано, тяжелая цепь, направленно действующая на один антиген, соединена дисульфидной связью с тяжелой цепью, направленно действующей на другой антиген. Легкая цепь для каждого антигена соединена дисульфидной связью с тяжелой цепью для соответствующего антигена. На фиг. 1 изображен предпочтительный вариант реализации изобретения, в котором тяжелая и легкая цепи содержат зарядовые мутации, способствующие правильной ассоциации тяжелых и легких цепей. Схема нумерации по Кабату-ЕС применяется для обозначения положения мутаций зарядовых пар в каждой из цепей и для всех последовательностей в данном документе. Указанный формат IgG-подобного биспецифического антигенсвязывающего белка представляет собой гетеротетрамер, содержащий две разные легкие цепи и две разные тяжелые цепи. HC1 и LC1 относятся к тяжелой цепи и легкой цепи, соответственно, одного связывающего плеча Fab, а HC2 и LC2 относятся к тяжелой цепи и легкой цепи, соответственно, второго связывающего плеча Fab. Например, схематически, HC1 и LC1 соответствуют связывающему плечу против рецептора TL1A, а HC2 и LC2 соответствуют связывающему плечу против TNF- $\alpha$ . Однако два связывающих плеча можно переключать таким образом, что HC1 и LC1 будут соответствовать связывающему плечу против TNF- $\alpha$ , а HC2 и LC2 будут соответствовать связывающему плечу против рецептора TL1A.

На фиг. 2 приведено схематическое изображение формата IgG-scFv, применяемого для генерации анти-TL1A/анти-TNF- $\alpha$  биспецифических антигенсвязывающих белков. Как проиллюстрировано, структура включает полный тетрамерный IgG, направленно действующий на один антиген. Одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), который содержит переменные домены из второго антитела, соединенные вместе глицин-сериновым линкером, слит с карбоксильным концом тяжелой цепи первого антитела через пептидный линкер с образованием модифицированной тяжелой цепи. Хотя проиллюстрирована ориентация VH-VL переменных доменов в scFv, переменные домены также могут быть организованы в ориентации VL-VH. Полноразмерная молекула представляет собой мультимер, содержащий две тяжелые цепи (но одну уникальную последовательность тяжелой цепи) и две легкие цепи (но одну уникальную последовательность легкой цепи) из первого антитела.

Фиг. 3 относится к аффинной хроматографии MabSelect SuRe анти-TL1A/анти-TNF- $\alpha$  гетеро-Ig. На ней изображена типичная хроматограмма определения аффинного захвата на белке A методом жидкостной экспресс-хроматографии белков, ЖЭХБ (FPLC) для анти-TL1A/анти-TNF- $\alpha$  гетеро-Ig. Белок элюировали со ступенчатым градиентом 100 мМ уксусной кислоты (проводимость: черный след, пунктир), pH 3,6, и объединяли в пул на основе A280 (черный след, твердое вещество).

На фиг. 4 изображена типичная хроматограмма с высоким разрешением очистки на сефарозе методом ЖЭХБ с сильной катионообменной колонкой (SP) для анти-TL1A/анти-TNF- $\alpha$  гетеро-Ig. Белок элюировали с повышающимся градиентом соли (проводимость: черный след, пунктир) и объединяли в пул на основе профиля элюации A280 (черный след, твердое вещество) и анализа фракций с помощью Caliper LabChip.

На фиг. 5 изображена типичная хроматограмма с высоким разрешением очистки на сефарозе методом ЖЭХБ SP для анти-TL1A/анти-TNF- $\alpha$  гетеро-Ig. Белок элюировали с понижающимся градиентом сульфата аммония (проводимость: черный след, пунктир) и объединяли в пул на основе профиля элюа-

ции A280 (черный след, твердое вещество) и анализа фракций с помощью Caliper LabChip.

Фиг. 6 относится к анализу Caliper TL1A/TNF- $\alpha$  гетеро-Ig. На ней изображен невосстанавливающий и восстанавливающий анализ Caliper для анти-TL1A/анти-TNF- $\alpha$  гетеро-Ig.

Фиг. 7 относится к анализу методом эксклюзионной ВЭЖХ (SE-HPLC) анти-TL1A/анти-TNF- $\alpha$  гетеро-Ig. На ней изображена эксклюзионная хроматография на 30 мкг конечного антитела против TL1A/анти-TNF- $\alpha$  гетеро-Ig, инжестированного на колонку Sepax Zenix-C SEC-300 (7,8×300 мм) в 50 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 250 мМ NaCl, pH 6,9, при 1 мл/мин, с регистрацией поглощения на длине волны 280 нм (черный след).

Фиг. 8 относится к ЖХ-МС (LC-MS) невосстановленного гетеро-Ig (теоретическая масса: 145495 Да). На фиг. 8 изображен анализ массы 20 мкг невосстановленного анти-TL1A/анти-TNF- $\alpha$  гетеро-Ig, элюированного обращенно-фазовой ВЭЖХ с градиентом, с применением колонки Agilent Zorbax 300SB-C8 (2,1×50 мм 3,5 мкм) и подвижных фаз 0,1% ТФУ и 90% н-пропанола/0,1% ТФУ (подвижные фазы А и В, соответственно), оборудованной масс-спектрометром Agilent 6230 для времяпролетной масс-спектроскопии с ионизацией электрораспылением, ИЭР-ВП (ИЭР-ВП).

На фиг. 9 изображен анализ массы 20 мкг TL1A/TNF- $\alpha$  гетеро-Ig после ограниченного расщепления лизилэндопротеиназой С в течение 30 мин в 100 мМ ТРИС, pH 8. Обращенно-фазовую ВЭЖХ проводили с применением колонки Agilent Zorbax 300SB-C8 (2,1×50 мм 3,5 мкм) и подвижных фаз 0,1% ТФУ и 90% н-пропанола/0,1% ТФУ (подвижные фазы А и В, соответственно) с обнаружением массы на масс-спектрометре Agilent 6230 ИЭР-ВП. Теоретическая масса для TL1A Fab, TNF Fab и Fc составляет 47350 Да, 48002 Да и 50175 Да, соответственно.

Фиг. 10 относится к аффинной хроматографии MabSelect SuRe анти-TL1A/анти-TNF- $\alpha$  IgG-scFv. На ней изображена типичная хроматограмма определения аффинного захвата на белке А методом ЖЭХБ для анти-TL1A/анти-TNF- $\alpha$  IgG-scFv. Белок элюировали со ступенчатым градиентом 100 мМ уксусной кислоты, pH 3,6, и объединяли в пул на основе A280 (черный след).

Фиг. 11 относится к хроматографии с высоким разрешением очистки на сефарозе SP для анти-TL1A/анти-TNF- $\alpha$  IgG-scFv. На ней изображена типичная хроматограмма очистки методом ЖЭХБ Superdex 200 для анти-TL1A/анти-TNF- $\alpha$  IgG-scFv. Белок элюировали с изократическим градиентом буфера и объединяли в пул на основе профиля элюации A280 (черный след) и анализа фракций эксклюзионной ВЭЖХ.

На фиг. 12 изображен невосстанавливающий и восстанавливающий анализ Caliper для анти-TL1A/анти-TNF- $\alpha$  IgG-scFv.

Фиг. 13 относится к анализу анти-TL1A/анти-TNF- $\alpha$  IgG-scFv методом эксклюзионной ВЭЖХ. На ней изображена эксклюзионная хроматография на 30 мкг конечного продукта анти-TL1A/анти-TNF- $\alpha$  IgG-scFv, инжестированного на колонку Sepax Zenix-C SEC-300 (7,8×300 мм) в 50 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 250 мМ NaCl, pH 6,9, при 1 мл/мин, с регистрацией поглощения на длине волны 280 нм.

Фиг. 14 относится к расщепленному протеазой IdeS Ig-scFv. На ней изображен анализ массы на 20 мкг Ig-scFv с применением разделения обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке Agilent Zorbax 300SB (2,1×50 мм, 3,5 мкм) с подвижными фазами 0,1% ТФУ и 90% н-пропанола/0,1% ТФУ (подвижные фазы А и В, соответственно) и обнаружения на масс-спектрометре Agilent 6230 ИЭР-ВП.

На фиг. 15 изображено генотипирование ОНП TL1A. Чтобы оценить потенциальную связь генотипа TL1A с экспрессией, геномную ДНК (гДНК) выделяют из МПК (РВМС) здоровых доноров с применением набора Gentra Puregene Tissue производства Qiagen. Геномную ДНК генотируют с применением анализов генотипирования ОНП TaqMan для rs7848647, rs6478109, rs6478108 и rs3810936 анализов производства LifeTech и стандартных протоколов на платформе цифровой капельной ПЦР Bio-Rad. Доноров относят к гомозиготному гаплотипу риска, если только аллели риска присутствуют во всех 4 генотипированных ОНП (rs7848647, rs6478109, rs6478108 и rs3810936). Доноров относят к гомозиготному безрисковому гаплотипу, если во всех 4 генотипированных ОНП присутствуют только безрисковые аллели. Доноров относят к гетерозиготному гаплотипу, если как аллели риска, так и безрисковые аллели присутствуют во всех 4 генотипированных ОНП. У доноров, которых относят к "рекомбинантным", присутствуют только гомозиготные аллели риска в rs7848647, rs6478109 и rs6478108, но они являются гетерозиготными (присутствуют аллели риска и безрисковые аллели) по rs3810936.

На фиг. 16А и 16В изображена более высокая кратность индукции аллелью риска TL1A, по сравнению с безрисковой аллелью, в исследовании гетерозиготных МПК ОКИ. Частоту использования аллелей риска против безрисковых аллелей в гетерозиготных МПК на базальном уровне или после стимуляции иммунным комплексом в различные моменты времени исследуют методом цифровой капельной ПЦР (цкПЦР) с применением синонимических ОНП (rs3810936) аллельспецифических флуоресцентных зондов. Соотношение экспрессии аллелей вычисляют путем деления количества копий аллеля риска/мл на количество копий безрискового аллеля/мл. Общее количество копий каждого аллеля нормируют по количеству кДНК на входе (количество копий/нг), а кратность индукции для каждого аллеля в каждый момент времени вычисляют путем деления количества копий/нг в интересующий момент времени на начальное количество копий/нг (0 ч).

На фиг. 17 проиллюстрировано, что ОНП TL1A в промоторе и интроне вносят вклад в регулирование дисбаланса аллельной экспрессии. Изобретатель(-и) идентифицировал(-и) небольшое количество доноров, гомозиготных по аллелям риска в rs7848647, rs6478109 и rs6478108, но гетерозиготных по rs3810936, вероятно, из-за рекомбинации между rs6478109 и синонимическим ОНП rs3810936. Частоту использования аллелей риска против безрисковых аллелей в гетерозиготных или рекомбинантных донорских МПК изучали методом цифровой капельной ПЦР (цкПЦР) с применением синонимических ОНП (rs3810936) аллельспецифических флуоресцентных зондов. По сравнению с гетерозиготными донорами, у таких рекомбинантных индивидуумов до или после стимуляции иммунным комплексом не было обнаружено дисбаланса экспрессии аллелей.

На фиг. 18 А и 18В проиллюстрировано, что ОНП риска TL1A связаны с экспрессией локусов количественных признаков (эЛКП). Донорам МПК с гомозиготным аллелем риска TL1A, гомозиготными безрисковыми аллелями или гетерозиготными аллелями вводили иммунный комплекс. Общую экспрессию TL1A (TNFSF15) у каждого донора определяют с помощью цифровой ПЦР. Вкратце, кДНК из каждого образца смешивают с ddPCR™ Supermix для зондов (Bio-Rad) и анализом PrimeTime® (кПЦР) ID Hs.PT.56a.41003970. Капли генерируют для каждой реакции при помощи генератора капель QX100™ (Bio-Rad) и подвергают циклической термообработке на термоблоке для проведения реакций C1000 Touch™ (Bio-Rad). После амплификации флуоресценцию капель считывают на капельном считывателе QX100™ (Bio-Rad). Данные анализируют с применением программного обеспечения QuantaSoft (Bio-Rad), а количество копий TL1A/мкл определяют и нормируют по количеству кДНК на входе (количество копий/нг). Значения P для различий в уровнях экспрессии TL1A между различными гаплотипами TNFSF15 определяют с применением t-критерия Стьюдента. На базальном уровне, МПК доноров, гомозиготных по ОНП риска TL1A, содержат меньше мРНК TL1A по сравнению с гомозиготными безрисковыми донорами. Однако после стимуляции иммунным комплексом в МПК доноров, гомозиготных по ОНП риска TL1A, присутствует более высокая экспрессия TL1A по сравнению с гомозиготными безрисковыми донорами.

На фиг. 19А и 19В изображена специфическая для клеточного типа регуляция дисбаланса экспрессии аллелей синонимического ОНП TL1A. Клетки HUVEC от разных доноров генотируют, как было описано ранее. Генотипированные клетки HUVEC от разных доноров обрабатывают IL-1 в различные моменты времени. Общее количество копий каждого аллеля измеряют, как было описано ранее. Соотношение экспрессии аллелей вычисляют путем деления количества копий аллеля риска /мл на количество копий безрискового аллеля /мл. В клетках HUVEC с обработкой или без обработки IL-1 дисбаланс экспрессии аллелей не наблюдался.

На фиг. 20А и 20В проиллюстрировано, что профилактическое лечение моноклональным антителом против TL1A ингибирует развитие спонтанного колита у мышей *mdr1a*<sup>-/-</sup>. Мыши (n=10, возраст 6-7 недель) были рандомизированы в разные группы и получали внутривенно один раз в неделю 500 мкг антитела против мышинового TL1A, антитела против IL23p19, антитела против мышинового IL17RA или мышинового контрольного изотипа или не получали ничего один раз в неделю в течение 8 недель. Мониторинг активности клинического заболевания проводят путем оценки анального воспаления и консистенции стула. Срезы кишечника подвергают гистопатологическому анализу. Статистический анализ проводят с применением одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA) с критерием Даннетта по сравнению с группой mIgG1.

На фиг. 21А и 21В проиллюстрировано, что TL1A усугубляет колит у мышей *mdr1a*<sup>+</sup>. Мышам *mdr1a*<sup>-/-</sup> или контрольным мышам дикого типа в возрасте 6-8 недель вводят внутривенно один раз в неделю 150 мкг рекомбинантного гибридного белка mFc-TL1A или контрольный изотип три раза в неделю в течение 4 недель. Мониторинг активности клинического заболевания проводят путем оценки анального воспаления и консистенции стула, как было описано ранее. Через 4 недели лечения мышей умерщвляют, срезы кишечника подвергают гистопатологическому анализу. Статистический анализ проводят с применением одностороннего ANOVA с критерием Даннетта по сравнению с группой mIgG1.

На фиг. 22А-22F проиллюстрировано повышенное количество воспалительных клеток в образцах собственной пластинки слизистой оболочки нагруженных Fc-TL1A мышей *mdr1a*<sup>-/-</sup>. Мышам *mdr1a*<sup>-/-</sup> или контрольным мышам дикого типа в возрасте 6-8 недель вводят внутривенно один раз в неделю 150 мкг рекомбинантного гибридного белка mFc-TL1A или контрольный изотип три раза в неделю в течение 4 недель. Лимфоциты собственной пластинки слизистой оболочки выделяют, окрашивают на предмет поверхностных антигенов и анализируют методом проточной цитометрии (FACS). Введение TL1A у мышей *mdr1a*<sup>-/-</sup> приводит к повышению количества воспалительных клеток в собственной пластинке слизистой оболочки.

На фиг. 23А-23Е проиллюстрирована четко выраженная индукция цитокинов при введении TL1A и TNF у мышей. Чтобы оценить, приводит ли введение TL1A и TNF к сходным или различным фармакодинамическим эффектам, мышам C57B1/6 (8 недель, самки) вначале вводят внутривенно инъекцией 500 мкг/мышь антитела против мышинового TL1A, антитела против мышинового TNF-α или фосфатно-солевого буфера, ФСБ (PBS). Через 4 ч мышам вводят 100 мкг/мышь TL1A или 10 мкг/мышь TNF-α или

оставляют без введения. Сыворотку получают через 24 ч. Цитокины измеряют с помощью масс-селективного детектора, МСД (MSD) (IL-22 измеряют с помощью иммуноферментного анализа. ИФА (ELISA)).

На фиг. 24А-24F проиллюстрирована четко выраженная индукция цитокинов в МПК человека при обработке TL1A и TNF. Свежевыделенные МПК из крови человека культивируют в средах (RPMI1640 с добавлением 10% сыворотки телячьего эмбриона (СТЭ), 2 мМ глутамина, 1 мМ пирувата натрия,  $5 \times 10^{-5}$  М 2-МЭ и антибиотиков) в присутствии 100 нг/мл TL1A или TNF- $\alpha$  человека. Супернатант собирают через 72 ч. Цитокины в супернатанте измеряют с помощью МСД (IL-22 измеряют с помощью ИФА).

На фиг. 25 изображено схематическое представление формата биспецифического IgG-Fab для анти-TL1A-анти-TNF- $\alpha$  биспецифического антигенсвязывающего белка согласно данному изобретению. В этом формате одна полипептидная цепь фрагмента Fab из второго антитела (например, тяжелая цепь (VH2-CH1) слита с карбоксильным концом каждой тяжелой цепи первого антитела через пептидный линкер, с образованием модифицированной тяжелой цепи. Полноразмерная молекула представляет собой гомогексамер, содержащий две модифицированные тяжелые цепи, две легкие цепи из первого антитела и две полипептидные цепи, содержащие вторую половину фрагмента Fab из второго антитела (например, легкую цепь (VL2-CL)). Мутации зарядовых пар (представлены кругами) могут быть введены в участки Fab первого антитела (Fab 1) и/или второго антитела (Fab 2) для содействия правильному спариванию тяжелой цепи-легкой цепи.

На фиг. 26 изображено схематическое представление формата биспецифического IgG-Fab для анти-TL1A-анти-TNF- $\alpha$  биспецифического антигенсвязывающего белка в соответствии с настоящим изобретением с применением кроссовера доменов иммуноглобулина. В этой вариации формата IgG-Fab одна полипептидная цепь фрагмента Fab из второго антитела (например, тяжелая цепь (VH2-CH1) слита через пептидный линкер с карбоксильным концом тяжелой цепи, содержащей CL вместо домена CH1 первого антитела, с образованием модифицированной тяжелой цепи. Таким образом, домены CH1 и CL из Fab 1 "поменяны местами". Такая перемена мест называется "обменом Fab1" или N-концевым обменом. Полноразмерная молекула представляет собой гомогексамер, содержащий две модифицированные тяжелые цепи, две легкие цепи из первого антитела, содержащие домен CH1 вместо домена CL, и две полипептидные цепи, содержащие вторую половину фрагмента Fab из второго антитела (например, легкую цепь (VL2-CL)). Мутации зарядовой пары (представлены кругами) могут быть введены в участки Fab первого антитела (Fab 1) и/или второго антитела (Fab 2), для содействия правильному спариванию тяжелой цепи-легкой цепи. Не изображены, но также включены в данное изобретение молекулы IgG-Fab, в которых (i) домены CH1 и CL Fab 2 поменяны местами вместо Fab 1 (в данном документе называется обменом Fab 2 или C-концевым обменом) или (ii) поменяны местами как домены CH1 и CL Fab 1, так и домены CH1 и CL Fab 2 (в данном документе называется двойным обменом).

На фиг. 27 изображено сравнение титра экспрессии IgG-Fab на основе формата обмена доменов.

На фиг. 28 изображено сравнение титра экспрессии IgG-Fab на основе типа мутации(-й) зарядовой пары.

На фиг. 29 изображено сравнение чистоты IgG-Fab на основе формата обмена доменов.

На фиг. 30 изображено сравнение анти-TL1A активности IgG-Fab на основе формата обмена домена.

На фиг. 31 изображено сравнение анти-TNF- $\alpha$  активности IgG-Fab на основе формата обмена доменов.

На фиг. 32 изображено сравнение анти-TL1A активности IgG-Fab на основе типа мутации(-й) зарядовой пары.

На фиг. 33 изображено сравнение анти-TNF- $\alpha$  активности IgG-Fab на основе типа мутации(-й) зарядовой пары.

### Подробное описание изобретения

Определение терминов.

В последующем описании широко используется ряд терминов. Для облегчения понимания изобретения приведены следующие определения.

Если в тексте прямо не указано обратное, то форма единственного числа существительных и выражение "по меньшей мере один" используются взаимозаменяемым образом и означают один или большее количество.

"Связывающая единица", как используется в данном документе, означает любой мономерный или мультимерный белок или фрагмент белка, который специфически связывается с указанным целевым антигеном. Термин "связывающая единица" включает в себя, но не ограничиваясь этим, антитела и их связывающие части, такие как иммунологически функциональные фрагменты. Пептитела и пептиды представляют собой другие примеры связывающих единиц. Термин "иммунологически функциональный фрагмент" (или просто "фрагмент") связывающей единицы антитела или иммуноглобулиновой цепи (тяжелая или легкая цепь), как используется в данном документе, представляет собой вид связывающей единицы, содержащий часть (независимо от того, каким образом эта часть получена или синтезирована) антитела, которое не содержит по меньшей мере некоторых аминокислот, присутствующих в полнораз-

мерной цепи, но которое все еще способно специфически связываться с антигеном. Такие фрагменты биологически активны в том отношении, что они связываются с целевым антигеном и могут конкурировать с другими связывающимися единицами, включая интактные антитела, за связывание с данным эпитопом. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты являются нейтрализующими фрагментами. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты могут блокировать или уменьшать вероятность взаимодействия между целевым антигеном (TL1A или TNF- $\alpha$ ) и его рецептором. В одном аспекте такой фрагмент сохраняет по меньшей мере один участок определения комплементарности (CDR), присутствующий в полноразмерной легкой или тяжелой цепи, а в некоторых вариантах реализации изобретения будет содержать одну тяжелую цепь и/или легкую цепь или ее часть. Эти биологически активные фрагменты могут быть получены методами рекомбинантной ДНК или могут быть получены путем ферментативного или химического расщепления связывающих молекул, включая интактные антитела. Иммунологически функциональные фрагменты иммуноглобулина включают, но не ограничиваясь этим, Fab, диатело (вариабельный домен тяжелой цепи в том же полипептиде, что и вариабельный домен легкой цепи, соединенные посредством короткого пептидного линкера, который является слишком коротким, чтобы обеспечить спаривание между двумя доменами в одной цепи), Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, доменные антитела и одноцепочечные антитела и могут быть получены из любого источника млекопитающих, включая, но не ограничиваясь этим, человека, мышь, крысу, верблюда или кролика. Кроме того, предполагается, что функциональная часть связывающих молекул, раскрытых в данном документе, например, один или большее количество CDR, может быть ковалентно связана со вторым белком или с молекулой небольшого размера с получением терапевтического агента, направленно действующего на конкретную мишень в организме, который обладает бифункциональными терапевтическими свойствами или пролонгированным периодом полувыведения из сыворотки. Как будет понятно специалисту в данной области техники, связывающая молекула может содержать небелковые компоненты. В некоторых разделах данного документа примеры связывающих молекул названы в данном документе в терминах "число/буква/число" (например, 23B3), причем некоторые связывающие молекулы дополнительно идентифицированы при помощи дополнительных комбинаций букв/цифр (например, VH4). В этих случаях точное обозначение означает конкретное антитело. Т.е., связывающая молекула с названием 23B3 может обладать некоторой степенью идентичности последовательности, но не совпадает с антителом, названным 23B3 VH4 (если только они не были четко обозначены в описании как одинаковые).

"Единица, связывающаяся с TL1A" представляет собой связывающую единицу, которая специфически связывается с TL1A человека; т.е., связывающую единицу, для которой TL1A человека является целевым антигеном.

"Единица, связывающаяся с TNF- $\alpha$ ", представляет собой связывающую единицу, которая специфически связывается с TNF- $\alpha$  человека; т.е., связывающую единицу, для которой TNF- $\alpha$  человека является целевым антигеном.

"Антигенсвязывающий белок" относится к белку или полипептиду, который содержит антигенсвязывающий участок или антигенсвязывающую часть, обладающую выраженной аффинностью к другой молекуле, с которой она связывается (антиген). Антигенсвязывающие белки включают антитела, пептиды, фрагменты антител, производные антител, аналоги антител, гибридные белки и антигенные рецепторы, включая химерные антигенные рецепторы, XAP (CAR).

"Антитела" (Ab) и "иммуноглобулины" (Ig) представляют собой гликопротеины с одинаковыми структурными характеристиками. Хотя антитела проявляют специфичность связывания с конкретным антигеном, иммуноглобулины включают как антитела, так и другие антителоподобные молекулы, которые не обладают антигенной специфичностью. Полипептиды последнего типа, например, вырабатываются с низкими уровнями лимфатической системой и с повышенными уровнями при миеломе. Таким образом, как используется в данном документе, термин "антитело" или "пептид(ы) антитела" относится к интактному антителу, антителу, которое конкурирует за специфическое связывание с антителом, раскрытым в данном документе, или его антигенсвязывающему фрагменту, который конкурирует с интактным антителом за специфическое связывание и включает гибридные, гуманизированные, полностью человеческие и биспецифические антитела. В некоторых вариантах реализации изобретения антигенсвязывающие фрагменты получают, например, методами рекомбинантной ДНК. В дополнительных вариантах реализации изобретения антигенсвязывающие фрагменты получают путем ферментативного или химического расщепления интактных антител. Антигенсвязывающие фрагменты включают, но не ограничиваясь этим, Fab, Fab', F(ab)<sub>2</sub>, F(ab')<sub>2</sub>, Fv и одноцепочечные антитела.

Как используется в данном документе, термин "выделенное антитело" относится к антителу, которое было идентифицировано, выделено и/или извлечено из компонента его природной среды. Загрязняющими компонентами его природной среды являются материалы, которые будут мешать диагностическому или терапевтическому применению антитела и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В предпочтительных вариантах реализации изобретения антитело будет очищено (1) до более чем 95 мас.% антитела, по данным метода Лоури, и наиболее предпочтительно, до более чем 99 мас.%, (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 ос-

татков N-концевой или внутренней последовательности аминокислот, при помощи секвенатора с вращающимся стаканом, или (3) до гомогенности по данным НДС-ПАГЕ в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях с применением кумасси синего или, предпочтительно, серебрянки. Выделенное антитело включает антитело *in situ* в рекомбинантных клетках, поскольку по меньшей мере один компонент природной среды антитела будет отсутствовать. Обычно, однако, выделенное антитело будет получено с помощью по меньшей мере одной стадии очистки.

Термин "агонист" относится к любому соединению, включая белок, полипептид, пептид, антитело, фрагмент антитела, молекулу большого размера или молекулу небольшого размера (менее 10 кДа), которое усиливает активность, активацию или функцию другой молекулы.

Термин "антагонист" относится к любому соединению, включая белок, полипептид, пептид, антитело, фрагмент антитела, молекулу большого размера или молекулу небольшого размера (менее 10 кДа), которое ослабляет активность, активацию или функцию другой молекулы.

Термин "связывать(-ние)" антиген(-а) или другой(-го) полипептид(-а) включает, но не ограничиваясь этим, связывание лигандного полипептида по данному изобретению с рецептором; связывание рецепторного полипептида по данному изобретению с лигандом; связывание антитела по данному изобретению с антигеном или эпитопом; связывание антигена или эпитопа по данному изобретению с антителом; связывание антитела по данному изобретению с антиидиотипическим антителом; связывание антиидиотипического антитела по данному изобретению с лигандом; связывание антиидиотипического антитела по данному изобретению с рецептором; связывание антиидиотипического антитела по данному изобретению с лигандом, рецептором или антителом и т.д.

"Биспецифический" антигенсвязывающий белок представляет собой молекулу со связывающими единицами, полученную из первого антигенсвязывающего белка (например, антитела), который специфически связывается с первой представляющей интерес молекулой-мишенью, и второго антигенсвязывающего белка (например, антитела), который специфически связывается со второй представляющей интерес молекулой-мишенью. Биспецифические антигенсвязывающие белки могут быть получены различными способами, включая, но не ограничиваясь этим, слияние гибридом или соединение Fab'-фрагментов. См., например, Songsivilai et al., *Clin. Exp. Immunol.*, 79: 315-321 (1990); Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148: 1547-1553 (1992), включенные в данный документ посредством ссылки. Молекулы в форматах, изображенных на фиг. 1 и 2, представляют собой биспецифические антигенсвязывающие белки в соответствии с данным определением. Различные дополнительные форматы биспецифических антигенсвязывающих белков в рамках данного определения раскрыты в WO 2014/159725; WO 2013/041687; патенте США № 8945553; патенте США № 8945553; патенте США № 8258268; патентной заявке США № 2012/0195900; Международной патентной заявке WO 2012/088302; предварительной заявке США 62/218977;

Fischer and Leger (2007),

*Pathobiology* 74: 3-14; van Spruiel et al. (2000), *Immunology Today* 21(8): 391-7; Kufer et al. (2004), *Trends in Biotechnology* 22(5): 238-44; Byrne et al. (2013), *Trends in Biotechnology* 31(11): 621-31; Muller and Kontermann (2010), *Biodrugs* 24(2): 89-98; Chames and Baty (2009), <http://dx.doi.org/10.4161/mabs.1.6.10015>; Kontermann (2012), <http://dx.doi.org/10.4161/mabs.4.2.19000>; Holliger et al. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-8; Speiss et al., *Mol. Immunol.* (2015), 67: 95-106, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2015.01.003>; Holliger et al. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-8; Speiss et al., *Mol. Immunol.* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2015.01.003>; Ridgway et al. (1996), *Protein Eng.* 9: 617; Gunasekaran et al (2010), *J. Biol. Chem.* 285: 19637; Davis (2010), *Protein Eng. Des. & Sel.* 23: 195; DiGiammarino et al. (2012), *Methods Mol. Biol.* 899: 145, 2012); Lindhofer et al. (1995), *J. Immunol.* 155: 219; Schaefer et al. (2011), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108: 11187; Regula et al. патентной заявке США № 2010/0322934; Bostrom et al. (2009), *Science* 323:1610; патентной заявке США № 2011/0076722; Rossi et al. (2008), *Cancer Res.* 68:8384; каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки.

Термин "эпитоп" относится к части антигена, с которой специфически связывается антитело. Таким образом, термин "эпитоп" включает в себя любую белковую детерминанту, способную специфически связываться с иммуноглобулиновым или Т-клеточным рецептором. Эпитопные детерминанты обычно состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи сахара, и обычно имеют специфические характеристики трехмерной структуры, а также специфические характеристики заряда. Более конкретно, термин "эпитоп IL-17", "эпитоп TNF- $\alpha$ " и/или "эпитоп

p19/TNF- $\alpha$ ", как используется в данном документе, относится к части соответствующего полипептида, обладающего антигенной или иммуногенной активностью в организме животного, предпочтительно в организме млекопитающего и наиболее предпочтительно в организме мыши или человека. Эпитоп, обладающий иммуногенной активностью, представляет собой часть, например, полипептида IL-17A или IL-17F или TNF- $\alpha$ /p19, который вызывает ответ в форме антител в организме животного. Эпитоп, обладающий антигенной активностью, представляет собой часть, например, полипептида IL-17A или IL-17F или TNF- $\alpha$ /p19, с которым антитело иммуноспецифически связывается, по данным любого способа, хорошо известного в данной области техники, например, иммунологических анализов, расщепления протеазой, кристаллографии или HID-Exchange. Антигенные эпитопы необязательно должны быть иммуногенными. Такие эпитопы могут быть линейными по своей природе или могут представлять собой прерывистый эпитоп. Таким образом, как используется в данном документе, термин "конформационный эпитоп" относится к прерывистому эпитопу, образованному пространственным взаимоотношением между аминокислотами антигена, отличному от непрерывной серии аминокислот. Термин "иммуноглобулин" относится к белку, состоящему из одного или большего количества полипептидов, по существу кодируемых генами иммуноглобулина. Одна из форм иммуноглобулина составляет основную структурную единицу антитела. Эта форма представляет собой тетрамер и состоит из двух идентичных пар цепей иммуноглобулина, каждая из которых содержит одну легкую и одну тяжелую цепь. В каждой паре переменные участки легкой и тяжелой цепи совместно ответственны за связывание с антигеном, а константные участки ответственны за эффекторные функции антитела. Полноразмерные "легкие цепи" иммуноглобулина (около 25 кДа или около 214 аминокислот) кодируются геном переменного участка на NH<sub>2</sub>-конце (около 110 аминокислот) и геном константного участка каппа или лямбда на COOH-конце. Полноразмерные "тяжелые цепи" иммуноглобулина (около 50 кДа или около 446 аминокислот) аналогичным образом кодируются геном переменного участка (около 116 аминокислот) и одним из других вышеупомянутых генов константного участка (около 330 аминокислот). Тяжелые цепи классифицируются как гамма, мю, альфа, дельта или ипсилон и определяют изотип антитела как IgG (такой как IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), IgM, IgA, IgD и IgE, соответственно. В легкой и тяжелой цепях переменный и константный участки соединены участком "J" размером около 12 или большего количества аминокислот, причем тяжелая цепь дополнительно содержит участок "D", состоящий из около 10 аминокислот, (в общем см. *Fundamental Immunology* (Paul, W., ed., 2<sup>nd</sup> Edition, Raven Press, NY (1989)), глава 7 (включена посредством ссылки в полном объеме для всех целей). Переменный участок легкой или тяжелой цепи иммуноглобулина состоит из "каркасного" участка, прерываемого тремя гиперпеременными участками. Таким образом, термин "гиперпеременная участок" относится к аминокислотным остаткам антитела, которые ответственны за связывание с антигеном. Гиперпеременный участок содержит аминокислотные остатки из "определяющего комплементарность участка" или "CDR" (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5<sup>th</sup> Edition, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) и/или такие остатки из "гиперпеременной петли" (Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987)) (оба из которых включены в данный документ посредством ссылки). Остатки "каркасного участка" или "FR" представляют собой такие остатки переменного участка, отличные от остатков гиперпеременного участка, как определено в данном документе. Последовательности каркасных участков различных легких или тяжелых цепей относительно консервативны внутри вида. Таким образом, "каркасный участок человека" представляет собой каркасный участок, который по существу идентичен (около 85% или более, обычно 90-95% или более) каркасному участку встречающегося в природе иммуноглобулина человека. Каркасный участок антитела, т.е. объединенные каркасные участки составляющих легких и тяжелых цепей, служат целям позиционирования и выравнивания CDR. CDR в первую очередь ответственны за связывание с эпитопом антигена. Соответственно, термин "гуманизированный" иммуноглобулин относится к иммуноглобулину, содержащему каркасный участок человека и один или большее количество CDR из нечеловеческого иммуноглобулина (обычно мыши или крысы). Нечеловеческий иммуноглобулин, который предоставляет CDR, называется "донором", а иммуноглобулин человека, предоставляющий каркас, называется "акцептором". Константные участки не обязательно должны присутствовать, но если они есть, они должны быть по существу идентичными константным областям иммуноглобулина человека, т.е., идентичными по меньшей мере на около 85-90%, предпочтительно на около 95% или более. Следовательно, все части гуманизованного иммуноглобулина, за исключением, возможно, CDR, по существу идентичны соответствующим частям природных последовательностей иммуноглобулина человека. Кроме того, один или большее количество остатков в каркасном участке человека могут быть обратнотранслированы в родительскую последовательность для сохранения оптимальной антигенсвязывающей аффинности и специфичности. Таким образом, некоторые гуманизованные антитела сохраняют определенные каркасные остатки родительских нечеловеческих антител, чтобы сохранить связывающие свойства родительского антитела при минимизации его иммуногенности. Как используется в данном документе, термин "каркасный участок человека" включает участки с такими обратными мутациями. "Гуманизованное антитело" представляет собой антитело, содержащее гуманизованную легкую цепь и гуманизованную тяжелую цепь иммуноглобулина. Например, гуманизованное антитело не будет

включать типичное гибридное антитело, как определено выше, например, поскольку весь варибельный участок гибридного антитела не является человеческим.

Как используется в данном документе, термин "модифицированная тяжелая цепь" относится к гибриднему белку, содержащему тяжелую цепь иммуноглобулина, в частности тяжелую цепь IgG1 человека или тяжелую цепь IgG2 человека, и фрагмент функционального антитела (например, Fab или scFv) или его часть (например, легкая цепь иммуноглобулина или фрагмент Fd), причем фрагмент или его часть слиты на своем N-конце, необязательно через пептидный линкер, с C-концом тяжелой цепи. Термин "гуманизированный" иммуноглобулин относится к иммуноглобулину, содержащему каркасную область человека и один или большее количество CDR из нечеловеческого, например, мышинового, крысиного или кроличьего, иммуноглобулина. Нечеловеческий иммуноглобулин, предоставляющий CDR, называется "донором", а человеческий иммуноглобулин, предоставляющий каркас, называется "акцептором". Константные участки не обязательно должны присутствовать, но если они есть, они должны быть по существу идентичными константным участкам иммуноглобулина человека, т.е., идентичными по меньшей мере на около 85-90%, предпочтительно на около 95% или более. Следовательно, все части гуманизированного иммуноглобулина, за исключением, возможно, CDR и, возможно, нескольких обратно мутированных аминокислотных остатков в каркасном участке (например, 1-15 остатков), по существу идентичны соответствующим частям природной последовательности человеческого иммуноглобулина. "Гуманизированное антитело" представляет собой антитело, содержащее гуманизированную легкую цепь и гуманизированную тяжелую цепь иммуноглобулина. Например, гуманизированное антитело не будет включать типичное химерное антитело, как определено выше, например, поскольку вся варибельная область химерного антитела не является человеческой.

Каждый из терминов "человеческое антитело" и "полностью человеческое антитело" относится к антителу с аминокислотной последовательностью человеческого иммуноглобулина, включая антитела, выделенные из библиотек иммуноглобулина человека или из организма животных, трансгенных по одному или большому количеству иммуноглобулинов человека, которые не экспрессируют эндогенных иммуноглобулинов; например, антитела Xenomouse и антитела, описанные Kucherlapati et al. в патенте США № 5939598.

Термин "генетически модифицированные антитела" означает антитела, в которых аминокислотная последовательность отличается от аминокислотной последовательности природного антитела. Из-за значимости методов рекомбинантной ДНК при генерации антител не следует ограничиваться аминокислотными последовательностями, обнаруженных в природных антителах; поскольку антитела могут быть переработаны для получения желаемых характеристик. Возможные вариации многочисленны и варьируются от модификации всего одной или большего количества аминокислот до полной переработки, например, варибельного и/или константного участка. Модификации константного участка, в общем, будут осуществлены с целью улучшения или модификации характеристик, таких как фиксация комплемента, взаимодействие с мембранами и другие эффекторные функции. Модификации варибельного участка будут осуществлены с целью улучшения характеристик связывания с антигеном.

"Фрагмент Fab" состоит из одной легкой цепи и C<sub>H1</sub> и варибельных участков одной тяжелой цепи. Тяжелая цепь молекулы Fab не может образовывать дисульфидную связь с другой молекулой тяжелой цепи.

Фрагмент "Fab'" содержит одну легкую цепь и одну тяжелую цепь, которая содержит большую часть константного участка, между доменами C<sub>H1</sub> и C<sub>H2</sub>, таким образом, что между двумя тяжелыми цепями может быть образована межцепочечная дисульфидная связь с образованием молекулы F(ab')<sub>2</sub>.

Фрагмент "F(ab')<sub>2</sub>" содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи, содержащие часть константного участка между доменами C<sub>H1</sub> и C<sub>H2</sub>, таким образом, что между двумя тяжелыми цепями образуется межцепочечная дисульфидная связь.

Термин "нативный Fc" относится к молекуле или последовательности, содержащей последовательность не-антигенсвязывающего фрагмента, являющуюся результатом расщепления полноразмерного антитела, как в мономерной, так и в мультимерной форме. Исходный иммуноглобулиновый источник нативного Fc предпочтительно имеет человеческое происхождение и может быть любым из иммуноглобулинов, хотя предпочтительны IgG1, IgG2 и IgG4. Нативные Fc состоят из мономерных полипептидов, которые могут быть соединены в димерные или мультимерные формы ковалентной (т.е., дисульфидными связями) и нековалентной ассоциацией. Количество межмолекулярных дисульфидных связей между мономерными субъединицами нативных молекул Fc колеблется от 1 до 4 в зависимости от класса (например, IgG, IgA, IgE) или подкласса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgGA2). Одним из примеров нативного Fc является соединенный дисульфидными связями димер, полученный в результате расщепления IgG папаином (см. Ellison et al. (1982), *Nucleic Acids Res.* 10: 4071-9). Как используется в данном документе, термин "нативный Fc" является общим для мономерных, димерных и мультимерных форм.

Термин "вариант Fc" относится к молекуле или последовательности, которая модифицирована из нативного Fc, но по-прежнему содержит сайт связывания с рецептором реутилизации FcRn. В Международных заявках WO 97/34631 (опубликована 25 сентября 1997 г.) и WO 96/32478, которые включены в

данный документ посредством ссылки, описаны типичные варианты Fc, а также взаимодействие с рецептором реутилизации. Таким образом, термин "вариант Fc" включает молекулу или последовательность, которая гуманизирована из нечеловеческого нативного Fc. Кроме того, нативный Fc содержит сайты, которые могут быть удалены, поскольку они обеспечивают структурные признаки или биологическую активность, не требуемые для гибридных молекул по данному изобретению. Таким образом, термин "вариант Fc" включает молекулу или последовательность, в которой отсутствует один или большее количество сайтов нативного Fc или остатков, которые влияют или участвуют в (1) образовании дисульфидной связи, (2) несовместимости с выбранной клеткой-хозяином (3) N-концевой гетерогенности при экспрессии в выбранной клетке-хозяине, (4) гликозилировании, (5) взаимодействии с комплементом, (6) связывании с рецептором Fc, отличным от рецептора реутилизации, или (7) антителозависимой клеточной цитотоксичности, АЗКЦ (ADCC). Варианты Fc более подробно описаны ниже.

Термин "домен Fc" включает молекулы и последовательности нативного Fc и вариантов Fc, как определено выше. Как и в случае вариантов Fc и нативных Fc, термин "домен Fc" включает молекулы в мономерной или мультимерной форме, независимо от того, получены ли они расщеплением полноразмерного антитела или другими способами. Термин "мультимер" применительно к доменам Fc или молекулам, содержащим домены Fc, относится к молекулам, содержащим две или большее количество полипептидных цепей, соединенных с помощью ковалентного, нековалентного или ковалентного и нековалентного взаимодействия. Молекулы IgG обычно образуют димеры; IgM, пентамеры; IgD, димеры; и IgA, мономеры, димеры, тримеры или тетрамеры. Мультимеры могут быть образованы путем использования последовательности и результирующей активности нативного Ig-источника Fc или дериватизации (как определено ниже) такого нативного Fc.

Термин "димер" применительно к доменам Fc или молекулам, содержащим домены Fc, относится к молекулам, содержащим две полипептидных цепи, соединенные ковалентным или нековалентным способом. Таким образом, типичные димеры в рамках данного изобретения изображены на фиг. 2.

Термины "фрагмент Fv" и "одноцепочечное антитело" относятся к полипептидам, содержащим вариабельные участки антитела как из тяжелых, так и легких цепей, но не содержащим константных участков. Подобно полноразмерному антителу, он способен избирательно связываться с конкретным антигеном. При молекулярной массе всего около 25 кДа фрагменты Fv намного меньше обычных антител (150-160 кДа), которые состоят из двух тяжелых белковых цепей и двух легких цепей, и даже меньше, чем фрагменты Fab (около 50 кДа, одна легкая цепь и половина тяжелой цепи).

"Однодоменное антитело" представляет собой фрагмент антитела, состоящий из однодоменного блока Fv, например, V<sub>H</sub> или V<sub>L</sub>. Подобно полноразмерному антителу, оно способно избирательно связываться с конкретным антигеном. При молекулярной массе всего лишь 12-15 кДа однодоменные антитела намного меньше обычных антител (150-160 кДа), которые состоят из двух тяжелых белковых цепей и двух легких цепей, и даже меньше, чем фрагменты Fab (около 50 кДа, одна легкая цепь и половина тяжелой цепи) и одноцепочечные вариабельные фрагменты (около 25 кДа, два вариабельных домена, один из легкой и один из тяжелой цепи). Первые однодоменные антитела были сконструированы из антител, содержащих только тяжелую цепь, которые обнаружены у верблюдовых. Хотя большинство исследований однодоменных антител в настоящее время основано на вариабельных доменах тяжелой цепи, также показано, что вариабельные домены легкой цепи и наночастицы, полученные из легких цепей, специфически связываются с целевыми эпитопами.

Как используется в данном документе, термин "моноклональное антитело" не ограничивается антителами, полученными с помощью гибридной технологии. Термин "моноклональное антитело" относится к антителу, которое получено из одного клона, включая любой эукариотический, прокариотический или фаговый клон, а не к способу его получения.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-TL1A антигенсвязывающий белок, биспецифический антигенсвязывающий белок или функциональный фрагмент любого из них, из которого получен анти-TL1A связывающий домен, избирательно ингибирует TL1A человека относительно лигандов суперсемейства TNF. Антитело или его функциональный фрагмент "избирательно ингибирует" конкретный рецептор или лиганд по сравнению с другими рецепторами или лигандами, если IC<sub>50</sub> антитела в анализе ингибирования конкретного рецептора по меньшей мере в 50 раз ниже, чем IC<sub>50</sub> в анализе ингибирования другого "референтного" лиганда или рецептора. "IC<sub>50</sub>" представляет собой дозу/концентрацию, необходимую для достижения 50% ингибирования биологической или биохимической функции. В случае радиоактивных лигандов IC<sub>50</sub> представляет собой концентрацию конкурирующего лиганда, который вытесняет 50% специфического связывания радиоактивного лиганда. IC<sub>50</sub> любого конкретного вещества или антагониста можно определить, построив кривую дозы-ответа и исследуя влияние различных концентраций лекарственного средства или антагониста на реверсирующую активность агониста в конкретном функциональном анализе. Значения IC<sub>50</sub> могут быть вычислены для данного антагониста или лекарственного средства путем определения концентрации, необходимой для ингибирования половины максимального биологического ответа агониста. Таким образом, значение IC<sub>50</sub> для любого антитела против TL1A или его функционального фрагмента может быть вычислено путем определения концентрации антитела или фрагмента, необходимых для ингибирования половины максимального биологического

ответа TL1A при активации рецептора TL1A человека в любом функциональном анализе, таком как анализ, описанный в примере 14 ниже. Под антителом или его функциональным фрагментом, который избирательно ингибирует конкретный лиганд или рецептор, понимается нейтрализующее антитело или нейтрализующий фрагмент относительно этого лиганда или рецептора. Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения антитело против TL1A или его функциональный фрагмент, из которого получен анти-TL1A связывающий домен биспецифических антигенсвязывающих белков по изобретению, является антителом или фрагментом, нейтрализующим TL1A человека.

Вариабельные участки или участки CDR любого антитела против TL1A или его функционального фрагмента можно применять для конструирования связывающей анти-TL1A единицы любого из биспецифических антигенсвязывающих белков, описанных в данном документе. Подобным образом, вариабельные участки или последовательности CDR любого антитела против TNF- $\alpha$  или его функционального фрагмента можно применять для конструирования связывающей анти-TNF- $\alpha$  единицы любого из описанных в данном документе биспецифических антигенсвязывающих белков. Например, связывающий анти-TL1A домен биспецифических антигенсвязывающих белков по изобретению может содержать участки  $V_H$  и/или  $V_L$  или один или большее количество CDR из любого из антител против TL1A человека, описанных в патенте США № 7820798; патентной заявке США № 2008/0003221; патенте США № 8263743; патентной заявке США № 2011/0217310; патентной заявке США № 2012/0263718; патентной заявке США № 2014/0308271; WO 2012/161856; WO 2013/044298; WO 2005/018571; патентной заявке США № 2014/0120109; патенте США № 6521422; патентной заявке США № 2014/0255302; и патентной заявке США № 2015/0132311; каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело против TL1A, из которого получена связывающая анти-TL1A единица, перекрестно блокирует одно или большее количество антител против TL1A человека, описанных в одной из упомянутых ссылок, или одно или большее количество антител против TL1A человека, описанных ниже. Термины "перекрестно блокировать", "перекрестно блокированный" и "перекрестно блокирующий" используются в данном документе взаимозаменяемым образом для обозначения способности антитела препятствовать связыванию других антител или связывающих единиц с мишенью (например, TL1A человека). Степень, с которой антитело или связывающая единица может воспрепятствовать связыванию другого с мишенью (например, TL1A человека) и, следовательно, можно ли его отнести к перекрестно блокирующим, может быть определена с применением анализов конкурентного связывания. В некоторых вариантах реализации изобретения перекрестно блокирующее антитело или его связывающая единица уменьшает связывание TL1A человека с референтным антителом на от около 40 до 100%, например, на около 60% и около 100%, особенно предпочтительно на от около 70 до 100%, и конкретно более предпочтительно на от около 80% до 100%. В особенно подходящем количественном анализе для обнаружения перекрестного блокирования применяется аппарат Biacore, который измеряет степень взаимодействия с применением технологии поверхностного плазмонного резонанса. В другом подходящем количественном анализе перекрестного блокирования применяется подход на основе FACS для измерения конкуренции между антителами в показателях их связывания с TL1A человека. Типичный анализ для такого перекрестного блокирования приведен в патентной заявке США № 2015/0132311, пример 2, абзацы [0922]-[0924], которые включены в данный документ посредством ссылки.

Термин "нуклеиновая кислота" или "молекула нуклеиновой кислоты" относится к полинуклеотидам, таким как дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) или рибонуклеиновая кислота (РНК), олигонуклеотидам, фрагментам, полученным полимеразной цепной реакцией (ПЦР), и фрагментам, полученным любым из лигирования, расщепления, воздействия эндонуклеазы и воздействия экзонуклеазы. Молекулы нуклеиновой кислоты могут состоять из мономеров, которые являются природными нуклеотидами (такими как ДНК и РНК) или аналогами встречающихся в природе нуклеотидов (например,  $\alpha$ -энантиомерные формы природных нуклеотидов) или комбинацией обоих. Модифицированные нуклеотиды могут содержать модификации в сахарных фрагментах и/или во фрагментах пиримидиновых или пуриновых оснований. Модификации сахаров включают, например, замену одной или большего количества гидроксильных групп галогенами, алкильными группами, аминами и азидогруппами, или сахара могут быть функционализированы с образованием простых эфиров или сложных эфиров. Более того, весь сахарный фрагмент может быть заменен стерически и подобными с электронной точки зрения структурами, такими как аза-сахара и карбоциклические аналоги сахаров. Примеры модификаций во фрагменте основания включают алкилированные пурины и пиримидины, ацилированные пурины или пиримидины или другие хорошо известные гетероциклические заместители. Молекулы нуклеиновой кислоты могут быть соединены фосфодиэфирными связями или аналогами таких связей. Аналоги фосфодиэфирных связей включают фосфортиоат, фосфордитиоат, фосфорселеноат, фосфордиселеноат, фосфоранилотиоат, фосфоранилидат, фосфорамидат и т.п. Термин "молекула нуклеиновой кислоты" дополнительно включает так называемые "пептидные нуклеиновые кислоты", которые содержат природные или модифицированные основания нуклеиновых кислот, присоединенные к полиамидному скелету. Нуклеиновые кислоты могут быть однопечечными или двухпечечными.

Термин "молекула, комплементарная молекуле нуклеиновой кислоты" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, имеющей комплементарную нуклеотидную последовательность и обратную ориентацию по сравнению с референтной нуклеотидной последовательностью.

Термин "вырожденная нуклеотидная последовательность" обозначает последовательность нуклеотидов, которая содержит один или большее количество вырожденных кодонов по сравнению с референтной молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид. Вырожденные кодоны содержат другие триплеты нуклеотидов, но кодируют один и тот же аминокислотный остаток (т.е., каждый из триплетов GAU и GAC кодирует Asp).

"Выделенная молекула нуклеиновой кислоты" представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая не интегрирована в геномную ДНК организма. Например, молекула ДНК, которая кодирует фактор роста, выделенная из геномной ДНК клетки, представляет собой выделенную молекулу ДНК. Другим примером выделенной молекулы нуклеиновой кислоты является химически синтезированная молекула нуклеиновой кислоты, которая не интегрирована в геном организма. Молекула нуклеиновой кислоты, которая была выделена из конкретного вида, меньше, чем полноразмерная молекула ДНК хромосомы этого вида.

"Конструкция молекулы нуклеиновой кислоты" представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, как одно-, так и двухцепочечную, которая была модифицирована посредством вмешательства человека, таким образом, что она содержит сегменты нуклеиновой кислоты, объединенные и сопоставленные в последовательности, не существующий в природе.

"Комплементарная ДНК (кДНК)" представляет собой одноцепочечную молекулу ДНК, которая образована из матрицы мРНК ферментом обратной транскриптазой. Как правило, для инициирования обратной транскрипции применяют праймер, комплементарный частям мРНК. Специалисты в данной области дополнительно используют термин "кДНК" для обозначения двухцепочечной молекулы ДНК, состоящей из такой одноцепочечной молекулы ДНК и комплементарной ей цепи ДНК. Кроме того, термин "кДНК" относится к клону молекулы кДНК синтезированному из шаблона РНК. "Промотор" представляет собой нуклеотидную последовательность, которая направляет транскрипцию структурного гена. Как правило, промотор расположен в 5'-некодирующей области гена, проксимального относительно сайта начала транскрипции структурного гена. Элементы последовательности внутри промоторов, которые функционируют при инициировании транскрипции, часто характеризуются консенсусными последовательностями нуклеотидов. Эти промоторные элементы включают сайты связывания с РНК-полимеразой, последовательности TATA, последовательности CAAT, специфические для дифференциации элементы (DSE, McGehee et al., *Mol. Endocrinol.*, 7:551 (1993)), элементы ответа на циклический АМФ (CRE), элементы сывороточного ответа (SRE, Treisman, *Seminars in Cancer Biol.*, 1:47 (1990)), элементы глюкокортикоидного ответа (GRE) и сайты связывания с другими факторами транскрипции, такими как CRE/ATF (O'Reilly et al., *J. Biol. Chem.*, 267: 19938 (1992)), AP2 (Ye et al., *J. Biol. Chem.*, 269: 25728 (1994)), SP1, белок, связывающий элемент ответа цАМФ (CREB; Loeken, *Gene Expr.*, 3:253 (1993)) и октамерных факторов (в общем см. Watson et al., eds., *Molecular Biology of the Gene*, 4<sup>th</sup> Edition, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. (1987), и Lemaigre et al., *Biochem. J.*, 303: 1 (1994)). Если промотор является индуцибельным промотором, то скорость транскрипции возрастает в ответ на индуцирующий агент. Напротив, скорость транскрипции не регулируется индуцирующим агентом, если промотор является конститутивным промотором. Известны также запретительные промоторы.

"Регуляторный элемент" представляет собой нуклеотидную последовательность, которая модулирует активность основного промотора. Например, регуляторный элемент может содержать нуклеотидную последовательность, которая связывается с клеточными факторами, обеспечивающими транскрипцию исключительно или преимущественно в определенных клетках, тканях или органеллах. Эти типы регуляторных элементов обычно связаны с генами, которые экспрессируются "клеточноспецифическим", "тканеспецифическим" или "органеллоспецифическим" образом.

"Энхансер" представляет собой тип регуляторного элемента, который может повысить эффективность транскрипции, независимо от расстояния или ориентации энхансера относительно сайта начала транскрипции.

"Гетерологичная ДНК" относится к молекуле ДНК или популяции молекул ДНК, которая от природы не существует в данной клетке-хозяине. Молекулы ДНК, гетерологичные конкретной клетке-хозяину, могут содержать ДНК, полученную из вида клетки-хозяина (т.е., эндогенную ДНК), до тех пор, пока такая ДНК хозяина сочетается с ДНК, не относящейся к хозяину (т.е., экзогенной ДНК). Например, молекула ДНК, содержащая сегмент ДНК, не относящейся к хозяину, который кодирует полипептид, функционально связанный с сегментом ДНК хозяина, содержащим транскрипционный промотор, считается гетерологичной молекулой ДНК. И наоборот, гетерологичная молекула ДНК может содержать эндогенный ген, функционально связанный с экзогенным промотором. В качестве еще одной иллюстрации молекула ДНК, содержащая ген, полученный из клетки дикого типа, считается гетерологичной ДНК, если указанную молекулу ДНК вводят в мутантную клетку, в которой отсутствует ген дикого типа. "Вектор экспрессии" представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую ген, который экспрессируется в клетке-хозяине. Обычно вектор экспрессии содержит промотор транскрипции, ген и терминатор

транскрипции. Экспрессию гена обычно проводят под контролем промотора, и такой ген называют "функционально связанным с" промотором. Подобным образом, регуляторный элемент и основной промотор функционально связаны, если регуляторный элемент модулирует активность основного промотора.

"Рекомбинантный хозяин" представляет собой клетку, которая содержит молекулу гетерологичной нуклеиновой кислоты, такую как вектор клонирования или вектор экспрессии. В данном контексте примером рекомбинантного хозяина является клетка, которая продуцирует антагонист по данному изобретению из вектора экспрессии. Напротив, такой антагонист может быть продуцирован клеткой, которая является "природным источником" указанного антагониста и которая не содержит вектора экспрессии.

Термины "амино-концевой" и "карбокси-концевой" используются в данном документе для обозначения положений внутри полипептидов. Если контекст позволяет, эти термины используются со ссылкой на конкретную последовательность или часть полипептида для обозначения близости или относительного положения. Например, определенная последовательность, размещенная в направлении карбокси-конца относительно референтной последовательности внутри полипептида, расположена ближе к карбоксильному концу референтной последовательности, но необязательно находится на карбоксильном конце полноразмерного полипептида.

"Химерный белок" представляет собой гибридный белок, экспрессируемый молекулой нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидные последовательности по меньшей мере из двух генов. Например, химерный белок может содержать по меньшей мере часть полипептида IL-17RA, слитую с полипептидом, который связывается с аффинной матрицей. Такой химерный белок обеспечивает средство для выделения больших количеств IL-17A с применением аффинной хроматографии.

Термин "рецептор" обозначает связанный с клеткой белок, который связывается с биоактивной молекулой, называемой "лигандом". Это взаимодействие опосредует влияние лиганда на клетку. Рецепторы могут быть мембраносвязанными, цитозольными или ядерными; мономерными (например, рецептор тиреотропного гормона, бета-адренергический рецептор) или мультимерными (например, рецептор PDGF, рецептор гормона роста, рецептор IL-3, GM-CSF рецептор, рецептор G-CSF, рецептор эритропоэтина и рецептор IL-6). Мембраносвязанные рецепторы характеризуются многодоменной структурой, включающей внеклеточный лигандсвязывающий домен и внутриклеточный эффекторный домен, который обычно участвует в передаче сигнала. В некоторых мембраносвязанных рецепторах внеклеточный лигандсвязывающий домен и внутриклеточный эффекторный домен расположены в отдельных полипептидах, которые составляют полнофункциональный рецептор. В общем, связывание лиганда с рецептором приводит к конформационному изменению рецептора, которое вызывает взаимодействие между эффекторным доменом и другой(-ими) молекулой(-ами) в клетке, что, в свою очередь, приводит к модификации метаболизма клетки. Метаболические события, которые часто связаны с взаимодействиями рецептора-лиганда, включают транскрипцию генов, фосфорилирование, дефосфорилирование, повышение выработки циклического АМФ, мобилизацию клеточного кальция, мобилизацию мембранных липидов, клеточную адгезию, гидролиз инозитоллипидов и гидролиз фосфолипидов.

Термин "экспрессия" относится к биосинтезу генного продукта. Например, в случае структурного гена экспрессия включает транскрипцию структурного гена в мРНК и трансляцию мРНК в один или большее количество полипептидов.

Термин "пара комплементарного/анти-комплементарного" обозначает неидентичные фрагменты, которые в соответствующих условиях образуют соединенную подходящей ковалентной связью устойчивую пару. Например, биотин и авидин (или стрептавидин) являются прототипическими членами пары комплементарного/антикомплементарного. Другие типичные пары комплементарного/анти-комплементарного включают пары рецепторов/лигандов, пары антитела/антигена (или гаптен или эпитоп), пары смысловых/антисмысловых полинуклеотидов и т.п. Если желательна последующая диссоциация пары комплементарного/анти-комплементарного, то пара комплементарного/анти-комплементарного предпочтительно обладает аффинностью связывания менее  $10^9 \text{ M}^{-1}$ .

"Обнаружимая метка" представляет собой молекулу или атом, которые могут быть конъюгированы с фрагментом антитела для получения молекулы, пригодной для диагностики. Примеры обнаружимых меток включают хелаторы, фотоактивные агенты, радиоизотопы, флуоресцентные агенты, парамагнитные ионы или другие маркерные фрагменты.

Термин "аффинная метка" используется в данном документе для обозначения сегмента полипептида, который может быть присоединен ко второму полипептиду, чтобы обеспечить очистку или обнаружение второго полипептида или предоставить сайты для присоединения второго полипептида к субстрату. В принципе, любой пептид или белок, для которого доступно антитело или другой специфический связывающий агент, можно применять в качестве аффинной метки. Аффинные метки включают полигистидиновый тракт, белок А (Nilsson et al., EMBO J., 4: 1075 (1985); Nilsson et al., Methods Enzymol., 198: 3 (1991)), глутатион S-трансферазу (Smith et al., Gene, 67: 31 (1988)), аффинную метку Glu-Glu (Grussmeyer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 7952 (1985)), вещество Р, пептид FLAG® (Hopp et al., Biotechnology, 6:1204 (1988)), связывающийся со стрептавидином пептид или другой антигенный эпитоп или связывающий домен. В общем, см. Ford et al., Protein Expression and Purification, 2: 95 (1991). Молекулы ДНК кодирующие аффинные метки, доступны от коммерческих поставщиков (например, Pharmacia Bio-

tech, Пискатауэй, штат Нью-Джерси).

Термин "кислый остаток" относится к аминокислотным остаткам, в которых присутствуют боковые цепи, содержащие кислотные группы. Примеры кислых остатков включают D и E.

Термин "амидный остаток" относится к аминокислотам, в которых присутствуют боковые цепи, содержащие амидные производные кислотных групп.

Типичные остатки включают N и Q.

Термин "ароматический остаток" относится к аминокислотным остаткам, в которых присутствуют боковые цепи, содержащие ароматические группы. Типичные ароматические остатки включают F, Y и W.

Термин "основной остаток" относится к аминокислотным остаткам, в которых присутствуют боковые цепи, содержащие основные группы. Типичные основные остатки включают H, K и R.

Термин "гидрофильный остаток" относится к аминокислотным остаткам, в которых присутствуют боковые цепи, содержащие полярные группы. Типичные гидрофильные остатки включают C, S, T, N и Q.

Термин "нефункциональный остаток" относится к аминокислотным остаткам, в которых присутствуют боковые цепи, не содержащие кислотных, основных или ароматических групп. Типичные нефункциональные аминокислотные остатки включают M, G, A, V, I, L и норлейцин (Nle).

В данном изобретении может применяться индекс EU, как в Kabat et al. (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest 5<sup>th</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, и схемы нумерации АНо (Honegger and Plückthun (2001), J Mol Biol. 8; 309(3): 657-70). Положения аминокислот и CDR и FR данного антитела могут быть идентифицированы с применением любой системы. Например, положения тяжелой цепи EU 39, 44, 183, 356, 357, 370, 392, 399 и 409 эквивалентны положениям тяжелой цепи АНо 46, 51, 230, 484, 485, 501, 528, 535 и 551, соответственно. Подобным образом, положения легкой цепи EU 38, 100 и 176 эквивалентны положениям легкой цепи АНо 46, 141 и 230, соответственно. Табл. (i), (ii) и (iii) ниже демонстрируют эквивалентность между позициями нумерации для версий положения заряда v1, v2 и v3 с целью обеспечения правильной сборки, например, биспецифических антигенсвязывающих белков IgG-Fab.

Таблица (i)-v1

Цепь	Домен	Мутация	№ АНо	№ EU	№ по Кабату
LC-E	Константный	E	230	176	176
LC-K	Константный	K	230	176	176
HC-E	СН1	E	230	183	188
HC-K	СН1	K	230	183	188

Таблица (ii)-v2

Цепь	Домен	Мутация	№ АНо	№ EU	№ по Кабату
LC-E	Вариабельный	E	46	38	38
	Константный	E	230	176	176
LC-K	Вариабельный	K	46	38	38
	Константный	K	230	176	176
HC-E	Вариабельный	E	46	39	39
	СН1	E	230	183	188
HC-K	Вариабельный	K	46	39	39
	СН1	K	230	183	188

Таблица (iii)-v3

Цепь	Домен	Мутация	№ АНо	№ EU	№ по Кабату
LC-E	Вариабельный	E	141	100	100
	Константный	E	230	176	176
LC-K	Вариабельный	K	141	100	100
	Константный	K	230	176	176
HC-E	Вариабельный	E	51	44	44
	СН1	E	230	183	188
HC-K	Вариабельный	K	51	44	44
	СН1	K	230	183	188

Форматы биспецифических антигенсвязывающих белков по изобретению.

Один аспект изобретения относится к новым TL1A-специфическим антигенсвязывающим белкам и антителам. Такие антитела пригодны для лечения состояний, известных в данной области техники и описанных ниже, которые поддаются лечению путем ингибирования биологической активности TL1A.

Другой аспект изобретения относится к биспецифическим антигенсвязывающим белкам, в которых одна пара легкой цепи-тяжелой цепи специфически связывается с TL1A, а другая пара легкой цепи-

тяжелой цепи связывается с TNF- $\alpha$ . Такие биспецифические антигенсвязывающие белки могут быть полноразмерными антителами (см. фиг. 1) или фрагментами F(ab')<sub>2</sub>. В этом аспекте изобретения единица, связывающаяся с TL1A, является одновалентной в отношении TL1A, а единица, связывающаяся с TNF- $\alpha$ , является одновалентной в отношении TNF- $\alpha$ . В другом варианте реализации биспецифического антигенсвязывающего белка единица, связывающаяся с TL1A, и единица, связывающаяся с TNF- $\alpha$ , расположены в общей структуре, обозначенной в данном документе как IgG-scFv. В этом варианте реализации изобретения первая связывающаяся единица имеет структуру антитела, т.е., две пары иммуноглобулиновых цепей, причем каждая пара содержит одну легкую цепь и одну тяжелую цепь. Вторая связывающаяся единица содержит структуру пары блоков Fv - т.е., каждый элемент пары содержит варибельный домен из тяжелой цепи и варибельный домен из легкой цепи, соединенные в тандеме в виде одной цепи. В конфигурации IgG-scFv каждый блок Fv ковалентно соединен с С-концом константного домена тяжелой цепи (Fc) первой связывающейся единицы (см. фиг. 2). Каждый блок Fv может быть соединен с доменом Fc первой связывающейся единицы напрямую или через линкер. В этом варианте реализации изобретения каждая связывающаяся единица является двухвалентной в отношении своего целевого антигена. В предпочтительном варианте реализации изобретения единица, связывающаяся с TL1A, имеет структуру антитела, а единица, связывающаяся с TNF- $\alpha$ , имеет структуру пары блоков Fv.

Изобретение дополнительно относится к биспецифическим антителам с мутациями для обеспечения правильного спаривания тяжелой-тяжелой и тяжелой-легкой цепи. Такие мутации описаны в патенте США 8592562; WO 2009/089004; WO 2006/106905; WO 2014/4082179; WO 2014/081955; Speiss et al., *Mol. Immunol.* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2015.01.003>; каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки.

Кроме того, изобретение относится к единице, связывающейся с TL1A, и единице, связывающейся с TNF- $\alpha$ , сгруппированным в других форматах биспецифических антигенсвязывающих белков, известных в данной области техники. Конкретно, изобретение относится к единицам, связывающимся с TL1A и TNF- $\alpha$ , в форматах, описанных в WO 2014/159725; WO 2013/041687; патенте США № 8945553; патенте США № 8945553; патенте США № 8258268; патентной заявке США № 2012/0195900; Международной патентной заявке WO 2012/088302; предварительной заявке США

62/218977; Fischer and Leger (2007), *Pathobiology* 74: 3-14; van Spriell et al. (2000), *Immunology Today* 21(8): 391-7; Kufer et al. (2004), *Trends in Biotechnology* 22(5): 238-44; Byrne et al. (2013), *Trends in Biotechnology* 31(11): 621-31; Muller and Kontermann (2010), *Biodrugs* 24(2): 89-98; Chames and Baty (2009), <http://dx.doi.org/10.4161/mabs.1.6.10015>; Kontermann (2012), <http://dx.doi.org/10.4161/mabs.4.2.19000>; Holliger et al. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-8; Speiss et al., *Mol. Immunol.* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2015.01.003>; WO 2009/089004, опубликованной 16 июля 2009 г.; Holliger et al. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-8; Speiss et al., *Mol. Immunol.* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2015.01.003>; Ridgway et al. (1996), *Protein Eng.* 9: 617; Gunasekaran et al. (2010), *J. Biol. Chem.* 285: 19637; Davis (2010), *Protein Eng. Des. & Sel.* 23: 195; DiGiammarino et al. (2012), *Methods Mol. Biol.* 899: 145, 2012); Lindhofer et al. (1995), *J. Immunol.* 155: 219; Schaefer et al. (2011), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108: 11187; Regula et al. патентной заявке США №: 2010/0322934; Bostrom et al. (2009), *Science* 323:1610; патентной заявке США № 2011/0076722; Rossi et al. (2008), *Cancer Res.* 68: 8384; каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки.

#### **Предпочтительные варианты реализации изобретения**

Аминокислотные последовательности антигенсвязывающих белков и связывающих единиц предпочтительно основаны на последовательностях человеческих и/или гуманизированных моноклональных антител против TL1A и TNF- $\alpha$ . Кроме того, изобретение включает последовательности, обладающие идентичностью последовательности по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% с предпочтительными последовательностями, указанными ниже. Аминокислотные последовательности, представленные в следующих таблицах, являются предпочтительными для антигенсвязывающих белков по данному изобретению, включая биспецифические антигенсвязывающие белки в любом формате. TL1A-специфические антигенсвязывающие белки TL1A-специфические антигенсвязывающие белки и антигенсвязывающие единицы предпочтительно содержат последовательности участка, определяющего комплементарность (CDR), полученные из предпочтительных антител против TL1A, описанных в данном документе. В табл. А представлены предпочтительные последовательности CDR наряду с предпочтительными антителами, из которых они были получены. На всем протяжении LCDR1, LCDR2 и LCDR3 относятся к CDR легкой цепи; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 - к CDR тяжелой цепи. На всем протя-

жении идентификационный номер последовательности (SEQ ID NO) для каждой последовательности приведен в круглых скобках после последовательности в таблице.

Таблица А

## Предпочтительные TL1A-связывающие последовательности CDR

Обозначение исходного антитела	LCDR1 (SEQ ID NO)	LCDR2 (SEQ ID NO)	LCDR3 (SEQ ID NO)	HCDR1 (SEQ ID NO)	HCDR2 (SEQ ID NO)	HCDR3 (SEQ ID NO)
3C6	RTSQDIR DDLQ (98)	DASSLQS (100)	LQHNSYP PT (102)	SYGMH (164)	VISYDGN NKLYTDS VKG (166)	PTVTLY YYYGM DV (168)
2G11	RASQSIN NYLN (110)	ATSSLQS (106)	QQSYSTP RT (108)	SYFWS (170)	YIYYSGS TNYNPSL KS (172)	EIGSYY GFDY (174)
9C8	RASQSIN NYLN (110)	AASSLQS (112)	QQSYSTP RT (108)	SYFWS (170)	YIYYSGN TKYNPSL KS (178)	ETGSYY GFDY (180)
23B3	KSSQSVL YSSNNKN YLV (116)	WASTRE S (118)	QQYYKT PLT (120)	TNSVAW N (182)	RTYYRSK WYNDYA VSVKS (184)	EDGDS YYRYG MDV (186)
23B3 VH4	RSSQSVL YSSNNKN YLV (128)	WASTRE S (118)	QQYYKT PLT (120)	TNSVAW N (182)	RTYYRSK WYNDYA VSLKS (196)	EDGDS YYRYG MDV (186)
23B3 VH3	RSSQSVL YSSNNKN YLV (128)	WASTRE S (118)	QQYYKT PLT (120)	TNSVAW N (182)	RTYYRSK WYNDYA VSVKG (202)	EDGDS YYRYG MDV (186)
3B3	RASQSVR SSYLA (122)	GASSRAT (124)	QQYGSSP T (126)	GYWVN (188)	EINHAGN TNYNPSL KS (190)	GYCRST TCYFD Y (192)
5G4	RASQSVR SSYLA (122)	GASSRAT (124)	QQYGSSP T (126)	GYWVN (188)	EINHSGIT NYPNPSLK S (483)	GYCRST TCYFD Y (192)

048161

17E9	RASQGIS NDLA (469)	AASSLQS (112)	LQHNSYP PT (102)	SYGMH (164)	VMSYDG NNKLYA DSVKG (485)	DETETL YYYYGI DV (489)
53D3	RSSQSL YSNGYN YLD (683)	LGSSRAS (685)	MQPLQTP LT (687)	TYYMS (777)	SISSSSFI YYADSV KG (779)	DRIAAP GTYYY YGMDV (781)
54E5	KSSQNIL YSSNNKN YLA (689)	WASTRE S (118)	QQYYSIP WT (693)	TYGMH (783)	VIWYDG SNKDYA DSVKG (785)	EERDSY YHYGM DV (787)
56E1	KSSQSVL YSSNNKN YLA (235)	WASTRE S (118)	QQYYSIP WT (693)	SYGMH (164)	VIWYDG SNKDYA DSVKG (785)	EERDSY YHYGM DV (787)
57A8	TGSSSNIG AGYNVH (697)	GNNNRP S (699)	QSYDSSL SGWV (701)	SYVMS (792)	VISGSGG STYYADS VKG (794)	GGTNY YYYYS GMDV (796)
58G5	TGSSSNIG AGYDVH (146)	GNSHRPS (705)	QSYDSSL SGYV (707)	NYAMS (798)	VISGRGG STYYADS VKG (800)	DGYSS AWYFD Y (802)
60G11	TGSGSNI GAGYDV H (709)	GNSHRPS (705)	QSYDSSL SGYV (707)	NYAMN (804)	VISGRGG STYYADS VKG (800)	DGYSS AWFFD Y (807)
73C2	RASQSFS SYLN (713)	AASSLQS (112)	QQSYSTP RS (717)	SSSATWN (809)	RTYQRSK WNNDYA VSVKS (811)	EVVAG PRWFD P (813)
76A4	RASQSVT SYLN (719)	TASSLQS (721)	QQSYSTP RS (717)	SNSATW N (815)	RTYYRSK LYNDYA VSVKS (817)	EVVAG PRWFD P (813)
77D12	SENSDIG TNAV N (723)	SNNKRPS (725)	ATWDDN LNGPL (727)	GFYMH (819)	WINPDSG GTNYAQ KFQG (821)	EGIAVA LTY (823)
87H11	RASQSISS YLN (229)	VASSLQS (731)	QQSYSNP QECS (733)	GYYS (265)	EINHSGR TNYNPSL KS (827)	DSGWH FSFDI (829)
88H9	RASQGIR NDLG (226)	AASGLQ G (737)	LQHNSYP TWT (739)	SYGMH (164)	VIWFDGS NEYAD SVKG (832)	ERWFG ELLDY (834)

89H9	RASQSI YYLN (741)	AASSLQ S (112)	QQSYSSI T (745)	SYAMS (836)	GISGGG STYYAD S VKG (838)	EMAGA FDI (840)
91D7	RASQNI SYLN (747)	TASSLQ S (749)	QQSYSNP PESS (751)	GYYS (265)	EINPVGR TNYKPSL KS (843)	DNGWH YAFDI (845)
91F10_L C 1	RSSQSLV YSDGNTY LN (753)	KVSNWD S (755)	MQGTHW P (757)	AYYMH (847)	WINPNSG GTNYAQ KFRG (849)	GGWE GFDY (851)
91F10_L C 2	RASQSI SS YLN (229)	AASRLQ S (761)	QQSDSTP IT (763)	AYYMH (847)	WINPNSG GTNYAQ KFRG (849)	GGWE GFDY (851)
91G8	RASQSI SS YLN (229)	AASSLQ S (112)	QQSFSTI T (767)	SYAMS (836)	GISGSGG SRYAD S VKG (853)	EVAGA FDI (855)
92D3	RASQSI SS YLN (229)	GASRLQ S (769)	QQSDTTP IT (771)	GYMH (857)	WIIPNSG GTNYAQ KFQG (859)	GSSWE GFDY (861)
92E5	RASQSI HYLN (773)	AASSLQ S (112)	QQSFSSI T (775)	SYAMS (836)	GISGRGG STYYAD S VKG (864)	EVAGA FDI (855)

Каждая из приведенных выше последовательностей кодируется нуклеотидной последовательностью, непосредственно предшествующей ей в Перечне последовательностей. На всем протяжении последовательности из антител 9C8 и 3B3 являются предпочтительными.

В антигенсвязывающих белках по данному изобретению предпочтительно избегать сайтов изомеризации. Последовательности из двух аминокислот DG, DH, DS и DT являются известными сайтами изомеризации. Настоящее изобретение дополнительно относится к антигенсвязывающим белкам, в которых последовательности исходного антитела, включая последовательности CDR, модифицированы для устранения сайтов изомеризации. С учетом этого изобретение относится к антигенсвязывающим белкам, в которых HCDR2 представляет собой модифицированную форму HCDR2 из исходного антитела 3C6, имеющего последовательность VISYDXNNKLYTDXVKG (SEQ ID NO: 204), где каждый X независимо представляет собой остаток, отличный от G, H, S, или T (т.е., A, C, D, E, F, I, K, L, M, N, P, Q, R, V, W или Y), причем предпочтительным является A. Кроме того, изобретение относится к антигенсвязывающим белкам, в которых HCDR2 представляет собой модифицированную форму HCDR2 из исходного антитела 3C6, где кислый остаток D заменен на E, чтобы удалить сайты изомеризации, что дает последовательность VISYEGNNKLYTESVKG (SEQ ID NO: 678).

Изобретение дополнительно относится к антигенсвязывающим белкам, в которых HCDR3 представляет собой модифицированную форму HCDR3 из исходного антитела 23B3, имеющего последовательность EDGDXYRYGMDV (SEQ ID NO: 676).

Кроме того, изобретение относится к антигенсвязывающим белкам, в которых сайт изомеризации HCDR3 из исходного антитела 23B3 удален путем замены кислого остатка D на E, что дает последовательность EEGESYYRYGMDV (SEQ ID NO: 657).

В антигенсвязывающих белках по данному изобретению предпочтительно избегать сайтов дезамидирования. Последовательности из двух аминокислот NG, NH, NS и NT являются известными сайтами дезамидирования. Данное изобретение дополнительно относится к антигенсвязывающим белкам, в которых последовательности исходного антитела, включая последовательности CDR, модифицированы для устранения сайтов дезамидирования. Одним из способов устранения сайтов дезамидирования является замена второго аминокислотного остатка в сайтах NG, NH, NS и NT остатком, отличным от G, H, S или T (т.е., A, C, D, E, F, I, K, L, M, N, P, Q, R, V, W или Y). Предпочтительным способом устранения сайтов дезамидирования является замена N в NG, NH, NS и NT на Q. С учетом этого изобретение относится к антигенсвязывающим белкам, имеющим следующую последовательность, в дополнение к перечисленным в табл. А:

LCDR3 может иметь последовательность LQHQSYPPT (SEQ ID NO: 631) на основе модификации последовательности из исходного антитела 3C6;

HCDR1 может иметь последовательности TQSVAWN (SEQ ID NO: 632) на основе модификации последовательности из исходного антитела 23B3 VH4;

HCDR2 может иметь последовательности YIYSGQTKYNPSLKS (SEQ ID NO: 633) или EIQHAGQTNYNPSLKS (SEQ ID NO: 677) на основе модификации последовательностей из исход-

ных антител 9С8 и 3В3, соответственно.

Антигенсвязывающие белки по данному изобретению дополнительно могут быть результатом замещения кислого остатка другим кислым остатком, амидного остатка другим амидным остатком и аналогично для ароматических остатков, основных остатков, гидрофильных остатков, нефункциональных остатков, нейтральных полярных остатков и полярных гидрофобных остатков. Такое замещение нефункциональных остатков CDR исходного антитела дает последовательности по изобретению, представленные в табл. В, где каждый X независимо представляет собой М, G, A, V, I или L.

Таблица В

TL1A-связывающие последовательности CDR с заменой

Обозначение исходного антитела	LCDR1 (SEQ ID NO)	LCDR2 (SEQ ID NO)	LCDR3 (SEQ ID NO)	HCDR1 (SEQ ID NO)	HCDR2 (SEQ ID NO)	HCDR3 (SEQ ID NO)
3С6	RTSQDXR DDLX (635)	DXSSLQS (636)	XQHQS Y PPT (637), XQHNXY PPT (638), LQHQSYP PT (631),	SYXXH (639)	XXSYDXNN KXYTDXX KX (640), VISYDXNN KLYTDXVK G (204), VISYEGNN KLYTESVK G (678), XXSYEXNN KLYTESXK X (679)	PTXTXY YYYXXD V (641)
2G11	RXSQSXN NYLN (642)	XTSSXQS (643)	QQSYSTP RT (108)	SYFWS (170)	YXYYSXST NYNPSXKS (644)	EXXSYY XFDY (645)
9С8	RXSQSXN NYXN (646)	XXSSXQS (647)	QQSYSTP RT (108)	SYFWS (170)	YXYYSXQT KYNPSXKS (648), YXYYSXNX KYNPSXKS (649), YIYYSGQT KYNPSLKS (633)	ETXSYY XFDY (650)
23В3	KSSQSVX YSSNNK NYXX (651)	WXSTRES (652)	QQYYKT PXT (653)	TQSXX WN (654), TNXXX WN (655),	RTYYRSKW YNDYXVSX KS (656)	EDXDSY YRYXXD V (657), EDGDXY YRYGM DV (676),

				TQSVA WN (632)		EEGESY YRYGM DV (680), EEXESY YRYXXD X (681)
23B3 VH4	RSSQSVX YSSNNK NYXX (658)	WXSTRES (652)	QQYYKT PXT (653)	TQSXX WN (654), TNXXX WN (655), TQSVA WN (632)	RTYYRSKW YNDYXXXS KS (659)	EDXDSY YRYXXD V (657), EDGDXY YRYGM DV (676), EEGESY YRYGM DV (680), EEXESY YRYXXD X (681)
23B3 VH3	RSSQSVX YSSNNK NYXX (658)	WXSTRES (652)	QQYYKT PXT (653)	TQSXX WN (654), TNXXX WN (655), TQSVA WN (632)	RTYYRSKW YNDYXXXS KX (660)	EDXDSY YRYXXD V (657), EDGDXY YRYGM DV (676), EEGESY YRYGM DV (680), EEXESY YRYXXD X (681)
3B3	RXSQSVR SSYXX (661)	XXSSRXT (662)	QQYXSSP T (663)	XYYW N (664)	EXQHXXQT NYNPSXKS (665), EXNHXXNT NYNPSXKS	XYCRST TCYFDY (667)

					(666), EIQHAGQT NYNPSLKS (677)	
5G4	RXSQSXR SSYXX (668)	XXSSRXT (662)	QQYXSSP T (663)	XYYW N (664)	EXNXSXXT NYNPSXKS (114), EIQHSGITN YNPSLKS (227), XQHSXXTN YNPSXKS (230)	XYCRST TCYFDY (667)
17E9	RXSQXXS NDX (646)	XXSSXQS (647)	XQHQS PPT (637), XQHNSY PPT (233)	SYXXH (639)	VMSYDXN NKLYADX VKG (691), VMSYEGN NKLYAESV KG (715), XXSYDXNN KXYXDSXK X (669), XXSYEXNN KXYXESXK X (711)	DETETX YYYYXX DX (671)
53D3	RSSQSXX YSNXYN YXD (759), RSSQSLL YSQGYN YLD (743), RSSQSXX YSQXYN YXD (765)	XXSSRXS (789)	XQPXQTP XT (940)	TYYXS (955)	SISSSSFIY YADXVKG (971), SISSSSFIY YAESVKG (972), SXSSSSFX YYXDSXKX (973), SXSSSSFX YYXESXKX (974), SXSSSSFX YYXDXXK X (975)	DRXXXP XTYYYY XXDX (976)

54E5	KSSQNXL YSSNNK NYXX (977)	WXSTRES (652)	QQYYSX PWT (978)	TYXXH (979)	VIWYDXSN KDYADXV KG (980), VIWYEGSN KDYAESVK G (981), XXWYDXS NKDYXDSX KX (982), XXWYDXS NKDYXDX VKG (983), XXWYEXS NKDYXESX KG (984)	EERDSY YHYXXD X (985)
56E1	KSSQSXX YSSNNK NYXX (986)	WXSTRES (652)	QQYYSX PWT (978)	SYXXH (639)	VIWYDXSN KDYADXV KG (980), VIWYEGSN KDYAESVK G (981), XXWYDXS NKDYXDSX KX (982), XXWYDXS NKDYXDX VKG (983), XXWYEXS NKDYXESX KG (984)	EERDSY YHYXXD X (985)
57A8	TXSSSNX XXXYNX H (987)	XNNNRPS (988)	QSYDXSL SGWV (989), QSYESSL SGWV (990), QSYDSSX SXWX (991), QSYDXS XSXWV (992), QSYESSX SXWV (993)	SYXXS (994)	VISGSGGST YYADXVK G (995), VISGSGGST YYAESVKG (996), XXSXSSXS TYYXDSXK X (997),XXSX SXXSTYYX DXXKX (998), XXSXSSXS TYYXESXK X (999)	XXTNYY YYYSXX DX (1000)
58G5	TXSSSNX XXXYDX H (1001)	XNXHRPS (1002), GQSHRPS (1003), XQSHRPS (1004)	QSYDXSL SGYV (1005),QS YESSLSG YV (1006),	NYXXS (1010)	XXSXRXXS TYYXDSXK X (1011)	DXYSSA WYFDY (1012), EGYSSA WYFDY (1013),

			QSYDSSX SXYX (1007), QSYDXX XSXYX (1008), QSYESSX SXYX (1009)			DXYSSX WYFDY (1014), EXYSSX WYFDY (1015)
60G11	TXSXSNX XXXYDX H (1016)	XNSHRPS (1002), GQSHRPS (1003), XQSHRPS (1004)	QSYDSSX SXYX (1007)	NYXXN (1017)	XXSXRXXS TYYXDSXK X (1011)	DXYSSA WFFDY (1018), EGYSSA WFFDY (1019), DXYSSX WFFDY (1020)
73C2	RXSQSFS SYXN (1021)	XXSSXQS (647)	[отсутствует]	SSSXT WN (1022)	RTYQRSKW NNDYXXSX KS (1023)	EXXXXP RWFDP (1024)
76A4	RXSQSXT SYXN (1025)	TXSSXQS (1026)	[отсутствует]	SNSXT WN (1027), SQSAT WN (1028) SQSXT WN (1029)	RTYYRSKX YNDYXXSX KS (1030)	EXXXXP RWFDP (1024)
77D12	SESNXDX XTNXXN (1031), SESQSDI GTNAVN (1032) SESQSDX XTNXXN (1033)	[отсутствует]	XTWDDN XNXPX (1034), ATWDDN LQGPL (1035) XTWDDN XQXPX (1036)	XFYXH (1037)	WINPDXGG TNYAQKFQ G (1038), WINPESGG TNYAQKFQ G (1039), WXNPDSX XTNYXQKF QX (1040), WXNPDX XTNYXQKF QX (1041), WXNPESXX TNYXQKFQ X (1042)	EXXXXX XTY (1043)
87H11	RXSQSXS SYXN (1044)	XXSSXQS (647)	[отсутствует]	XYYWS (1045)	EXNXSRT NYNPSXKS (1046), EIQHSGRT NYNPSLKS (1047)	DXGWH FSFDI (1049), ESGWHF SFDI (1050),

					EXQHSXRT NYNPSXKS (1048)	DSXWHF SFDX (1051), ESXWHF SFDX (1052)
88H9	RXSQXX RNDLX (1053)	XXSXXQ X (1054)	XQHNSY PTWT (1055), LQHQSYP TWT (1056) XQHQSY PTWT (1057)	SYXXH (639)	VIWFDXSN EYYADXV KG (1058), VIWFEGSN EYYADSVK G (1059), VIWFDGSN EYYAESVK G (1060), VIWFEGSN EYYAESVK G (1061), XWFDXSNE YYXDSXKX (1062)	ERWFEXE XXDY (1063)
89H9	RXSQSXS YYXN (1064)	XXSSXQS (647)	QQSYSSX T (1065)	SYXXS (994)	GISGGGGS TYYADXV KG (1066),GISG GGGSTYYA ESVKG (1067), XXSXXXXXS TYYXDSXK X (1068), XXSXXXXXS TYYXDXX KX (1069),XXS XXXXSTYY XESXKX (1070)	EXXXXXF DX (1071)
91D7	RXSQNXS SYXN (1072)	TXSSXQS (1073)	[отсутству ет]	XYYWS (1045)	EXNPXXRT NYKPSXKS (1074)	DNXWH YXFDX (1075), DQGWH YAFDI (1076), DQXWH YXFDX (1077)
91F10_LC 1	RSSQSXX YSDXNT YXN (1078), RSSQLV	KVSNWD X (1081),KV SNWES (1082),	XQXTHW P (1086)	XYYXH (1087)	WXNPXXX XTNYXQKF RX (1088), WINPQSGG TNYAQKFR	XXSWEX FDY (1091)

	YSDGQT YLN (1079), RSSQSXX YSDXQT YXN (1080)	KXSNWD S (1083), KXSNWD X (1084), KXSNWE S (1085)			G (1089), WXNPQSX XTNYXQKF RX (1090)	
91F10_LC 2	RXSQSXS SYXN (1044)	XXSRXQS (1092)	QQSDSTP XT (1093)	XYYXH (1087)	WXNPNXX XTNYXQKF RX (1088), WINPQSGG TNYAQKFR G (1089), WXNPQSX XTNYXQKF RX (1090)	XXSWEX FDY (1091)
91G8	RXSQSXS SYXN (1044)	XXSSXQS (647)	QQSFSTX T (1094)	SYXXS (994)	GISGSGSR YYADXVK G (1095), XXSXSSXS RYYXDSXX X (1096), XXSXSSXS RYYDXDXX KX (1097)	EXXXFX DX (1071)
92D3	RXSQSXS SYXN (1044)	XXSRXQS (1098)	QQSDXTP IT (1099), QQSDTTP XT (1100), QQSDXTP XT (1101)	XYYXH (1087)	WXXPNXX XTNYXQKF QX (1102), WIIPQSGGT NYAQKFQG (1103), WXXPQSX XTNYXQKF QX (1104)	XSSWEX FDY (1105)
92E5	RXSQSXS HYXN (1106)	XXSSXQS (647)	QQSFSSX T (1107)	SYXXS (994)	GISGRGGST YYADXVK G (1108), GISGRGGST YYAESVKG (1109). XXSXRXSS TYYXDSVK X (1110), XXSXRXSS TYYDXDXX KX (1111),XXS XRXSTYY XESVKX (1112)	EXXXFX DX (1071)

Кроме того, предпочтительными являются антигенсвязывающие белки, содержащие последовательности CDR зародышевой линии, соединенные с антителами, представленными в табл. А. Такие последовательности представлены в табл. С.

Последовательности антител против TL1A, родственных CDR зародышевой линии

<b>Обозначение антитела, родственного зародышевой линии</b>	<b>LCDR1 (SEQ ID NO)</b>	<b>LCDR2 (SEQ ID NO)</b>	<b>LCDR3 (SEQ ID NO)</b>	<b>HCDR1 (SEQ ID NO)</b>	<b>HCDR2 (SEQ ID NO)</b>	<b>HCDR3 (SEQ ID NO)</b>
3C6	RASQGIR NDLG (226)	AASSLQS (112)	LQHNSYP WT (228)	SYAMH (253)	VISYDGS NKYYAD SVKG (254)	TTVTY YYYYG MD (255)
2G11	RASQSISS YLN (229)	AASSLQS (112)	QQSYSTP WT (231)	SYYWS (256)	YIYYSGS TNYNPSL KS (172)	SYYYF D (258)
9C8	RASQSISS YLN (229)	AASSLQS (112)	QQSYSTP YT (234)	SYYWS (259)	YIYYSGS TNYNPSL KS (260)	LTGYFD (261)
23B3	KSSQSVL YSSNNK NYLA (235)	WASTRES (118)	QQYYSTP LT (237)	SNSAAW N (262)	RTYYRSK WYNDYA VSVKS (184)	RDGYN YYYYY YGMD (264)
23B3 VH4	RASQGIS NYLA (241)	AASTLQS (242)	QKYNSA PLT (243)	SGSYYW S (268)	YIYYSGS TNYNPSL KS (269)	RDGYN YYYYY YGMD (270)
23B3 VH3	RASQGIS NYLA (241)	AASTLQS (242)	QKYNSA PLT (243)	SNYMS (271)	IYSGGST YYADSV KG (272)	RDGYN YYYYY

						YGMD (273)
3B3	RASQSVS SSYLA (238)	GASSRAT (124)	QQYGSSP IT (240)	GYYSWS (265)	EINHSGS TNYNPSL KS (266)	GYCSST SCYTYF D (267)
5G4	RASQSVS SSYLA (238)	GASSRAT (124)	QQYGSSP IT (240)	GYYSWS (265)	EINHSGS TNYNPSL KS (266)	GYCSST SCYTYF DY (672)
17E9	RASQGIR NDLG (226)	AASSLQS (112)	LQHNSYP LT (674)	SYAMH (253)	VISYDGS NKYYAD SVKG (254)	GTTGT YYYYY GMDV (675)
53D3	RSSQSLL HSNGYN YLD (1113)	LGSNRAS (935)	MQALQT PLT (936)	SYSMN (950)	SISSSSY IYYADSV KG (951)	GIAAAG YYYYY GMDV (952)
54E5	KSSQSVL YSSNNK NYLA (235)	WASTRES (118)	QQYYSTP WT (938)	SYGMH (164)	VIWYDG SNKYA DSVKG (953)	EYSSSS YYYYY GMDV (954)
56E1	KSSQSVL YSSNNK NYLA (235)	WASTRES (118)	QQYYSTP WT (938)	SYGMH (164)	VIWYDG SNKYA DSVKG (953)	EYSSSS YYYYY GMDV (954)
57A8	TGSSSNI GAGYDV H (146)	GNSNRPS (148)	QSYDSSL SGWV (701)	SYAMS (836)	AISGSGG STYYADS VKG (956)	GTTGT YYYYY GMDV (675)
58G5	TGSSSNI GAGYDV H (146)	GNSNRPS (148)	QSYDSSL SGYV (707)	SYAMS (836)	AISGSGG STYYADS VKG (956)	RDGYN YYFDY (958)
60G11	TGSSSNI GAGYDV H (146)	GNSNRPS (148)	QSYDSSL SGYV (707)	SYAMS (836)	AISGSGG STYYADS VKG (956)	RDGYN YYFDY (958)
73C2	RASQSISS YLN (229)	AASSLQS (112)	QQSYSTP YT (234)	SNSAAW N (262)	RTYYRSK WYNDYA VSVKS (184)	GIAVAG NWFDP (961)
76A4	RASQSISS YLN (229)	AASSLQS (112)	QQSYSTP YT (234)	SNSAAW N (262)	RTYYRSK WYNDYA VSVKS (184)	GIAVAG NWFDP (961)

77D12	SGSSNI GSNTVN (947)	SNNQRPS (948)	AAWDDS LNGVV (949)	GYYMH (857)	WINPNSG GTNYAQ KFQG (963)	SIAARA EYFQH (964)
87H11	RASQSISS YLN (229)	AASSLQS (112)	QQSYSTP YT (234)	GYYWS (265)	EINHSGS TNYNPSL KS (266)	DYGDY DAFDI (966)
88H9	RASQGIR NDLG (226)	AASSLQS (112)	LQHNSYP WT (228)	SYGMH (164)	VIWYDG SNKYA DSVKG (953)	RWLQL YFDY (967)
89H9	RASQSISS YLN (229)	AASSLQS (112)	QQSYSTP IT (942)	SYAMS (836)	AISGSGG STYYADS VKG (956)	VEMATI DAFDI (968)
91D7	RASQSISS YLN (229)	AASSLQS (112)	QQSYSTP YT (234)	GYYWS (265)	EINHSGS TNYNPSL KS (266)	DYGDY DAFDI (966)
91F10_LC 1	RSSQSLV YSDGNT YLN (753)	KVSNRDS (943)	MQGTHW PLT (944)	GYYMH (857)	WINPNSG GTNYAQ KFQG (963)	GYSYG YYFDY (969)
91F10_LC 2	RASQSISS YLN (229)	AASSLQS (112)	QQSYSTP IT (942)	GYYMH (857)	WINPNSG GTNYAQ KFQG (963)	GYSYG YYFDY (969)
91G8	RASQSISS YLN (229)	AASSLQS (112)	QQSYSTP IT (942)	SYAMS (836)	AISGSGG STYYADS VKG (956)	SIAARD AFDI (970)
92D3	RASQSISS YLN (229)	AASSLQS (112)	QQSYSTP IT (942)	GYYMH (857)	WINPNSG GTNYAQ KFQG (963)	GYSYG YYFDY (969)
92E5	RASQSISS YLN (229)	AASSLQS (112)	QQSYSTP IT (942)	SYAMS (836)	AISGSGG STYYADS VKG (956)	SIAARD AFDI (970)
88H9	RASQGIR NDLG (226)	AASSLQS (112)	LQHNSYP WT (228)	SYGMH (164)	VIWYDG SNKYA DSVKG (953)	RWLQL YFDY (967)
54E5	KSSQSVL YSSNNK NYLA (235)	WASTRES (118)	QQYYSTP WT (938)	SYGMH (164)	VIWYDG SNKYA DSVKG (953)	EYSSSS YYYYY GMDV (954)
56E1	KSSQSVL YSSNNK NYLA (235)	WASTRES (118)	QQYYSTP WT (938)	SYGMH (164)	VIWYDG SNKYA DSVKG (953)	EYSSSS YYYYY GMDV (954)

53D3	RSSQSL HSNGYN YLD (1113)	LGSNRAS (935)	MQALQT PLT (936)	SYSMN (950)	SISSSSY IYYADSV KG (951)	GIAAAG YYYYY GMDV (952)
89H9	RASQSISS YLN (229)	AASSLQS (112)	QQSYSTP IT (942)	SYAMS (836)	AISGSGG STYYADS VKG (956)	VEMAT DAFDI (968)
91G8	RASQSISS YLN (229)	AASSLQS (112)	QQSYSTP IT (942)	SYAMS (836)	AISGSGG STYYADS VKG (956)	SIAARD AFDI (970)
92E5	RASQSISS YLN (229)	AASSLQS (112)	QQSYSTP IT (942)	SYAMS (836)	AISGSGG STYYADS VKG (956)	SIAARD AFDI (970)
92D3	RASQSISS YLN (229)	AASSLQS (112)	QQSYSTP IT (942)	GYMII (857)	WINPNSG GTNYAQ KFQG (963)	GYSYG YYFDY (969)
91F10_LC 2	RASQSISS YLN (229)	AASSLQS (112)	QQSYSTP IT (942)	GYMH (857)	WINPNSG GTNYAQ KFQG (963)	GYSYG YYFDY (969)
91D7	RASQSISS YLN (229)	AASSLQS (112)	QQSYSTP YT (234)	GYWS (265)	EINHSGS TNYNPSL KS (266)	DYGDY DAFDI (966)
76A4	RASQSISS YLN (229)	AASSLQS (112)	QQSYSTP YT (234)	SNSAAW N (262)	RTYYRSK WYNDYA VSVKS (184)	GIAVAG NWFDP (961)
87H11	RASQSISS YLN (229)	AASSLQS (112)	QQSYSTP YT (234)	GYWS (265)	EINHSGS TNYNPSL KS (266)	DYGDY DAFDI (966)
73C2	RASQSISS YLN (229)	AASSLQS (112)	QQSYSTP YT (234)	SNSAAW N (262)	RTYYRSK WYNDYA VSVKS (184)	GIAVAG NWFDP (961)
91F10_LC 1	RSSQSLV YSDGNT YLN (753)	KVSNRDS (943)	MQGTHW PLT (944)	GYMH (857)	WINPNSG GTNYAQ KFQG (963)	GYSYG YYFDY (969)
60G11	TGSSNI GAGYDV H (146)	GNSNRPS (148)	QSYDSSL SGYV (707)	SYAMS (836)	AISGSGG STYYADS VKG (956)	RDGYN YYFDY (958)
58G5	TGSSNI GAGYDV H (146)	GNSNRPS (148)	QSYDSSL SGYV (707)	SYAMS (836)	AISGSGG STYYADS VKG (956)	RDGYN YYFDY (958)
57A8	TGSSNI GAGYDV H (146)	GNSNRPS (148)	QSYDSSL SGWV (701)	SYAMS (836)	AISGSGG STYYADS VKG (956)	GTTGT YYYYY GMDV (675)
77D12	SGSSNI GSNTVN (947)	SNNQRPS (948)	AAWDDS LNGVV (142)	GYMH (857)	WINPNSG GTNYAQ KFQG (963)	SIAARA EYFQH (964)

Дополнительно предпочтительными являются антигенсвязывающие белки, содержащие последова-

тельности переменных доменов предпочтительных антител против TL1A, как представлено в табл. D. На всем протяжении "VH", как представлено в табл. D, относится к переменному домену тяжелой цепи, "VL" - легкой цепи. Молекулы в объеме данного изобретения могут содержать модификации последовательностей, представленных в табл. D, включая укорачивание или замены с целью стабильности или других функциональных возможностей или удаления горячих точек мутагенеза (химическая или физическая модификация аминокислот). В изобретение дополнительно включены молекулы, обладающие идентичностью последовательности по меньшей мере 90% с последовательностями, представленными в табл. D.

Таблица D

Последовательности переменного домена предпочтительных анти-TL1A антител

<b>Обозначение антитела</b>	<b>Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO)</b>
3C6 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSQDIRDDLGWYQQKPGKAPKRLI YDASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHNSYPPTF GQGTKVEIK (6)
3C6 VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLE WVAVISYDGNNKLYTDSVKGRFTISRDDSKSTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDPTVTLYYYYGMDVWGQGTTVTVSS (8)
2G11 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINNYLNWYQQKPGIAPKLLIY ATSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFSLTISLQPEDFATYFCQSYSTPRTFG QGTKVEIK (10)

2G11 VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYFWSWIRQPPGKGLEWIG YIYYSGSTNYNPSLKSRTMSIDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR EIGSYYGFDYWGQALVTVSS (12)
9C8 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINNYLNWYQQRPGKAPKLLI YAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPGDFATYYCQSYSTPRT FGQGTKLEIK (14)
9C8 VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYFWSWIRQPPGKGLEWIG YIYYSGNTKYNPSLKSRTVISIDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARE TGSYYGFDYWGQGLVTVSS (16)
23B3 VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLVWYQQKPG QPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ QYYKTPLTFGGGTKVEIK (18)
23B3 VH	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCVISGDSVSTNSVAWNWIRQSPSRGLE WLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTA VYYCAREDGDSYYRYGMDVWGQGTTVTVSS (20)
3B3 VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVRSSLAWYQQKPGQAPRLLI YGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYGSSTP GGTRLEIK (22)
3B3 VH	QVQLQQWGAGLLKPSSETLSLTCAVHGGFSFGYYWNWIRQPPGKGLE WIGEINHAGNTNYNPSLKSRTISLDTSKNQFSLTLTSVTAADTAVYY CARGYCRSTTCYFDYWGQGLVTVSS (24)
23B3 VH4 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSVLYSSNNKNYLVWYQQKPG KVPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQ YYKTPLTFGGGTKVEIK (26)
23B3 VH4 VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTISGDSVSTNSVAWNWIRQPPGKGLE WIGRTYYRSKWYNDYAVSLKSRTISPDTSKNQFSLKLSSVTAADTA VYYCAREDGDSYYRYGMDVWGQGTTVTVSS (28)
23B3 VH3 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSVLYSSNNKNYLVWYQQKPG KVPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ YYKTPLTFGGGTKVEIK (30)
23B3 VH3 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAISGDSVSTNSVAWNWIRQAPGKGL EWVSRTYYSKRWYNDYAVSVKGRFTISPDTSKNTFYLMNSLRAED TAVYYCAREDGDSYYRYGMDVWGQGTTVTVSS (32)

5G4 VL	EIVLTQSPGTLSPGERVTLSRASQSVRSSLAWYQQRAGQAPRLLI YGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPTF GQGTRLEIK (491)
5G4 VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCDVYGGFSGYYWNWIRQPPGKGLE WIGEINHSGITNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARGYCRSTTCYFDYWGQGLTVTVSS (495)
17E9 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNDLAWYQQKPKGKAPRLI FAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHNSYPPTF GGGTKVEIK (493)
17E9 VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSSYGMHWVRQAPGKGLE WVAVMSYDGNKLYADSVKGRFTISRDNKSKTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARDDETLYYYYGIDVWGQGTTVTVSS (497)
53D3 VL	DIVMTQSPSLPVTPEASISCRSSQSLLYSNGYNYLDWYLQKPGQSP QLLIYLGSSRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQPL QTPLTFGGGTKVEIK (866)
53D3 VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASEFTFSTYYMSWVRQAPGKGLE WVSSISSSSFIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARDRIAAPGTYYYYGMDVWGQGTTVTVSS (868)
54E5 VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQNILYSSNNKNYLAWYQQKPG QPPSLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTLSSLQAEDVAVYFCQ QYYSIPWTFGQGTKVEIK (870)
54E5 VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLE WVAVIWIYDGSNKDYADSVKGRFTVSRDNRDLYLQMNSLRAEDT AVYYCAREERDSYYHYGMDVWGQGTTVTVSS (872)
56E1 VL	DIVMTQSPDSLTVSLGEGATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPG QPPSLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTLSSLQAEDVAVYYCQQ YYSIPWTFGQGTKVEIK (874)
56E1 VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFSSYGMHWVRQAPGKGLE WVAVIWIYDGSNKDYADSVKGRFTVSRDNRDLYLQMNSLRAEDT AVYYCAREERDSYYHYGMDVWGQGTTVTVSS (876)
57A8VL	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQLPGTAPKL LIYGNNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQTEDEADYYCQSYDSS LSGWVFGGGTKLTVL (878)

57A8VH	EIQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFSSYVMSWVRQAPGKGLEW VSVISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSTTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAKGGTNYYYYYSGMDVWGQTTVTVSS (880)
58G5VL	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKL LIYGNSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSL SGYVFGTGTKVTVL (882)
58G5VH	EVQLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLQ WVSVISGRGGSTYYADSVKGRFTISRDNSTLTYLQMNSLRAEDTAV YYCAKDGYSYSAWYFDYWGQGLTVTVSS (884)
60G11VL	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSGSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKL LIYGNSHRPSGIPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSL SGYVFGTGTKVTVL (886)
60G11VH	EVQLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMNWRQAPGKGLE WVSVISGRGGSTYYADSVKGRFTISRDNSTLTYLQMNSLRAEDTAIY YCAKDGYSYSAWFFDYWGQGLTITVSS (888)
73C2VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSFSSYLNWYQQKPGKAPELLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFASYFCQQSYSTPRSF GQTKLEIK (890)
73C2VH	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSSATWNWIRQSPSRGLE WLGRTYQRSKWNNDYAVSVKSRITINPDTSRNQFSLQLNSVTPEDTA VYYCAREVVAGPRWFDWPWGQGLTVTVSS (892)
76A4VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVTSYLNWYQQKPGKAPKLLI YTASSLQSGIPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQSYSTPRSF GQTKLEIK (894)
76A4VH	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSATWNWIRQSPSRGLE WLGRTYYRSKLYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAV YYCAREVVAGPRWFDWPWGQGLTVTVSS (896)
77D12VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSSENSDIGTNAVNWYQQFPGTAPKFLI YSNNKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDNL NGPLFGGGTKLTVL (898)
77D12VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVRVSKASGYTFTGFYMHVWRQAPGQGL EWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDT AVYYCAREGIAVALTYWGQGLTVTVSS (900)

87H11VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIY VASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSNPQEC SFGQGTKLEIK (902)
87H11VH	QEQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGFSFGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEINHSGRTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYY CARDSGWHFSFDIWDQGMVTVSS (904)
88H9VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQEKPGKAPKRLI YAASGLQGGDPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPT WTFGQGTKVEIK (906)
88H9VH	QVQLVESGAGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGMGLE WVAVIWFDGSNEYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARERWFGELLDYWGQGLVTVSS (908)
89H9VL	DIQMIQSPSSLSASVGDSVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKFLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSSITFGQ GTRLEIK (910)
89H9VH	EVHLES GGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE WVSGISGGGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAENTAV YYCAIEMAGAFDIWGQGMVTVSS (912)
91D7VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQNISSYLNWYQQRPGKAPNLLL FTASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCQQSYSNPPE SFGQGTKLEIK (914)
91D7VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGFSFGYYWSWIRQPPGKGLE WGEINPVGRNTYKPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTALYY CARDNGWHYAFDIWGQGMVTVSS (916)
91F10_LC1 VL	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFQQRGRS PRRLIYKVSNWDSGVPDRFSGSGSGTDSTLIISRVEAEDVGVYYMVG THWPLGGGTKVEIK (918)
91F10_LC1 VH	QGQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYTFTAYMHWVRQAPGQGL EWMGWINPNSGGTNYAQKFRGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDT AVYYCATGGSWEGFDYWGQGLVTVSS (920)
91F10_LC2 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKFLIY AASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSDSTPITFG QGTRLEIK (922)

91F10_LC2 VH	QGQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYTFTAYYMHVWRQAPGQGL EWMGWINPNSGGTNYAQKFRGRVTMTRDTSISTAYMELSLRSDDT AVYYCATGGSWEGFDYWGQGLVTVSS (920)
91G8VL	DIQMIQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKFLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSFSTITFGQ GTRLEIK (924)
91G8VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE WVSGISGSGGSRYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAIEVAGAFDIWGQGMVTVSS (926)
92D3VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGTAPKFLIY GASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSDTTPITFG QGTRLEIK (928)
92D3VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVQVSKASGYTFTGYMHVWRQAPGQGLE WLGWIIIPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSLRSDDTAV YYCATGSSWEGFDYWGQGLVTVSS (930)
92E5VL	DIQMIQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKFLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSFSSITFGQ GTRLEIK (932)
92E5VH	EVHLLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQVPGKGLE WVSGISGRGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMDSLRAEDTAV YNCAIEVAGAFDIWGQGMVTVSS (934)

Каждый из вышеперечисленных полипептидов кодируется нуклеиновой кислотой, имеющей нуклеотидную последовательность, непосредственно предшествующую полипептидной последовательности в перечне последовательностей. Предпочтительными являются последовательности из антител 9С8 и 3В3. Полноразмерные последовательности антител против TL1A, представленные в табл. Е, являются предпочтительными для антител против TL1A. LC относится к легкой цепи антитела, HC - к тяжелой цепи. В изобретение дополнительно включены молекулы, обладающие идентичностью последовательности по меньшей мере 90% с одной или обеими последовательностями легкой цепи и тяжелой цепи из табл. Е.

## Предпочтительные анти-TL1A-антитела

Обозначение антитела	Легкая цепь SEQ ID NO	Тяжелая цепь SEQ ID NO	iPS (обозначение молекулы)
3C6	50	52	284112
2G11	54	56	285396
9C8	58	60	285412
23B3	62	64	290043
3B3	66	68	308844
23B3 HC4	70	72	325246
23B3 HC3	74	76	325336
5G4	455	457	284510
17E9	459	461	284078
88H9	1116	1118	427485
54E5	1120	1122	427576
60G11	1124	1126	427493
53D3	1128	1130	427504
89H9	1132	1134	427509
91D7	1136	1138	427514
57A8	1140	1142	427519
91G8	1144	1146	427524
76A4	1148	1150	427529
87H11	1152	1154	427534
58G5	1156	1158	427539
57A8	1160	1162	427519
73C2	1164	1166	427544
77D12	1168	1170	427549
56E1	1172	1174	427554
92E5	1176	1178	427559
92D3	1180	1182	427564
91F10_LC1	1184	1186	427580
91F10_LC2	1188	1190	427572

Каждая из аминокислотных последовательностей в табл. Е кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, непосредственно предшествующей ей в перечне последовательностей. Предпочтительными являются последовательности из антител 9C8 и 3B3.

Вышеперечисленные последовательности антител против TL1A можно применять в биспецифических антигенсвязывающих белках любого из описанных в данном документе форматов. Предпочтительно такие последовательности применяют в антигенсвязывающих белках гетеро IgG и биспецифических антигенсвязывающих белках IgG-scFv, как описано в данном документе.

Гетеро IgG биспецифические антигенсвязывающие белки.

Изобретение дополнительно относится к биспецифическим антигенсвязывающим белкам гетеро Ig, как изображено на фиг. 1, которые содержат единицы, специфически связывающиеся с TL1A. Структурно, биспецифические антигенсвязывающие белки гетеро Ig содержат:

(а) вариабельный домен легкой цепи единицы, связывающейся с TL1A, содержащийся в легкой цепи, отдельно от вариабельного домена тяжелой цепи единицы, связывающейся с TL1A, вариабельного домена тяжелой цепи, направленно действующей на другой антиген (например, TNF- $\alpha$ ), и вариабельного домена легкой цепи связывающейся единицы, направленно действующей на другой антиген;

(b) вариабельный домен тяжелой цепи единицы, связывающейся с TL1A, содержащийся в тяжелой цепи отдельно от вариабельного домена легкой цепи единицы, связывающейся с TL1A, вариабельного

домена тяжелой цепи, направленно действующей на другой антиген, и варибельного домена легкой цепи, направленно действующей на другой антиген;

(с) варибельный домен тяжелой цепи, направленно действующей на другой антиген, содержащийся в тяжелой цепи отдельно от домена легкой цепи, направленно действующей на указанный другой антиген, варибельного домена тяжелой цепи единицы, связывающейся с TL1A, и варибельного домена легкой цепи единицы, связывающейся с TL1A;

(d) тяжелую цепь, содержащую варибельный домен тяжелой цепи единицы, связывающейся с TL1A, ковалентно соединенную с легкой цепью, содержащую варибельный домен легкой цепи единицы, связывающейся с TL1A;

(е) тяжелую цепь, содержащую варибельный домен тяжелой цепи, направленно действующей на указанный другой антиген, ковалентно соединенную с легкой цепью, содержащей варибельный домен легкой цепи, направленно действующей на другой антиген; и

(f) тяжелую цепь, содержащую варибельный домен тяжелой цепи единицы, связывающейся с TL1A, ковалентно соединенную с тяжелой цепью, содержащей варибельный домен тяжелой цепи, направленно действующей на другой антиген.

Для таких биспецифических антител гетеро Ig, специфически связывающиеся с TL1A единицы предпочтительно содержат один или большее количество CDR, перечисленных в табл. А. Можно применять домены варибельных участков из табл. D, но предпочтительно, чтобы связывающаяся с TL1A единица содержала заряженные аминокислоты, которые способствуют правильной сборке биспецифического антигенсвязывающего белка гетеро Ig (см. фиг. 1). Последовательности варибельного участка, предпочтительные для биспецифических антител гетеро Ig, представлены в табл. F. Как и прежде, VL в табл. F относится к варибельному участку легкой цепи, VH к варибельному участку тяжелой цепи. SEQ ID NO из перечня последовательностей приведен после каждой последовательности в табл. F.

Таблица F

TL1A-специфические варибельные участки гетеро Ig

Обозначение антитела	Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO)
3B3 вариант VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVRSSLAWYQQKPGQAPRLLI YGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPTF GQGTRLEIK (288)
3B3 вариант VH	QVQLQQWGAGLLKPSSETLSLTC AVHGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLE WIGEINHAGITNYPNPSLKS RV TISLDTSKNQFSLKLT SVTAADTAVYYC ARGYCRSTTCYFDYWGQGTLVTVSS (290)
2G11 вариант VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINNYLNWYQQKPGKAPKLLI YATSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFSLTISLQPEDFATYFCQQSYSTPRTF GQGTKVEIK (292)
2G11 вариант VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLCTVSGGSISSYFWSWIRQPPGKGLEWIG YIYYSGSTNYPNPSLKS RV TMSIDTSKNQFSLKLT SVTAADTAVYYCAR EIGSYYGFDYWGQGTLVTVSS (294)
23B3 VH4 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSVLYSSNNKNYLVWYQQKPG KVPKLLIYWASTRESGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQQ YYKTPLTFGGGTKVEIK (296)

23B3 VH4 VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTISGDSVSTNSVAWNWIRQPPGKGLE WIGRTYYRSKWYNDYAVSLKSRVTISPDTSKNQFSLKLSVTAADTA VYYCAREDGDSYYRYGMDVWGQGTTVTVSS (298)
23B3 VH3 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSVLYSSNNKNYLVWYQQKPG KVPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YYKTPLTFGGGTKVEIK (300)
23B3 VH3 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAISGDSVSTNSVAWNWIRQAPGKGL EWVSRTYYSKWKYNDYAVSVKGRFTISPDTSKNTFYLQMNSLRAED TAVYYCAREDGDSYYRYGMDVWGQGTTVTVSS (302)
3C6 вариант VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSQDIRDDLGWYQQKPGKAPKLLI YDASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPPTF GQGTKVEIK (304)
3C6 вариант VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLE WVAVISYDGNNKLYTDSVKGRFTISRDDSKSTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDPTVTLYYYYGMDVWGQGTTVTVSS (306)
3C6 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSQDIRDDLGWYQQKPGKAPKRLI YDASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPPTF GQGTKVEIK (308)
3C6 VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLE WVAVISYDGNNKLYTDSVKGRFTISRDDSKSTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDPTVTLYYYYGMDVWGQGTTVTVSS (310)

Каждый из полипептидов в табл. F кодируется нуклеиновой кислотой, имеющей последовательность, непосредственно предшествующую полипептидной последовательности в Перечне последовательностей.

В объем данного изобретения входят молекулы гетеро IgG с TNF-специфической связывающей единицей, предпочтительно вместе с TL1A-специфической связывающей единицей. TNF-специфическая связывающая единица предпочтительно содержит одну или большее количество последовательностей CDR или переменных доменов антител 3.2 (описанных ниже), 234 (описанных ниже), сертолизумаба, адалимумаба, инфликсимаба, голимумаба и антител, раскрытых в патенте США № 7285269, который включен в данный документ посредством ссылки. По всему тексту данного документа "сертолизумаб" относится к антителу, содержащему последовательности переменных участков, полученные из сертолизумаба пэгола. Предпочтительные последовательности, основанные на таких CDR, представлены в табл. G.

Таблица G

Предпочтительные последовательности CDR из антител против TNF- $\alpha$ 

Обозначение антитела	LCDR1 (SEQ ID NO)	LCDR2 (SEQ ID NO)	LCDR3 (SEQ ID NO)	HCDR1 (SEQ ID NO)	HCDR2 (SEQ ID NO)	HCDR3 (SEQ ID NO)
адалimumаб	RASQGIR NYLA (92)	AASTLQ S (242)	QRYNRA PYT (96)	DYAMH (158)	AITWNSG HIDYADS VEG (160)	VSYLST ASSLD Y (162)
сертолизумаб	KASQNV GTNVA (152)	SASFLY S (154)	QQYNIYP LT (156)	DYGMN (218)	WINTYIG EPIYADS VKG (220)	GYRSY AMDY (222)
C234	RASQDIR NDLG (140)	AASSLQ S(112)	LQHNSYP LT (144)	SYDMH (206)	VISYDGS KYYADS VKG (208)	EVRSG SYYYY YSMDV (210)
3.2	TGSSNI GAGYDV H (146)	GNSNRP S (148)	QSYDSSL SGSV (150)	SYWIG (212)	IYLGDS DTRYSPS FQG (214)	SNWGL DY (216)

Каждый из полипептидов в табл. G кодируется нуклеиновой кислотой, имеющей последовательность, непосредственно предшествующую последовательности полипептида в Перечне последовательностей. Последовательности из табл. G можно применять в любом формате биспецифических антигенсвязывающих белков, предпочтительно в формате гетеро Ig или IgG-scFv и предпочтительно вместе с антигенсвязывающей единицей против TL1A.

Связывающиеся с TNF единицы биспецифических антигенсвязывающих белков более предпочтительно содержат последовательности варибельного участка выбранных антител против TNF. Последовательности таких варибельных участков приведены в табл. H. Как и прежде, VL относится к варибельному участку легкой цепи, а VH относится к варибельному участку тяжелой цепи. Кроме того, изобретение включает молекулы, последовательности которых по меньшей мере на около 90% идентичны любой из последовательностей, представленных в табл. H.

Последовательности переменных доменов предпочтительных антител против TNF- $\alpha$ 

<b>Обозначение исходного антитела</b>	<b>Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO)</b>
адалимумаб VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLL IYAASLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAP YTFGQGGTKVEIK (2)
адалимумаб VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGL EWVSAITWNSGHIDYADSVGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGTLVTVSS (4)
сертолизум аб VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVAWYQQKPGKAPKA LIYSASFLYSGVPYRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNIYP LTFGQGGTKVEIK (42)
сертолизум аб VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYVFTDYGMNWVRQAPGKGL EWMGWINTYIGEPYADSVKGRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDT AVYYCARGYRSYAMDYWGQGTLVTVSS (44)
сертолизум аб вариант VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVAWYQQKPGKAPKA LIYSASFLYSGVPYRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNIYP LTFGQGGTKVEIK (42)
сертолизум аб вариант VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYVFTDYGMNWVRQAPGKGL EWMGWINTYIGEPYADSVKGRFTISLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARGYRSYAMDYWGQGTLVTVSS (318)
3.2 VL	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQFPGTAPK LLIQGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYD SSLSGSVFGGGTKLTVL (38)
3.2 VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLTKISCKTSEYSFTSYWIGWVRQMPGKGLE WMGIIYLGSDTRYSPSFQGGVTTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAM YYCARSNWGLDYWGQGTLVTVSS (40)
C234 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNDLGWYQQKPGKAPKRL IYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGPEFTLTISSLQPEDFATYYCQLHNSYPL TFGGGTKVEIK (34)
C234 VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGL EWWAVISYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQVNSLRAEDTA VYYCAREVRSYSSYYYSMDVWGQGTITVTVSS (36)

Каждый из вышеуказанных полипептидов кодируется нуклеиновой кислотой, имеющей нуклеотидную последовательность, непосредственно предшествующую последовательности полипептида в перечне последовательностей.

Предпочтительные анти-TL1A/анти-TNF биспецифические антитела гетеро IgG представлены в табл. I. Обозначение молекулы гетеро Ig основано на вышеуказанных обозначениях исходных антител,

применяемых для конструирования молекулы гетеро Ig. В молекуле, обозначенной как вариант "сертолизумаб/3B3", например, используются полипептиды с последовательностями из антител, обозначенных в данном документе как сертолизумаб и вариант 3B3. Как и прежде, VL относится к варибельному участку легкой цепи, VH - к варибельному участку тяжелой цепи. Такие молекулы могут включать в себя "С-зажим", введенные путем замены молекулы цистеина в последовательностях для обеспечения дополнительной дисульфидной связи с целью стабилизации. Такие цистеиновые замены предпочтительно вводят на границе VL-VH, в положениях 44 в VH и 100 в VL в схеме нумерации по Кабату. Дополнительные замены могут быть осуществлены в целях стабильности или для введения других функциональных групп. Варианты реализации изобретения включают в себя молекулы, идентичные по меньшей мере на 90% любой из последовательностей, представленных в табл. I.

Таблица I

Последовательности варибельных участков молекул анти-TL1A/анти-TNF- $\alpha$  гетеро IgG

Обозначение молекулы гетеро Ig	Анти-TNF- $\alpha$ связывающая единица		Анти-TL1A связывающая единица	
	VL	VH	VL	VH
	SEQ ID NO	SEQ ID NO	SEQ ID NO	SEQ ID NO
Сертолизумаб/ вариант 3B3	42	286	288	290
Сертолизумаб/ вариант 2G11	42	44	292	294
Сертолизумаб/ 23B3 VH4	42	44	296	298

## 048161

Сертолизумаб/ 23В3 VH3	42	44	300	302
Сертолизумаб/ вариант 3С6	42	44	304	306
Сертолизумаб/ 3С6	42	44	308	310
3.2/ вариант 3В3	312	314	288	290
3.2/ вариант 2G11	312	314	292	294
3.2/ 23В3 VH4	312	314	296	298
3.2/ 23В3 VH3	312	314	300	302
3.2/ вариант 3С6	312	314	304	306
3.2/ 3С6	312	314	308	310
Вариант сертолизумаба/ вариант 3В3	42	318	288	290
Вариант сертолизумаба/ вариант 2G11	42	318	292	294
Вариант сертолизумаба/ 23В3 VH4	42	318	296	298
Вариант сертолизумаба/ вариант 3С6	42	318	304	306
Вариант сертолизумаба/ 3С6	42	318	308	310
C234/	320	322	288	290

вариант 3B3				
C234/ вариант 2G11	320	322	292	294
C234/ 23B3 VH4	320	322	31	298
C234/ 23B3 VH3	320	322	300	302
C234/ вариант 3C6	320	322	304	306
C234/ 3C6	320	322	308	310

Каждый из вышеперечисленных полипептидов кодируется нуклеиновой кислотой, имеющей нуклеотидную последовательность непосредственно предшествующую аминокислотной последовательности полипептида в перечне последовательностей.

В табл. J перечислены последовательности полноразмерной легкой цепи и тяжелой цепи предпочтительных гетеро Ig биспецифических антигенсвязывающих белков в соответствии с данным изобретением. Перечисленные последовательности являются предпочтительными для всех молекул гетеро Ig, независимо от того, находятся ли они в перечисленных комбинациях. Перечисленные комбинации являются еще более предпочтительными. "Var" в обозначении молекулы относится к варианту. Такие молекулы могут включать в себя зарядные варианты для облегчения сборки, как описано, например, в WO 2009/089004, опубликованной 16 июля 2009 года, которая включена в данный документ посредством ссылки.

Полноразмерные последовательности молекул анти-TL1A/анти-TNF- $\alpha$  гетеро IgG

Обозначение молекулы гетеро Ig	Анти-TNF- $\alpha$		Анти-TL1A		Обозначение молекулы (iPS №)
	связывающая единица		связывающая единица		
	Легкая цепь SEQ ID NO	Тяжелая цепь SEQ ID NO	Легкая цепь SEQ ID NO	Тяжелая цепь SEQ ID NO	
сертолизумаб/ вар 3B3	132	136	134	130	340593
сертолизумаб/ вар 2G11	132	136	239	138	340595
сертолизумаб/ 23B3 VH4	132	136	253	323	340596
сертолизумаб/ 23B3 VH3	132	136	327	325	340597
сертолизумаб/ вар 3C6	132	136	331	329	340598
сертолизумаб/ 3C6	132	136	335	329	340599
3.2/ вар 3B3	337	339	134	130	340601
3.2/ вар 2G11	337	339	239	138	340602
3.2/ 23B3 VH4	337	339	323	253	340603
3.2/ 23B3 VH3	337	339	327	325	340604
3.2/ вар 3C6	337	339	331	329	340605
3.2/ 3C6	337	339	335	329	340606
вар сертолизумаба / вар 3B3	132	316	134	130	340607
вар сертолизумаба / вар 2G11	132	316	239	138	340608
вар сертолизумаба / 23B3 VH4	132	316	323	253	340609

вар сертолизамаба / вар 3С6	132	316	335	329	340611
вар сертолизамаба / 3С6	132	316	331	329	340610
вар сертолизамаба / вар 3В3	333	316	134	130	340612
вар сертолизамаба / вар 2G11	333	316	239	138	340613
вар сертолизамаба / 23В3 VН4	333	316	323	253	340614
вар сертолизамаба / вар 3С6	333	316	331	329	340615
вар сертолизамаба / 3С6	333	316	335	329	340616
вар сертолизамаба / вар 3В3	333	463	134	130	340617
вар сертолизамаба / вар 2G11	333	463	239	138	340618
вар сертолизамаба / 23В3 VН4	333	463	323	253	340619
вар сертолизамаба / вар 3С6	333	463	331	329	340620

вар сертолизумаб / 3С6	333	463	335	329	340621
С234/ вар 3В3	341	343	134	130	349421
С234/ вар 2G11	341	343	239	138	349425
С234/ 23В3 VН4	341	343	323	253	349428
С234/ 23В3 VН3	341	343	327	325	349431
С234/ вар 3С6	341	343	331	329	349433
С234/ 3С6	341	343	335	329	349435
сертолизумаб/ вар 3В3	510	514	512	555	349437
сертолизумаб/ вар 2G11	510	514	541	558	349439
сертолизумаб/ 23В3 VН4	510	514	539	562	349441
сертолизумаб/ 23В3 VН3	510	514	543	565	349443
сертолизумаб/ вар 3С6	510	514	543	568	349445
сертолизумаб/ 3С6	510	514	544	568	349448
3.2/ вар 3В3	542	571	512	555	349451
3.2/ вар 2G11	542	571	541	558	349453
3.2/ 23В3 VН4	542	571	539	562	349455
3.2/	542	571	543	565	349456

## 048161

23B3 VH3					
3.2/ вар 3C6	542	571	543	568	349457
3.2/ 3C6	542	571	544	568	349458
вар сертолизумаба / вар 3B3	510	573	512	555	349460
вар сертолизумаба / вар 2G11	510	573	541	558	349461
вар сертолизумаба / 23B3 VH4	510	573	539	562	349463
вар сертолизумаба / вар 3C6	510	573	543	568	349465
вар сертолизумаба / 3C6	510	573	544	568	349467
вар сертолизумаба / вар 3B3	540	573	512	555	349468
вар сертолизумаба / вар 2G11	540	573	541	558	349470
вар сертолизумаба / 23B3 VH4	540	573	539	562	349471
вар сертолизумаба / вар 3C6	540	573	543	568	349473
вар сертолизумаба /	540	573	544	568	349474

## 048161

3C6					
вар сертолизумаба / вар 3B3	540	487	512	555	349476
вар сертолизумаба / вар 2G11	540	487	541	558	349479
вар сертолизумаба / 23B3 VH4	540	487	539	562	349480
вар сертолизумаба / вар 3C6	540	487	543	568	349482
вар сертолизумаба / 3C6	540	487	544	568	349484
C234/ вар 3B3	518	522	512	555	349485
C234/ вар 2G11	518	522	541	558	349486
C234/ 23B3 VH4	518	522	539	562	349487
C234/ 23B3 VH3	518	522	543	565	349488
C234/ вар 3C6	518	522	543	568	349489
C234/ 3C6	518	522	544	568	349490
сертолизумаб/ вар 3B3	545	578	546	579	349491
сертолизумаб/ вар 2G11	545	578	548	582	349492
сертолизумаб/ 23B3 VH4	545	578	549	585	349493

## 048161

сертолизумаб/ 23В3 VH3	545	578	550	588	349495
сертолизумаб/ вар 3С6	545	578	551	591	349496
сертолизумаб/ 3С6	545	578	552	591	349498
С234/ вар 3В3	547	595	546	579	349499
С234/ вар 2G11	547	595	548	582	349501
С234/ 23В3 VH4	547	595	549	585	349502
С234/ 23В3 VH3	547	595	550	588	349503
С234/ вар 3С6	547	595	551	591	349504
С234/ 3С6	547	595	552	591	349505
сертолизумаб/ вар 3В3	132	599	134	598	349506
сертолизумаб/ вар 2G11	132	599	239	601	349507
сертолизумаб/ 23В3 VH4	132	599	323	603	349508
сертолизумаб/ 23В3 VH3	132	599	327	605	349509
сертолизумаб/ вар 3С6	132	599	331	607	349510
сертолизумаб/ 3С6	132	599	335	607	349511
3.2/ вар 3В3	337	609	134	598	349512
3.2/ вар 2G11	337	609	239	601	349513

3.2/ 23В3 VН4	337	609	323	603	349514
3.2/ 23В3 VН3	337	609	327	605	349515
3.2/ 3С6 вариант	337	609	331	607	349516
3.2/ 3С6	337	609	335	607	349517
вар сертолизумаба / вар 3В3	132	611	134	598	349518
вар сертолизумаба / вар 2G11	132	611	239	601	349519
вар сертолизумаба / 23В3 VН4	132	611	323	603	349520
вар сертолизумаба / вар 3С6	132	611	331	607	349521
вар сертолизумаба / 3С6	132	611	335	607	349522
вар сертолизумаба / вар 3В3	333	611	134	598	349523
вар сертолизумаба / вар 2G11	333	611	239	601	349524
вар сертолизумаба / 23В3 VН4	333	611	323	603	349525
вар сертолизумаба /	333	611	331	607	349526

вар 3С6					
вар сертолизумаба / 3С6	333	611	335	607	349527
вар сертолизумаба / вар 3В3	333	613	134	598	349528
вар сертолизумаба / вар 2G11	333	613	239	601	349529
вар сертолизумаба / 23В3 VН4	333	613	323	603	349530
вар сертолизумаба / вар 3С6	333	613	335	607	349531
вар сертолизумаба / 3С6	341	615	134	598	349532
С234/ вар 2G11	341	615	239	601	349533
С234/ 23В3 VН4	341	615	323	603	349534
С234/ 23В3 VН3	341	615	327	605	349535
С234/ вар 3С6	341	615	331	607	349536
С234/ 3С6	341	615	335	607	349537
вар сертолизумаба / вар 3С6	333	613	331	607	349539
вар сертолизумаба /	132	463	239	138	361830

## 048161

вар 2G11					
вар сертолизамаба / вар 3C6	132	463	331	329	361831
вар сертолизамаба / 3C6	132	463	335	320	361832
вар сертолизамаба / вар 3B3	510	487	512	555	361833
вар сертолизамаба / вар 2G11	510	487	541	558	361834
вар сертолизамаба / 23B3 VH4	510	487	539	562	361835
вар сертолизамаба / вар 3C6	510	487	543	568	361836
вар сертолизамаба / 3C6	510	487	544	568	361837
вар сертолизамаба / вар 3B3	132	613	134	598	361838
вар сертолизамаба / 23B3 VH4	132	613	323	603	361839
вар сертолизамаба / вар 3C6	132	613	331	607	361840
вар сертолизамаба / 3C6	132	613	335	607	361841

## 048161

вар сертолизумаба / вар 3B3	132	463	134	130	361842
вар сертолизумаба / вар 3B3	540	616	512	508	381084
вар сертолизумаба / вар 3B3	540	620	512	508	381089
вар сертолизумаба / вар 2G11	540	616	541	558	381094
вар сертолизумаба / вар 2G11	540	620	541	558	381096
вар сертолизумаба / 23B3 VH4	540	616	539	562	381098
вар сертолизумаба / 23B3 VH4	540	620	539	562	381100
C234 вар/ вар 3B3	538	623	512	502	381102
C234 вар/ вар 3B3	537	626	512	508	381109
вар сертолизумаба / вар 3B3	546	514	194	535	381208
вар сертолизумаба / вар 3B3	536	616	194	535	381216
сертолизумаб/ вар 3B3	536	620	194	535	381220

вар сертолизумаба / вар 3В3	546	487	194	535	381222
сертолизумаб/ вар 3В3	471	136	473	198	381292
вар сертолизумаба / вар 3В3	479	477	473	198	381300
сертолизумаб/ вар 3В3	176	136	520	198	381306
вар сертолизумаба / вар 3В3	475	477	520	198	381312
вар сертолизумаба / вар 3В3	471	463	473	198	381316
вар сертолизумаба / вар 3В3	176	463	570	198	381318
вар сертолизумаба / вар 3В3	471	465	473	198	381320
вар сертолизумаба / вар 3В3	176	465	520	198	381325
сертолизумаб/ вариант 3В3	510	514	512	508	376541
С234/ вариант 3В3	518	522	512	508	376542
сертолизумаб/ вариант 3В3	510	516	512	508	376543

Каждый из вышеперечисленных полипептидов кодируется нуклеиновой кислотой, имеющей нуклеотидную последовательность, непосредственно предшествующую аминокислотной последовательности полипептида в Перечне последовательностей, за исключением случаев, указанных в табл. J-1.

Таблица J-1

Нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды из табл. J

<b>Полипептид SEQ ID NO:</b>	<b>Кодирующая нуклеиновая кислота SEQ ID NO:</b>
176	526
194	627
198	529
239	236
253	250
320	332
323	257
333	464
465	528
471	531
473	530
475	534
477	532
479	533
487	515
508	618
520	527
535	629
536	630
537	625
538	622
539	559
540	560
541	556
542	570
543	563
544	569
545	576
546	574, 628
547	593

548	580
549	583
550	587
551	590
552	592
570	527
571	553
579	575
588	586
591	589
598	596
599	597
616	617
623	621
626	624

Биспецифические антигенсвязывающие белки IgG-ScFv.

Антигенсвязывающие белки IgG-ScFv имеют структуру, изображенную на фиг. 2. Такие молекулы содержат тяжелую и легкую цепи антитела (IgG часть молекулы), которое содержит первую антигенсвязывающую единицу молекулы IgG-scFv. Такие молекулы дополнительно содержат scFv - гибридный белок, содержащий в одной цепи переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи второго антитела. Эта часть scFv молекулы содержит вторую антигенсвязывающую единицу молекулы IgG-scFv. Часть scFv слита с каждой тяжелой цепью IgG части молекулы.

Антигенсвязывающий белок IgG-scFv по изобретению содержит связывающую анти-TL1A единицу, в частности аминокислотные последовательности анти-TL1A связывающих единиц, как описано выше. Предпочтительные антигенсвязывающие белки IgG-scFv содержат последовательности анти-TL1A CDR, как описано в табл. А, В и С, причем последовательности из табл. А являются наиболее предпочтительными. Более предпочтительные антигенсвязывающие белки IgG-scFv содержат последовательности анти-TL1A переменного домена из табл. D. Дополнительно предпочтительными являются антигенсвязывающие белки IgG-scFv, содержащие полноразмерные последовательности антител из табл. E.

Данный документ дополнительно относится к молекулам IgG-scFv, содержащим анти-TNF- $\alpha$  антигенсвязывающую единицу, предпочтительно содержащую последовательности CDR, как описано в табл. G. Кроме того, предпочтительными являются молекулы IgG-scFv, содержащие последовательности анти-TNF- $\alpha$  переменных доменов, как описано в табл. H. Дополнительно предпочтительными являются молекулы IgG-scFv, содержащие полноразмерные аминокислотные последовательности антител против TNF- $\alpha$ , как описано в табл. K.

Таблица К

Предпочтительные антитела против TNF- $\alpha$

Обозначение антитела	Легкая цепь	Тяжелая цепь	iPS №
	SEQ ID NO	SEQ ID NO	
адалimumаб	46	48	104628
<b>C234</b>	78	80	330194
<b>3.2</b>	84	86	330237
сертолизумаб	88	90	333788

Каждая из аминокислотных последовательностей в табл. К кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, непосредственно предшествующей ей в перечне последовательностей.

В некоторых вариантах реализации изобретения тяжелая цепь части IgG слита с частью scFv через пептидный линкер. В некоторых вариантах реализации изобретения пептидный линкер содержит после-

довательность, выбранную из группы, состоящей из (Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>2</sub>, (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>2</sub>, (Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>3</sub>, (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>, (Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>4</sub>, (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub>, (Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>5</sub>, (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>5</sub>, (Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>6</sub> и (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>6</sub>.

Кроме того, предпочтительными являются антигенсвязывающие белки IgG-scFv, содержащие последовательности тяжелой и легкой цепей, как описано в табл. L и M. Последовательности тяжелой цепи в табл. L и M содержат ScFv часть молекулы, слитую с тяжелой цепью IgG части молекулы. В обозначении молекулы в левом столбце этих таблиц название первого антитела идентифицирует IgG часть молекулы, таким образом, что молекула IgG-scFv содержит полноразмерные последовательности тяжелых и легких цепей указанного антитела. Название второго антитела идентифицирует scFv часть молекулы, таким образом, что последовательность тяжелой цепи содержит переменный домен тяжелой цепи и последовательности переменного домена легкой цепи, как описано в данном документе выше. Таким образом, "адалимумаб IgG-9C8 scFv" содержит легкую цепь адалимумаба и тяжелую цепь адалимумаба, слитую с переменным участком тяжелой цепи и переменным участком легкой цепи антитела 9C8. "CC" в обозначениях молекул в табл. L и M относится к цистеиновому зажиму; молекулы, обозначение которых включает CC, были модифицированы таким образом, что они содержат дополнительную цистеиновую дисульфидную связь. Такие цистеиновые замены предпочтительно вводят на границе VL-VH, в положениях 44 в VH и 100 в VL в схеме нумерации по Кабату. "Var" в табл. L означает вариант.

Таблица L

Предпочтительные антигенсвязывающие белки scFv, содержащие TL1A-связывающую единицу IgG-TNF-связывающую единицу

Обозначение молекулы	Тяжелая цепь SEQ ID NO	Легкая цепь SEQ ID NO	iPS
9C8 IgG-адалимумаб scFv	355	447	370012
9C8 IgG-3.2 scFv	357	447	370013
9C8 IgG-C234 scFv	359	318	370014
9C8 IgG-адалимумаб scFv+CC	361	447	370015
9C8 IgG-3.2 scFv+CC	363	447	370016
9C8 IgG-C234 scFv+CC	365	58	370017
23B3 VH4 IgG-адалимумаб scFv	367	70	370018
23B3 VH4 IgG-3.2 scFv	369	70	370019
23B3 VH4 IgG-C234 scFv	371	70	370020
23B3 VH4 IgG-адалимумаб scFv+CC	373	70	370021
23B3 VH4 IgG-3.2 scFv+CC	375	70	370022
23B3 VH4 IgG-C234 scFv+CC	377	70	370023
3B3 вар 2 IgG-адалимумаб scFv	391	523	371218
3B3v2 IgG-3.2 scFv	393	523	371219
3B3v2 IgG-C234 scFv	395	523	371220
3B3v2 IgG-адалимумаб scFv+CC	397	523	371221
3B3v2 IgG-3.2 scFv+CC	399	523	371222
3B3v2 IgG-C234 scFv+CC	401	523	371223
3B3 вар IgG-3.2 вар scFv	403	523	381031
3B3 вар IgG-3.2 вар scFv	405	523	381035
9C8 вар IgG-3.2 вар scFv	407	447	381040
9C8 вар IgG-3.2 вар scFv	409	447	381044
3B3 вар IgG-3.2 вар scFv+CC	411	523	381048
3B3 вар IgG-3.2 вар scFv+CC	413	523	381053
3B3 вар IgG-C234 вар scFv	415	523	381058
3B3 вар IgG-C234 вар scFv	417	523	381062
23B3 VH4 вар IgG-адалимумаб вар scFv	419	70	381066
23B3 VH4 вар IgG-адалимумаб вар scFv	421	70	381070

<b>23B3 VH4 вар IgG-адалимуаб вар scFv+CC</b>	423	70	381074
<b>23B3 VH4 вар IgG-адалимуаб вар scFv+CC</b>	425	70	381079

Каждый из полипептидов в табл. L кодируется нуклеиновой кислотой, имеющей нуклеотидную последовательность, непосредственно предшествующую полипептидной последовательности в перечне последовательностей.

Таблица М

Предпочтительные антигенсвязывающие белки scFv, содержащие TNF- $\alpha$ -связывающую единицу IgG-TL1A-связывающую единицу

<b>Обозначение молекулы</b>	<b>Тяжелая цепь SEQ ID NO</b>	<b>Легкая цепь SEQ ID NO</b>	<b>iPS</b>
<b>Адалимуаб IgG-9C8 scFv</b>	82	46	369989
<b>Адалимуаб IgG-23B3 VH4 scFv</b>	284	46	369990
<b>Адалимуаб IgG-9C8 scFv+CC</b>	286	46	369992
<b>Адалимуаб IgG-9C8 вар scFv+CC</b>	441	453	381505
<b>Адалимуаб IgG-23B3 VH4 scFv+CC</b>	312	46	369993
<b>3.2 IgG-9C8 scFv</b>	314	84	369995
<b>3.2 IgG-23B3 VH4 scFv</b>	320	84	369996
<b>3.2 IgG-9C8 scFv+CC</b>	322	84	369998
<b>3.2 IgG-23B3 VH4 scFv+CC</b>	345	84	369999
<b>C234 IgG-9C8 scFv</b>	347	78	370001
<b>C234 IgG-23B3 VH4 scFv</b>	349	78	370002
<b>C234 IgG-9C8 scFv+CC</b>	351	78	370004
<b>C234 IgG 23B3 VH4 scFv+CC</b>	353	78	370005
<b>Адалимуаб IgG-3B3v2 scFv</b>	379	46	371212
<b>Адалимуаб IgG-3Bv2 scFv+CC</b>	381	46	371213
<b>3.2 IgG-3B3v2 scFv</b>	383	84	371214
<b>3.2 IgG-3B3v2 scFv+CC</b>	385	84	371215
<b>C234 IgG-3B3v2 scFv</b>	387	78	371216
<b>C234 IgG-3B3v2 scFv+CC</b>	389	78	371217
<b>3.2 вар IgG-9C8 вар scFv</b>	427	449	381327

<b>3.2 вар IgG-9C8 вар scFv</b>	429	449	381331
<b>C234 вар IgG-9C8 вар scFv</b>	431	451	381485
<b>C234 вар IgG-9C8 вар scFv+CC</b>	433	451	381489
<b>C234 вар IgG-3B3 вар scFv</b>	435	451	381493
<b>C234 вар IgG-3B3 вар scFv+CC</b>	437	451	381497
<b>Адалимуаб вар IgG-9C8 вар scFv</b>	439	453	381501
<b>Адалимуаб вар IgG-9C8 вар scFv+CC</b>	441	453	381505
<b>Адалимуаб вар IgG-3B3 вар scFv</b>	443	453	381509
<b>Адалимуаб вар IgG-3B3 вар scFv+CC</b>	445	453	381513

Каждый из полипептидов в табл. М кодируется нуклеиновой кислотой, имеющей нуклеотидную последовательность, непосредственно предшествующую полипептидной последовательности в перечне последовательностей. Биспецифические антигенсвязывающие белки IgG-Fab.

В формате IgG-Fab биспецифический, поливалентный антигенсвязывающий белок содержит (i) первый полипептид, содержащий первую тяжелую цепь (VH2-CH1-CH2-CH3) из первого антитела, причем первая тяжелая цепь слита на своем карбоксильном конце (необязательно через пептидный линкер) с полипептидом, содержащим домены VH2-CH1 второго антитела с образованием модифицированной тяжелой цепи, (ii) второй полипептид, содержащий легкую цепь из первого антитела (VL1-CL) и (iii) третий полипептид, содержащий домены VL2-CL второго антитела. В некоторых вариантах реализации изобретения домены CL и CH1 первого антитела могут быть переключены ("поменяны местами") между первым и вторым полипептидом. В таких вариантах реализации изобретения второй полипептид содержит VL1-CH1, тогда как первый полипептид содержит VH1-CL-CH2-CH3-VH2-CH1, с VH1-CL-CH2-CH3, слитым на своем С-конце с VH2-CH1, необязательно через пептидный линкер. Третий полипептид содержит VL2-CL. В качестве альтернативы, домены CL и CH1 второго антитела могут быть переключены в некоторых вариантах реализации изобретения между первым и третьим полипептидом. В таких вариантах реализации изобретения третий полипептид содержит VL2-CH1, тогда как первый полипептид содержит VH1-CH1-CH2-CH3-VH2-CL, причем VH1-CH1-CH2-CH1 слит на своем С-конце с VH2-CL, необязательно через пептидный линкер. Второй полипептид содержит VL1-CL. В еще одном варианте реализации изобретения домены CL и CH1 обоих антител переключают между первым, вторым и третьим полипептидом. В таких вариантах реализации изобретения первый полипептид содержит VH1-CL-CH2-CH3-VH2-CL, причем VH1-CL-CH2-CH3, необязательно слит на своем С-конце с VH2-CL, второй полипептид содержит VL1-CH1, а третий полипептид содержит VL2-CH1. В объем данного изобретения включены такие молекулы IgG-Fab, в которых первое антитело содержит единицу, связывающуюся с TL1A, а второе антитело содержит единицу, связывающуюся с TNF- $\alpha$ . Подобным образом, в объем данного изобретения включены такие молекулы IgG-Fab, в которых первое антитело содержит единицу, связывающуюся с TNF- $\alpha$ , а второе антитело содержит единицу, связывающуюся с TL1A. Выражение, имеющее то же значение, что и два последних предложения, состоит в том, что первое антитело содержит одну из единицы, связывающейся с TL1A, или единицы, связывающейся с TNF- $\alpha$ , а второе антитело содержит другую из них. В одном аспекте формата IgG-Fab в рамках данного изобретения биспецифический, четырехвалентный антигенсвязывающий белок содержит а) первую тяжелую цепь первого антитела (VH1), причем первое антитело специфически связывается с первым антигеном и, при этом, первая тяжелая цепь слита на своем С-конце с N-концом фрагмента, содержащего вторую тяжелую цепь второго антитела (VH2), притом, что второе антитело специфически связывается со вторым антигеном; б) две легкие цепи первого антитела из а); и с) две легкие цепи второго антитела из а). В рамках данного изобретения первое антитело может специфически связываться с TL1A, а второе может специфически связываться с TNF- $\alpha$  или наоборот.

В другом аспекте формата IgG-Fab в рамках данного изобретения биспецифический антигенсвязывающий белок содержит (i) первый связывающий домен, который специфически связывается с первым антигеном, содержащий первый переменный участок легкой цепи иммуноглобулина (VL1) и переменный участок первой тяжелой цепи иммуноглобулина (VH1); (ii) второй связывающий домен, который специфически связывается со вторым антигеном, содержащий второй переменный участок легкой цепи иммуноглобулина (VL2) и второй переменный участок тяжелой цепи иммуноглобулина (VH2); и (iii) участок Fc иммуноглобулина человека, в котором один из связывающих доменов расположен на амино-конце участка Fc, а другой связывающий домен расположен на карбоксильном конце участка Fc, и, при этом, карбокси-концевой связывающий домен представляет собой Fab и слит через пептидный линкер с карбоксильным концом участка Fc, притом, что Fab слит с участком Fc на амино-конце участка VH Fab. В рамках данного изобретения первый антиген может представлять собой TL1A, а второй - TNF- $\alpha$ ,

или наоборот.

В другом аспекте формата IgG-Fab биспецифический, четырехвалентный антигенсвязывающий белок содержит:

а) первый полипептид, содержащий первую тяжелую цепь первого антитела, которая содержит первый вариабельный участок тяжелой цепи (VH1) и первый домен CH1, причем первое антитело специфически связывается с первым антигеном, и, при этом, первая тяжелая цепь слита на своем С-конце с N-концом полипептида, содержащего второй вариабельный участок тяжелой цепи второго антитела (VH2), притом, что VH2 слит на своем С-конце с N-концом второго домена CH1, причем второе антитело специфически связывается со вторым антигеном; и, при этом:

i) VH1 или первый домен CH1 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену для введения заряженной (например, положительно заряженной) аминокислоты в положении остатка, выбранном из группы, состоящей из положений 39, 44 и 183 согласно нумерации EU; и

ii) домен VH2 или второй домен CH1 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену для введения заряженной (предпочтительно с зарядом, противоположным заряду указанной в i) выше) аминокислоты в положении остатка, выбранном из группы, состоящей из остатка, который соответствует положениям 39, 44 и 183 согласно нумерации EU, причем заряд противоположен заряду замененного остатка VH1 или первого CH1 первой тяжелой цепи; и

б) второй полипептид, содержащий первую легкую цепь первого антитела из а), причем первая легкая цепь содержит первый вариабельный участок легкой цепи (VL1) и первый участок CL; и, при этом, домен VL1 или первый CL содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену для введения заряженной аминокислоты в положении остатка, выбранном из группы, состоящей из положений 38, 100 и 176 согласно нумерации EU, притом, что заряд в положении 38 является противоположным заряду замененного остатка VH1 или первого CH1 первой тяжелой цепи в положении 39; заряд в положении 100 противоположен заряду замененного остатка VH1 или первого CH1 первой тяжелой цепи в положении 44; заряд в положении 176 противоположен заряду замененного остатка VH1 или первого CH1 первой тяжелой цепи в положении 183; и

в) третий полипептид, содержащий вторую легкую цепь второго антитела из а), причем вторая легкая цепь содержит второй вариабельный участок легкой цепи (VL2) и второй участок CL; и, при этом, домен VL2 или второй домен CL содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену для введения заряженной аминокислоты в положении остатка, выбранном из группы, состоящей из положений 38, 100 и 176 согласно нумерации EU, притом, что заряд в положении 38 противоположен заряду замененного остатка VH2 или второго CH1 второй тяжелой цепи в положении 39; заряд в положении 100 противоположен заряду замененного остатка VH2 или второго CH1 второй тяжелой цепи в положении 44; заряд в положении 176 противоположен заряду замененного остатка VH2 или второго CH1 второй тяжелой цепи в положении 183.

В рамках данного изобретения первый антиген в подпункте а) выше может быть одним из TL1A и TNF- $\alpha$ , а второй антиген может быть другим из них. Другой способ заявить эту же специфичность связывания состоит в том, чтобы сказать, что первое антитело в подпункте а) содержит одну из единицы, связывающейся с TL1A, или единицы, связывающейся с TNF- $\alpha$ , а второе антитело содержит другую из них.

В некоторых вариантах реализации биспецифических антигенсвязывающих белков по изобретению, в которых карбокси-концевой связывающий домен представляет собой фрагмент Fab, связывающий домен, расположенный на amino-конце участка Fc (т.е., amino-концевой связывающий домен) также является фрагментом Fab. Amino-концевой фрагмент Fab может быть слит с amino-концом участка Fc через пептидный линкер или область шарнира иммуноглобулина, описанную в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения amino-концевой фрагмент Fab соединен с amino-концом участка Fc через шарнирную область IgG1 человека. В других вариантах реализации изобретения amino-концевой фрагмент Fab соединен с amino-концом участка Fc через шарнирную область IgG2 человека. В одном варианте реализации изобретения amino-концевой фрагмент Fab слит с участком Fc через карбоксильный конец участка CH1 Fab.

В некоторых вариантах реализации изобретения биспецифический антигенсвязывающий белок по изобретению содержит первое антитело, которое специфически связывается с первой мишенью, причем одна полипептидная цепь (например, тяжелая цепь (VH2-CH1)) фрагмента Fab из второго антитела, которое специфически связывается со второй мишенью, слита с карбоксильным концом тяжелой цепи первого антитела. Биспецифический антигенсвязывающий белок в таких вариантах реализации изобретения дополнительно содержит полипептидную цепь, содержащую вторую половину фрагмента Fab из второго антитела (например, легкая цепь (VL2-CL)). Этот формат упоминается в данном документе как формат "IgG-Fab", и один вариант реализации такого типа молекулы схематически изображен на фиг. 25. Таким образом, в некоторых вариантах реализации данное изобретение включает биспецифический, поливалентный антигенсвязывающий белок, содержащий: (i) легкую цепь из первого антитела, (ii) тяжелую цепь из первого антитела, причем тяжелая цепь слита на своем карбоксильном конце через пептидный

линкер с первым полипептидом, содержащим домены VH-CH1 второго антитела, с образованием модифицированной тяжелой цепи, и (iii) второй полипептид, содержащий домены VL-CL второго антитела. В димеризованном состоянии биспецифический антигенсвязывающий белок представляет собой гомогексамер, содержащий две модифицированные тяжелые цепи, две легкие цепи из первого антитела и две полипептидные цепи, содержащие вторую половину фрагмента Fab из второго антитела (фрагмент Fd). В одном варианте реализации изобретения первый полипептид, который слит с карбоксильным концом тяжелой цепи, содержит домены VH и CH1 из второго антитела, а второй полипептид содержит домены VL и CL из второго антитела.

В некоторых вариантах реализации изобретения антигенсвязывающие белки по изобретению содержат (i) первый связывающий домен, который специфически связывается с первым целевым антигеном, (ii) второй связывающий домен, который специфически связывается со вторым целевым антигеном, и (iii) участок Fc иммуноглобулина человека, причем один из связывающих доменов расположен на амино-конце участка Fc, а другой связывающий домен расположен на карбоксильном конце участка Fc. В некоторых вариантах реализации изобретения каждый из первого и второго связывающих доменов содержит переменный участок иммуноглобулина. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения первый связывающий домен содержит первый переменный участок легкой цепи (VL1) и первый переменный участок тяжелой цепи (VH1) из антитела против первого целевого антигена, а второй связывающий домен содержит второй переменный участок легкой цепи (VL2) и второй переменный участок тяжелой цепи (VH2) из антитела против второго целевого антигена. В некоторых вариантах реализации биспецифических антигенсвязывающих белков по изобретению связывающий домен, расположенный на амино-конце участка Fc (т.е., амино-концевой связывающий домен), представляет собой фрагмент Fab, слитый с амино-концом участка Fc через пептидный линкер, описанный в данном документе, или через шарнирную область иммуноглобулина. "Шарнирная область иммуноглобулина" относится к аминокислотной последовательности, соединяющей домен CH1 и домен CH2 тяжелой цепи иммуноглобулина. Шарнирная область IgG1 человека обычно определяется как аминокислотная последовательность от около Glu216 или около Cys226 до около Pro230. Шарнирные области других изотипов IgG могут быть выровнены с последовательностью IgG1 путем размещения первого и последнего остатков цистеина, образующих дисульфидные связи между тяжелыми цепями, в одинаковых положениях и могут быть определены специалистами в данной области техники. В некоторых вариантах реализации изобретения амино-концевой связывающий домен соединяют с амино-концом участка Fc через шарнирную область IgG1 человека. В других вариантах реализации изобретения амино-концевой связывающий домен соединяют с амино-концом участка Fc через шарнирную область IgG2 человека. В одном варианте реализации изобретения амино-концевой связывающий домен (например, фрагмент Fab) слит с участком Fc через карбоксильный конец участка CH1 Fab.

В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающих белков по изобретению связывающий домен, расположенный на карбоксильном конце участка Fc (т.е., карбокси-концевой связывающий домен), представляет собой фрагмент Fab. В таких вариантах реализации изобретения Fab слит или иным образом соединен с карбоксильным концом участка Fc (например, карбоксильный конец домена CH3) посредством пептидного линкера через амино-конец участка VH фрагмента Fab. Таким образом, в одном варианте реализации изобретения Fab слит с участком Fc через амино-конец участка VH Fab, таким образом, что полученный гибридный белок содержит, от N-конца до C-конца: домен CH2, домен CH3, пептидный линкер, участок VH и участок CH1.

В некоторых вариантах реализации изобретения первая тяжелая цепь антигенсвязывающего белка по данному изобретению слита с VH2 через пептидный линкер. В некоторых вариантах реализации изобретения пептидный линкер содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из (Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>2</sub>, (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>2</sub>, (Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>3</sub>, (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>, (Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>4</sub>, (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub>, (Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>5</sub>, (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>5</sub>, (Gly<sub>3</sub>Ser)<sub>6</sub> и (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>6</sub>. Указанные последовательности дополнительно могут быть записаны как:

GGGSGGGS (SEQ ID NO: 673),

GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 695),

GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 703),

GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 729),

GGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 735),

GGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 825),

GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 937),

GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 939),

GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 941), и

GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 945).

Пептидный линкер, соединяющий участок Fc с карбокси-концевым Fab, может быть любым из пептидных линкеров, описанных в данном документе. В конкретных вариантах реализации изобретения длина пептидного линкера, соединяющего участок Fc с карбокси-концевым фрагментом Fab, составляет по меньшей мере 5 аминокислот. В других вариантах реализации изобретения длина пептидного линкера, соединяющего участок Fc с карбокси-концевым фрагментом Fab, составляет по меньшей мере 8 аминокислот. Особенно подходящими пептидными линкерами для присоединения участка Fc к карбокси-концевому фрагменту Fab являются глицин-сериновые линкеры, такие как  $(Gly_xSer)_n$ , где  $x=3$  или 4, и  $n=2, 3, 4, 5$  или 6. В одном варианте реализации изобретения пептидный линкер, соединяющий участок Fc с карбокси-концевым фрагментом Fab, представляет собой линкер L10  $(G_4S)_2$ . В другом варианте реализации изобретения пептидный линкер, соединяющий участок Fc с карбокси-концевым фрагментом Fab, представляет собой линкер L9 или  $G_3SG_4S$  (GGGSGGGGS, SEQ ID NO: 946).

#### Мутации цепи.

В конкретных вариантах реализации изобретения биспецифические антигенсвязывающие белки, описанные в данном документе, содержат участок Fc из антитела человека IgG1, модифицированный таким образом, чтобы исключить эффекторные функции. Такие модифицированные участки Fc IgG1 содержат замены R292C и V302C. В таких вариантах реализации изобретения участок Fc может дополнительно содержать замену N297G (известную как "скаффолд" SEFL2).

Предпочтительные варианты реализации изобретения дополнительно включают мутации в тяжелой и легкой цепях, способствующие правильной сборке гетеро IgG биспецифического антигенсвязывающего белка. Подход, способствующий образованию гетеродимеров, чтобы исключить образование гомодимеров, предполагает использование электростатического механизма управления (см. Gunasekaran et al. (2010), *L Biol. Chem.*, Vol. 285: 19637-19646, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме). Этот подход включает введение или использование заряженных остатков в домене СНЗ каждой тяжелой цепи, таким образом, что две различные тяжелые цепи связываются через противоположные заряды, которые вызывают электростатическое притяжение. Гомодимеризация одинаковых тяжелых цепей невыигрышна, поскольку одинаковые тяжелые цепи имеют одинаковый заряд и поэтому отталкиваются. Этот же метод электростатического управления можно применять для предотвращения неправильного спаривания легких цепей с неподходящими тяжелыми цепями путем введения остатков с противоположными зарядами в правильную пару легкой цепи-тяжелой цепи на границе связывания. Методика электростатического управления и подходящие мутации зарядовых пар, способствующие образованию гетеродимеров и правильному спариванию легкой цепи-тяжелой цепи, описаны в WO2009/089004 и WO2014/081955, оба из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме. В вариантах реализации изобретения, в которых биспецифические антигенсвязывающие белки по изобретению представляют собой гетеродимерные антитела, содержащие первую легкую цепь (LC1) и первую тяжелую цепь (HC1) из первого антитела, которое специфически связывается с первым целевым антигеном, и вторую легкую цепь (LC2) и вторую тяжелую цепь (HC2) из второго антитела, которое специфически связывается со второй мишенью, HC1 или HC2 может содержать одну или большее количество аминокислотных замен, чтобы заменить положительно заряженную аминокислоту отрицательно заряженной аминокислотой. Например, в одном варианте реализации изобретения домен СНЗ HC1 или домен СНЗ HC2 содержит аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности IgG дикого типа, таким образом, что одна или большее количество положительно заряженных аминокислот (например, лизин, гистидин и аргинин) в аминокислотной последовательности человеческого IgG дикого типа заменены на одну или большее количество отрицательно заряженных аминокислот (например, аспарагиновую кислоту и глутаминовую кислоту) в соответствующем(-их) положении(-ях) в домене СНЗ. В этих и других вариантах реализации изобретения аминокислоты (например, лизин) в одном или большем количестве положений, выбранных из 370, 392 и 409 (система нумерации EU), заменяют отрицательно заряженной аминокислотой (например, аспарагиновой кислотой и глутаминовой кислотой). Замена аминокислоты в аминокислотной последовательности обычно обозначается в данном документе однобуквенной аббревиатурой для аминокислотного остатка в определенном положении, за которой следует численное обозначение положения аминокислоты относительно исходной последовательности, представляющей интерес, и далее следует однобуквенный символ для заменяющего аминокислотного остатка. Например, "T30D" символизирует замену треонинового остатка остатком аспартата в положении аминокислоты 30 относительно исходной последовательности, представляющей интерес. Другой пример: "S218G" символизирует замену остатка серина глициновым остатком в положении аминокислоты 218 относительно исходной аминокислотной последовательности, представляющей интерес. В некоторых вариантах реализации изобретения HC1 или HC2 гетеродимерных антител могут содержать одну или большее количество аминокислотных замен для замены отрицательно заряженной аминокислоты положительно заряженной аминокислотой. Например, в одном варианте реализации изобретения домен СНЗ HC1 или домен СНЗ HC2 содержит аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности IgG дикого типа, таким образом, что одна или большее количество отрицательно заряженных аминокислот в аминокислотной последовательности IgG человека дикого типа заменены одной или большим количеством положительно заряженных аминокислот

в соответствующем(-их) положении(-ях) домена СНЗ. В этих и других вариантах реализации изобретения аминокислоты (например, аспарагиновая кислота или глутаминовая кислота) в одном или большем количестве положений, выбранных из 356, 357 и 399 (система нумерации EU) домена СНЗ, заменяют положительно заряженной аминокислотой (например, лизином, гистидином и аргинином). В конкретных вариантах реализации изобретения гетеродимерное антитело содержит первую тяжелую цепь, содержащую отрицательно заряженные аминокислоты в положениях 392 и 409 (например, замены K392D и K409D), и вторую тяжелую цепь, содержащую положительно заряженные аминокислоты в положениях 356 и 399 (например, замены E356K и D399K). В других конкретных вариантах реализации изобретения гетеродимерное антитело содержит первую тяжелую цепь, содержащую отрицательно заряженные аминокислоты в положениях 392, 409 и 370 (например, замены K392D, K409D и K370D), и вторую тяжелую цепь, содержащую положительно заряженные аминокислоты в положениях 356, 399 и 357 (например, замены E356K, D399K и E357K). В родственных вариантах реализации изобретения первая тяжелая цепь происходит из антитела против первого целевого антигена, а вторая тяжелая цепь происходит из антитела против второго целевого антигена.

Для облегчения ассоциации конкретной тяжелой цепи с соответствующей легкой цепью, как тяжелая, так и легкая цепи могут содержать комплементарные аминокислотные замены. Как используется в данном документе, термин "комплементарные аминокислотные замены" относится к замене положительно заряженной аминокислотой в одной цепи в паре с заменой отрицательно заряженной аминокислотой в другой цепи. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения тяжелая цепь содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену для введения заряженной аминокислоты, а соответствующая легкая цепь содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену для введения заряженной аминокислоты, причем заряженная аминокислота, введенная в тяжелую цепь, имеет заряд, противоположный заряду аминокислоты, введенной в легкую цепь. В некоторых вариантах реализации изобретения один или большее количество положительно заряженных остатков (например, лизин, гистидин или аргинин) могут быть введены в первую легкую цепь (LC1), и один или большее количество отрицательно заряженных остатков (например, аспарагиновая кислота или глутаминовая кислота) могут быть введены в парную к ней тяжелую цепь (HC1) на границе связывания LC1/HC1, тогда как один или большее количество отрицательно заряженных остатков (например, аспарагиновая кислота или глутаминовая кислота) могут быть введены во вторую легкую цепь (LC2) и один или большее количество положительно заряженных остатков (например, лизин, гистидин или аргинин) могут быть введены в парную к ней тяжелую цепь (HC2) на границе связывания LC2/HC2. Электростатические взаимодействия будут направлять LC1 для спаривания с HC1 и LC2 для спаривания с HC2, поскольку противоположно заряженные остатки (полярность) на границе связывания притягиваются. Пары тяжелой/легкой цепи, содержащие остатки с одинаковым зарядом (полярностью) на границе связывания (например, LC1/HC2 и LC2/HC1), будут отталкиваться, что приводит к подавлению образования нежелательных пар HC/LC. В этих и других вариантах реализации изобретения домен СН1 тяжелой цепи или домен CL легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности IgG дикого типа, таким образом, что одна или большее количество положительно заряженных аминокислот в аминокислотной последовательности дикого типа IgG заменены одной или большим количеством отрицательно заряженных аминокислот. В качестве альтернативы, домен СН1 тяжелой цепи или домен CL легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности IgG дикого типа, таким образом, что одна или большее количество отрицательно заряженных аминокислот в аминокислотной последовательности IgG дикого типа заменены одной или большим количеством положительно заряженных аминокислот. В некоторых вариантах реализации изобретения одна или большее количество аминокислот в домене СН1 первой и/или второй тяжелой цепи в гетеродимерном антителе в положении согласно нумерации EU, выбранном из F126, P127, L128, A141, L145, K147, D148, H168, F170, P171, V173, Q175, S176, S183, V185 и K213 заменены заряженной аминокислотой. В некоторых вариантах реализации изобретения остаток тяжелой цепи для замены отрицательно или положительно заряженной аминокислотой представляет собой S183 (система нумерации EU). В некоторых вариантах реализации изобретения S183 заменены положительно заряженной аминокислотой. В альтернативных вариантах реализации изобретения S183 заменены отрицательно заряженной аминокислотой. Например, в одном варианте реализации изобретения в первой тяжелой цепи S183 заменены отрицательно заряженной аминокислотой (например, S183E), а во второй тяжелой цепи S183 заменены положительно заряженной аминокислотой (например, S183K).

В вариантах реализации изобретения, в которых легкая цепь представляет собой легкую цепь каппа, одна или большее количество аминокислот в домене CL первой и/или второй легкой цепи в гетеродимерном антителе в положении (нумерация EU в легкой цепи каппа), выбранном из F116, F118, S121, D122, E123, Q124, S131, V133, L135, N137, N138, Q160, S162, T164, S174 и S176, заменены заряженной аминокислотой. В вариантах реализации изобретения, в которых легкая цепь представляет собой легкую цепь ламбда, одна или большее количество аминокислот в домене CL первой и/или второй легкой цепи в гетеродимерном антителе в положении (EU-нумерация в цепи ламбда), выбранном из T116, F118, S121, E123, E124, K129, T131, V133, L135, S137, E160, T162, S165, Q167, A174, S176 и Y178, заменены заря-

женной аминокислотой. В некоторых вариантах реализации изобретения остаток для замены отрицательно или положительно заряженной аминокислотой представляет собой S176 (система нумерации EU) домена CL легкой цепи каппа или лямбда. В некоторых вариантах реализации изобретения S176 домена CL заменен положительно заряженной аминокислотой. В альтернативных вариантах реализации изобретения S176 домена CL заменен отрицательно заряженной аминокислотой. В одном варианте реализации изобретения в первой легкой цепи S176 заменен положительно заряженной аминокислотой (например, S176K), а во второй легкой цепи S176 заменен отрицательно заряженной аминокислотой (например, S176E).

В дополнение или в качестве альтернативы комплементарным аминокислотным заменам в доменах СН1 и СL, варьируемые участки легкой и тяжелой цепей в гетеродимерном антителе могут содержать одну или большее количество комплементарных аминокислотных замен для введения заряженных аминокислот. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения участок VH тяжелой цепи или участок VL легкой цепи гетеродимерного антитела содержит аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности IgG дикого типа, таким образом, что одна или большее количество положительно заряженных аминокислот в аминокислотной последовательности IgG дикого типа заменены одной или большим количеством отрицательно заряженных аминокислот. В качестве альтернативы, участок VH тяжелой цепи или участок VL легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности IgG дикого типа, таким образом, что одна или большее количество отрицательно заряженных аминокислот в аминокислотной последовательности IgG дикого типа заменены одной или большим количеством положительно заряженных аминокислот.

Остатки интерфейса участка V (т.е., аминокислотные остатки, которые опосредуют сборку участков VH и VL) в пределах участка VH включают положения EU 1, 3, 35, 37, 39, 43, 44, 45, 46, 47, 50, 59, 89, 91 и 93. Один или большее количество из этих остатков интерфейса на участке VH могут быть заменены заряженной (положительно или отрицательно заряженной) аминокислотой. В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислота в положении EU 39 участка VH первой и/или второй тяжелой цепи заменена положительно заряженной аминокислотой, например, лизином. В альтернативных вариантах реализации изобретения аминокислота в положении EU 39 участка VH первой и/или второй тяжелой цепи заменена отрицательно заряженной аминокислотой, например, глутаминовой кислотой. В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислота в положении EU 39 участка VH первой тяжелой цепи заменена отрицательно заряженной аминокислотой (например, G39E), а аминокислота в положении EU 39 участка VH второй тяжелой цепи заменена положительно заряженной аминокислотой (например, G39K). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислота в положении EU 44 участка VH первой и/или второй тяжелой цепи заменена положительно заряженной аминокислотой; например, лизином. В альтернативных вариантах реализации изобретения аминокислота в положении EU 44 участка VH первой и/или второй тяжелой цепи заменена отрицательно заряженной аминокислотой; например, глутаминовой кислотой. В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислота в положении EU 44 участка VH первой тяжелой цепи заменена отрицательно заряженной аминокислотой (например, G44E), а аминокислота в положении EU 44 участка VH второй тяжелой цепи заменена положительно заряженной аминокислотой (например, G44K). Остатки интерфейса участка V (например, аминокислотные остатки, которые опосредуют сборку участков VH и VL) в пределах участка VL, включают положения EU 32, 34, 35, 36, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 48, 49, 50, 51, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 85, 87, 89, 90, 91 и 100. Один или большее количество остатков интерфейса на участке VL могут быть заменены заряженной аминокислотой, предпочтительно аминокислотой, заряд которой противоположен заряду аминокислот, введенных в участок VH парной к ней тяжелой цепи. В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислота в положении EU 100 участка VL первой и/или второй легкой цепи заменена положительно заряженной аминокислотой; например, лизином. В альтернативных вариантах реализации изобретения аминокислота в положении EU 100 участка VL первой и/или второй легкой цепи заменена отрицательно заряженной аминокислотой; например, глутаминовой кислотой. В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислота в положении EU 100 участка VL первой легкой цепи заменена положительно заряженной аминокислотой (например, G100K), а аминокислота в положении EU 100 участка VL второй легкой цепи заменена отрицательно заряженной аминокислотой (например, G100E).

В некоторых вариантах реализации изобретения гетеродимерное антитело по изобретению содержит первую тяжелую цепь и вторую тяжелую цепь и первую легкую цепь и вторую легкую цепь, причем первая тяжелая цепь содержит аминокислотные замены в положениях 44 (EU), 183 (EC), 392 (EU) и 409 (EU), и, при этом, вторая тяжелая цепь содержит аминокислотные замены в положениях 44 (EU), 183 (EU), 356 (EU) и 399 (EU), притом, что первая и вторая легкие цепи содержат аминокислотные замены в положениях 100 (EU) и 176 (EU), причем аминокислотные замены вводят в указанные положения заряженную аминокислоту. В родственных вариантах реализации изобретения глицин в положении 44 (EU) первой тяжелой цепи заменен глутаминовой кислотой, глицин в положении 44 (EU) второй тяжелой цепи заменен лизином, глицин в положении 100 (EU) первой легкой цепи заменен лизином, глицин в положении 100 (EU) второй легкой цепи заменен глутаминовой кислотой, серин в положении 176 (EU) первой

легкой цепи заменен лизином, серин в положении 176 (EU) второй легкой цепи заменен глутаминовой кислотой, серин в положении 183 (EU) первой тяжелой цепи заменен глутаминовой кислотой, лизин в положении 392 (EU) первой тяжелой цепи заменен аспарагиновой кислотой, лизин в положении 409 (EU) первой тяжелой цепи заменен аспарагиновой кислотой, серин в положении 183 (EU) второй тяжелой цепи заменен лизином, глутаминовая кислота в положении 356 (EU) второй тяжелой цепи заменена лизином и/или аспарагиновая кислота в положении 399 (EU) второй тяжелой цепи заменена лизином.

В других вариантах реализации изобретения гетеродимерные антитела по изобретению содержат первую тяжелую цепь и вторую тяжелую цепь и первую легкую цепь и вторую легкую цепь, причем первая тяжелая цепь содержит аминокислотные замены в положениях 183 (EU), 392 (EU) и 409 (EU), и, при этом, вторая тяжелая цепь содержит аминокислотные замены в положениях 183 (EU), 356 (EU) и 399 (EU), притом, что первая и вторая легкие цепи содержат аминокислотную замену в положении 176 (EU), причем аминокислотные замены вводят в указанные положения заряженную аминокислоту. В родственных вариантах реализации изобретения серин в положении 176 (EU) первой легкой цепи заменен лизином, серин в положении 176 (EU) второй легкой цепи заменен глутаминовой кислотой, серин в положении 183 (EU) первой тяжелой цепи заменен глутаминовой кислотой, лизин в положении 392 (EU) первой тяжелой цепи заменен аспарагиновой кислотой, лизин в положении 409 (EU) первой тяжелой цепи заменен аспарагиновой кислотой, серин в положении 183 (EU) второй тяжелой цепи заменен лизином, глутаминовая кислота в положении 356 (EU) второй тяжелой цепи заменена лизином и/или аспарагиновая кислота в положении 399 (EU) второй тяжелой цепи заменена лизином.

В других вариантах реализации изобретения гетеродимерное антитело по изобретению содержит первую тяжелую цепь и вторую тяжелую цепь и первую легкую цепь и вторую легкую цепь, причем первая тяжелая цепь содержит аминокислотные замены в положениях 183 (EU), 392 (EU), 409 (EU) и 370 (EU), и, при этом, вторая тяжелая цепь содержит аминокислотные замены в положениях 183 (EU), 356 (EU), 399 (EU) и 357 (EU), притом, что первая и вторая легкие цепи содержат аминокислотную замену в положении 176 (EU), причем аминокислотные замены вводят в указанные положения заряженную аминокислоту. В родственных вариантах реализации изобретения серин в положении 176 (EU) первой легкой цепи заменен лизином, серин в положении 176 (EU) второй легкой цепи заменен глутаминовой кислотой, серин в положении 183 (EU) первой тяжелой цепи заменен глутаминовой кислотой, лизин в положении 392 (EU) первой тяжелой цепи заменен аспарагиновой кислотой, лизин в положении 409 (EU) первой тяжелой цепи заменен аспарагиновой кислотой, серин в положении 183 (EU) второй тяжелой цепи заменен лизином, глутаминовая кислота в положении 356 (EU) второй тяжелой цепи заменена лизином, аспарагиновая кислота в положении 399 (EU) второй тяжелой цепи заменена лизином, и/или глутаминовая кислота в положении 357 (EU) второй тяжелой цепи заменена лизином.

Любой из константных доменов может быть модифицирован для введения одной или большего количества мутаций зарядовых пар, описанных выше, чтобы облегчить правильную сборку гетеродимерного антитела.

Гетеродимерные антитела по изобретению дополнительно включают антитела, содержащие тяжелую цепь (цепи) и/или легкую цепь (цепи), в которых отсутствуют один, два, три, четыре или пять аминокислотных остатков отсутствуют на N-конце или C-конце или на обоих, относительно любой из тяжелой и легкой цепей, например, в результате посттрансляционных модификаций, вызванных типом клетки-хозяина, в которой экспрессируются антитела. Например, клетки яичника китайского хомячка (СНО) часто отщепляют C-концевой лизин от тяжелых цепей антител. Мутации зарядной пары или комплементарные аминокислотные замены, как описано в данном документе, могут быть введены на участках Fab первого антитела (Fab 1) или второго антитела (Fab 2), чтобы способствовать правильному спариванию тяжелой цепи-легкой цепи. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения аминокислота в положении EU 38 домена VL в Fab 1 заменена отрицательно заряженной аминокислотой (например, глутаминовой кислотой), а аминокислота в положении 39 EU домена VH в Fab 1 заменена положительно заряженной аминокислотой (например, лизином). В других вариантах реализации изобретения аминокислота в положении EU 38 домена VL в Fab 1 заменена положительно заряженной аминокислотой (например, лизином), а аминокислота в положении EU 39 домена VH в Fab 1 заменена отрицательно заряженной аминокислотой (например, глутаминовой кислотой). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислота в положении EU 38 домена VL в Fab 2 заменена отрицательно заряженной аминокислотой (например, глутаминовой кислотой), а аминокислота в положении EU 39 домена VH в Fab 2 заменена положительно заряженной аминокислотой (например, лизином). В других вариантах реализации изобретения аминокислота в положении EU 38 домена VL в Fab 2 заменена положительно заряженной аминокислотой (например, лизином), а аминокислота в положении EU 39 домена VH в Fab 2 заменена отрицательно заряженной аминокислотой (например, глутаминовой кислотой). В вариантах реализации изобретения, в которых участок VH-CH1 (т.е., фрагмент Fd) из второго антитела слит с тяжелой цепью первого антитела, тяжелая цепь из первого антитела содержит мутацию S183E (нумерация EU), легкая цепь из первого антитела содержит мутацию S176K (нумерация EU), легкая цепь из второго антитела содержит мутацию S176E (нумерация EU) и участок Fd из второго антитела (который слит с C-концом

тяжелой цепи из первого антитела) содержит мутацию S183K (нумерация EU). В других вариантах реализации изобретения тяжелая цепь из первого антитела содержит мутацию G44E (EU) и мутацию S183E (нумерация EU), легкая цепь из первого антитела содержит мутацию G100K (EU) и S176K (нумерация EU), легкая цепь из второго антитела содержит мутацию G100E (EU) и мутацию S176E (нумерация EU), а участок Fd из второго антитела (который слит с C-концом тяжелой цепи из первого антитела) содержит мутацию G44K (EU) и мутацию S183K (нумерация EU). Знак зарядов в вышеприведенных примерах может быть изменен на обратный, при условии, что знак заряда на соответствующей легкой или тяжелой цепи также будет изменен на обратный, таким образом, что правильные пары тяжелых/легких цепей будут иметь противоположный заряд.

В одном варианте реализации данное изобретение относится к биспецифическому, четырехвалентному антигенсвязывающему белку, содержащему:

а) первый полипептид, содержащий первую тяжелую цепь первого антитела, содержащую первый вариабельный участок тяжелой цепи (VH1) и первый домен CH1, причем первое антитело специфически связывается с первым антигеном, и, при этом, первая тяжелая цепь слита на своем C-конце с N-концом полипептида, содержащего второй вариабельный участок тяжелой цепи второго антитела (VH2), причем VH2 слит на своем C-конце с N-концом второго домена CH1, причем второе антитело специфически связывается со вторым антигеном; и, при этом

i) VH1 или первый домен CH1 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену для введения заряженной (например, положительно заряженной) аминокислоты в положении остатка, выбранном из группы, состоящей из положений 39, 44 и 183, согласно нумерации EU; и

ii) домен VH2 или второй CH1 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену для введения противоположно заряженной (например, отрицательно заряженной) аминокислоты в положении остатка, выбранном из группы, состоящей из остатка, который соответствует положениям 39, 44 и 183 согласно нумерации EU; и

b) второй полипептид, содержащий первую легкую цепь первого антитела из а), причем первая легкая цепь содержит первый вариабельный участок легкой цепи (VL1) и первый участок CL; и, при этом, домен VL1 или первый CL содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену для введения отрицательно заряженной аминокислоты в положении остатка, выбранном из группы, состоящей из положений 38, 100 и 176 согласно нумерации EU; и

с) третий полипептид, содержащий вторую легкую цепь второго антитела из а), причем вторая легкая цепь содержит второй вариабельный участок легкой цепи (VL2) и второй участок CL; и, при этом, домен VL1 или первый CL содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену для введения положительно заряженной аминокислоты в положении остатка, выбранном из группы, состоящей из положений 38, 100 и 176 согласно нумерации EU.

В объеме данного изобретения первый антиген в подпункте а) выше может быть одним из TL1A и TNF- $\alpha$ , а второй антиген может быть другим из них. Другой способ заявить эту же специфичность связывания состоит в том, чтобы сказать, что первое антитело в подпункте а) содержит одну из единицы, связывающейся с TL1A, или единицы, связывающейся с TNF- $\alpha$ , а второе антитело содержит другую из них. "Соответствует", при использовании в отношении домена VH2 и второго домена CH1 означает, что аминокислотные остатки домена VH2 и второго домена CH1 отсчитываются от C-конца первой тяжелой цепи, если отсутствует линкер. Если присутствует пептидный линкер, аминокислотные остатки домена VH2 и второго домена CH1 отсчитываются от C-конца пептидного линкера. В любом случае аминокислотные остатки не отсчитываются от N-конца первой тяжелой цепи. Скорее, для домена VH2 и второго домена CH1 отсчет начинается с первого аминокислотного остатка домена VH2. Отсчет аминокислотных остатков осуществляется с применением конвенции EU или конвенции АНо.

В некоторых вариантах реализации изобретения: а) домен VH1 или первый домен CH1 содержит мутацию, выбранную из группы, состоящей из Q39K, G44K и S183K согласно нумерации EU; б) домен VH2 или второй домен CH1 содержит мутацию, выбранную из группы, состоящей из Q39E, G44E и S183E согласно нумерации EU; в) домен VL1 или первый домен CL содержит мутацию, выбранную из группы, состоящей из Q38E, G100E и S176E согласно нумерации EU; и д) домен VL2 или второй домен CL содержит мутацию, выбранную из группы, состоящей из Q38K, G100K и S176K согласно нумерации EU.

В некоторых вариантах реализации изобретения: а) VH1 содержит мутацию Q39K, а первый домен CH1 содержит мутацию S183K согласно нумерации EU; б) VH2 содержит мутацию Q39E, а второй домен CH1 содержит мутацию S183E согласно нумерации EU; в) VL1 содержит мутацию Q38E, а первый домен CL содержит мутацию S176E согласно нумерации EU; и д) VL2 содержит мутацию Q38K, а второй домен CL содержит мутацию S176K согласно нумерации EU.

В некоторых вариантах реализации изобретения: а) первый домен CH1 содержит мутации G44K и S183K согласно нумерации EU; б) второй домен CH1 содержит мутации G44E и S183E согласно нумерации EU; в) первый домен CL содержит мутации G100E и S176E согласно нумерации EU; и д) второй домен CL содержит мутации G100K и S176K согласно нумерации EU.

В одном варианте реализации данное изобретение относится к биспецифическому, четырехвалентному антигенсвязывающему белку, содержащему:

а) первый полипептид, содержащий первую тяжелую цепь первого антитела, которая содержит первый вариабельный участок тяжелой цепи (VH1) и первый домен СН1, причем первое антитело специфически связывается с первым антигеном и, при этом, первая тяжелая цепь слита на своем С-конце с N-концом полипептида, содержащего второй вариабельный участок тяжелой цепи второго антитела (VH2), притом, что VH2 слит на своем С-конце с N-концом второго домена СН1, причем второе антитело специфически связывается со вторым антигеном; и, при этом:

i) VH1 или первый домен СН1 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену для введения отрицательно заряженной аминокислоты в положении остатка, выбранном из группы, состоящей из положений 39, 44 и 183 согласно нумерации EU; и

ii) VH2 или второй домен СН1 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену для введения положительно заряженной аминокислоты в положении остатка, выбранном из группы, состоящей из остатка, который соответствует положениям 39, 44 и 183 согласно нумерации EU; и

б) второй полипептид, содержащий первую легкую цепь первого антитела из а), причем первая легкая цепь содержит первый вариабельный участок легкой цепи (VL1) и первый участок CL; и, при этом, VL1 или первый домен CL содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену для введения положительно заряженной аминокислоты в положении остатка, выбранном из группы, состоящей из положений 38, 100 и 176 согласно нумерации EU; и

в) третий полипептид, содержащий вторую легкую цепь второго антитела из а), причем вторая легкая цепь содержит второй вариабельный участок легкой цепи (VL2) и второй участок CL; и, при этом, VL1 или первый домен CL содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену для введения отрицательно заряженной аминокислоты в положении остатка, выбранном из группы, состоящей из положений 38, 100 и 176 согласно нумерации EU.

В рамках данного изобретения первый антиген в подпункте а) выше может быть одним из TL1A и TNF- $\alpha$ , а второй антиген может быть другим из них. Другой способ заявить эту же специфичность связывания состоит в том, чтобы сказать, что первое антитело в подпункте а) содержит одну из единицы, связывающейся с TL1A, или единицы, связывающейся с TNF- $\alpha$ , а второе антитело содержит другую из них.

В некоторых вариантах реализации изобретения: а) домен VH1 или первый домен СН1 содержит мутацию, выбранную из группы, состоящей из Q39E, G44E и S183E согласно нумерации EU; б) домен VH2 или второй домен СН1 содержит мутацию, выбранную из группы, состоящей из Q39K, G44K и S183K согласно нумерации EU; в) домен VL1 или первый домен CL содержит мутацию, выбранную из группы, состоящей из Q38K, G100K и S176K согласно нумерации EU; и д) домен VL2 или второй домен CL содержит мутацию, выбранную из группы, состоящей из Q38E, G100E и S176E согласно нумерации EU.

В некоторых вариантах реализации изобретения: а) первый домен СН1 содержит мутацию S183E согласно нумерации EU; б) второй домен СН1 содержит мутацию S183K согласно нумерации EU; в) первый домен CL содержит мутацию S176K согласно нумерации EU; и д) второй домен CL содержит мутацию S176E согласно нумерации EU. В некоторых вариантах реализации изобретения: а) VH1 содержит мутацию Q39E, а первый домен СН1 содержит мутацию S183E согласно нумерации EU; б) VH2 содержит мутацию Q39K, а второй домен СН1 содержит мутацию S183K согласно нумерации EU; в) VL1 содержит мутацию Q38K, а первый домен CL содержит мутацию S176K согласно нумерации EU; и д) VL2 содержит мутацию Q38E, а второй домен CL содержит мутацию S176E согласно нумерации EU.

В некоторых вариантах реализации изобретения:

- а) первый домен СН1 содержит мутации G44E и S183E согласно нумерации EU;
- б) второй домен СН1 содержит мутации G44K и S183K согласно нумерации EU;
- в) первый домен CL содержит мутации G100K и S176K согласно нумерации EU; и
- д) второй домен CL содержит мутации G100E и S176E согласно нумерации EU.

В одном варианте реализации данное изобретение относится к биспецифическому, четырехвалентному антигенсвязывающему белку, содержащему:

а) первый полипептид, содержащий первую тяжелую цепь первого антитела, которая содержит первый вариабельный участок тяжелой цепи (VH1) и первый домен СН1, причем первое антитело специфически связывается с первым антигеном и, при этом, первая тяжелая цепь слита на своем С-конце с N-концом полипептида, содержащего второй вариабельный участок тяжелой цепи второго антитела (VH2), притом, что VH2 слит на своем С-конце с N-концом второго домена СН1, причем второе антитело специфически связывается со вторым антигеном; и, при этом:

i) VH1 или первый домен СН1 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену для введения заряженной аминокислоты в положении остатка, выбранном из группы, состоящей из положений 39, 44 и 183 согласно нумерации EU; и

ii) VH2 или второй домен СН1 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену для введе-

ния заряженной аминокислоты в положении остатка, выбранном из группы, состоящей из остатка, который соответствует положениям 39, 44 и 183 согласно нумерации EU, притом, что заряд противоположен заряду замененного остатка VH1 или первого CH1 первой тяжелой цепи; и

b) второй полипептид содержит первую легкую цепь первого антитела из а), причем первая легкая цепь содержит первый вариабельный участок легкой цепи (VL1) и первый участок CL; и,

при этом, VL1 или первый домен CL содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену для введения заряженной аминокислоты в положении остатка, выбранном из группы, состоящей из положений 38, 100 и 176 согласно нумерации EU, притом, что

заряд в положении 38 противоположен заряду замененного остатка VH1 или первого CH1 первой тяжелой цепи в положении 39;

заряд в положении 100 противоположен заряду замененного остатка VH1 или первого CH1 первой тяжелой цепи в положении 44;

заряд в положении 176 противоположен заряду замененного остатка VH1 или первого CH1 первой тяжелой цепи в положении 183; и

c) третий полипептид, содержащий вторую легкую цепь второго антитела из а), причем вторая легкая цепь содержит второй вариабельный участок легкой цепи (VL2) и второй участок CL; и, при этом, VL2 или второй домен CL содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену для введения заряженной аминокислоты в положении остатка, выбранном из группы, состоящей из положений 38, 100 и 176, согласно нумерации EU, притом, что

заряд в положении 38 противоположен заряду замененного остатка VH2 или второго CH1 второй тяжелой цепи в положении 39;

заряд в положении 100 противоположен заряду замененного остатка VH2 или второго CH1 второй тяжелой цепи в положении 44;

заряд в положении 176 противоположен заряду замененного остатка VH2 или второго CH1 второй тяжелой цепи в положении 183.

В объеме данного изобретения первый антиген в подпункте а) выше может быть одним из TL1A и TNF- $\alpha$ , а второй антиген может быть другим из них. Другой способ заявить эту же специфичность связывания состоит в том, чтобы сказать, что первое антитело в подпункте а) содержит одну из единицы, связывающейся с TL1A, или единицы, связывающейся с TNF- $\alpha$ , а второе антитело содержит другую из них.

В некоторых вариантах реализации изобретения:

a) VH1 содержит мутацию Q39E, а первый домен CH1 содержит мутацию S183K согласно нумерации EU;

b) VH2 содержит мутацию Q39K, а второй домен CH1 содержит мутацию S183E согласно нумерации EU;

c) VL1 содержит мутацию Q38K, а первый домен CL содержит мутацию S176E согласно нумерации EU; и

d) VL2 содержит мутацию Q38E, а второй домен CL содержит мутацию S176K согласно нумерации EU.

В некоторых вариантах реализации изобретения:

a) первый домен CH1 содержит мутации G44E и S183K согласно нумерации EU;

b) второй домен CH1 содержит мутации G44K и S183E согласно нумерации EU;

c) первый домен CL содержит мутации G100K и S176E согласно нумерации EU; и

d) второй домен CL содержит мутации G100E и S176K согласно нумерации EU.

В некоторых вариантах реализации изобретения:

a) VH1 содержит мутацию Q39K, а первый домен CH1 содержит мутацию S183E согласно нумерации EU;

b) VH2 содержит мутацию Q39E, а второй домен CH1 содержит мутацию S183K согласно нумерации EU;

c) VL1 содержит мутацию Q38E, а первый домен CL содержит мутацию S176K согласно нумерации EU; и

d) VL2 содержит мутацию Q38K, а второй домен CL содержит мутацию S176E согласно нумерации EU.

В некоторых вариантах реализации изобретения:

a) первый домен CH1 содержит мутации G44K и S183E согласно нумерации EU;

b) второй домен CH1 содержит мутации G44E и S183K согласно нумерации EU;

c) первый домен CL содержит мутации G100E и S176K согласно нумерации EU; и

d) второй домен CL содержит мутации G100K и

S176E согласно нумерации EU.

В одном варианте реализации данное изобретение относится к способу получения биспецифического, четырехвалентного антигенсвязывающего белка, включающему в себя:

1) совместную экспрессию в клетке-хозяине:

а) первого полинуклеотида, причем первый полинуклеотид кодирует первый полипептид, содержащий первую тяжелую цепь первого антитела, которая содержит первый переменный участок тяжелой цепи (VH1) и первый домен CH1, и, при этом, первое антитело специфически связывается с первым антигеном, притом, что первая тяжелая цепь слита на своем С-конце с N-концом полипептида, содержащего второй переменный участок тяжелой цепи второго антитела (VH2), причем VH2 слит на своем С-конце с N-концом второго домена CH1, и, при этом, второе антитело специфически связывается со вторым антигеном; притом, что:

i) VH1 или первый домен CH1 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену для введения положительно заряженной аминокислоты в положении остатка, выбранном из группы, состоящей из положений 39, 44 и 183 согласно нумерации EU; и

ii) VH2 или второй домен CH1 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену для введения отрицательно заряженной аминокислоты в положении остатка, выбранном из группы, состоящей из остатка, который соответствует положениям 39, 44 и 183 согласно нумерации EU; и

б) второго полинуклеотида, причем второй полинуклеотид кодирует второй полипептид, содержащий легкую цепь первого антитела из а), и при этом, легкая цепь содержит первый переменный участок легкой цепи (VL1) и первый участок CL;

притом, что VL1 или первый домен CL содержат по меньшей мере одну аминокислотную замену для введения отрицательно заряженной аминокислоты в положении остатка, выбранном из группы, состоящей из положений 38, 100 и 176 согласно нумерации EU;

с) третьего полинуклеотида, причем третий полинуклеотид кодирует третий полипептид, содержащий легкую цепь второго антитела из а), и, при этом, легкая цепь содержит второй переменный участок легкой цепи (VL2) и второй участок CL; притом, что домен VL1 или первый домен CL содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену для введения положительно заряженной аминокислоты в положении остатка, выбранном из группы, состоящей из положений 38, 100 и 176 согласно нумерации EU;

2) культивирование клетки-хозяина в условиях, при которых образуются полипептиды; и

3) выделение антигенсвязывающего белка из клетки-хозяина.

В рамках данного изобретения первый антиген в подпункте а) выше может быть одним из TL1A и TNF- $\alpha$ , а второй антиген может быть другим из них. Другой способ заявить эту же специфичность связывания состоит в том, чтобы сказать, что первое антитело согласно подпункту а) содержит одну из единицы, связывающейся с TL1A, или единицы, связывающейся с TNF- $\alpha$ , а второе антитело содержит другую из них.

В одном варианте реализации данное изобретение относится к способу получения биспецифического, четырехвалентного антигенсвязывающего белка, включающему в себя:

1) совместную экспрессию в клетке-хозяине:

а) первого полинуклеотида, причем первый полинуклеотид кодирует первый полипептид, содержащий первую тяжелую цепь первого антитела, которая содержит первый переменный участок тяжелой цепи (VH1) и первый домен CH1, и, при этом, первое антитело специфически связывается с первым антигеном, притом, что первая тяжелая цепь слита на своем С-конце с N-концом полипептида, содержащего второй переменный участок тяжелой цепи второго антитела (VH2), причем VH2 слит на своем С-конце с N-концом второго домена CH1, и, при этом, второе антитело специфически связывается со вторым антигеном; притом, что:

i) VH1 или первый домен CH1 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену для введения отрицательно заряженной аминокислоты в положении остатка, выбранном из группы, состоящей из положений 39, 44 и 183 согласно нумерации EU; и

ii) VH2 или второй домен CH1 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену для введения положительно заряженной аминокислоты в положении остатка, выбранном из группы, состоящей из остатка, который соответствует положениям 39, 44 и 183, согласно нумерации EU; и

б) второго полинуклеотида, причем второй полинуклеотид кодирует второй полипептид, содержащий первую легкую цепь первого антитела из а), и,

при этом, первая легкая цепь содержит первый переменный участок легкой цепи (VL1) и

первый участок CL; притом, что VL1 или первый домен CL содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену для введения положительно заряженной аминокислоты в положении остатка, выбранном из группы, состоящей из положений 38, 100 и 176 согласно нумерации EU; и

с) третьего полинуклеотида, причем третий полинуклеотид кодирует третий полипептид, содержащий вторую легкую цепь второго антитела из а), и, при этом, вторая легкая цепь содержит второй переменный участок легкой цепи (VL2) и второй участок CL; притом, что VL1 или первый домен CL содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену для введения отрицательно заряженной аминокислоты в положении остатка, выбранном из группы, состоящей из положений 38, 100 и 176 согласно нумерации EU;

2) культивирование клетки-хозяина в условиях, при которых образуются полипептиды; и

3) выделение антигенсвязывающего белка из клетки-хозяина.

В рамках данного изобретения первый антиген в подпункте а) выше может быть одним из TL1A и TNF- $\alpha$ , а второй антиген может быть другим из них. Другой способ заявить эту же специфичность связывания состоит в том, чтобы сказать, что первое антитело в подпункте а) содержит одну из единицы, связывающейся с TL1A, или единицы, связывающейся с TNF- $\alpha$ , а второе антитело содержит другую из них.

В одном варианте реализации данное изобретение относится к способу получения биспецифического, четырехвалентного антигенсвязывающего белка, включающему в себя:

1) совместную экспрессию в клетке-хозяине:

а) первого полинуклеотида, причем первый полинуклеотид кодирует первый полипептид, содержащий первую тяжелую цепь первого антитела, которая содержит первый переменный участок тяжелой цепи (VH1) и первый домен CH1, причем первое антитело специфически связывается с первым антигеном, и, при этом, первая тяжелая цепь слита на своем С-конце с N-концом полипептида, содержащего второй переменный участок тяжелой цепи второго антитела (VH2), притом, что VH2 слит на своем С-конце с N-концом второго домена CH1. причем второе антитело специфически связывается со вторым антигеном; где

i) VH1 или первый домен CH1 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену для введения заряженной аминокислоты в положении остатка, выбранном из группы, состоящей из положений 39, 44 и 183 согласно нумерации EU; и

ii) VH2 или второй домен CH1 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену для введения заряженной аминокислоты в положении остатка, выбранном из группы, состоящей из остатка, который соответствует положениям 39, 44 и 183 согласно нумерации EU, причем заряд противоположен заряду замененного остатка VH1 или первого CH1 первой тяжелой цепи; и

б) второго полинуклеотида, причем второй полинуклеотид кодирует второй полипептид, содержащий легкую цепь первого антитела из а), и, при этом, легкая цепь содержит первый переменный участок легкой цепи (VL1) и первый участок CL;

притом, что VL1 или первый домен CL содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену для введения заряженной аминокислоты в положении остатка, выбранный из группы, состоящей из положений 38, 100 и 176 согласно нумерации EU, причем заряд в положении 38 противоположен заряду замененного остатка VH1 или первого CH1 первой тяжелой цепи в положении 39;

заряд в положении 100 противоположен заряду замененного остатка VH1 или первого CH1 первой тяжелой цепи в положении 44; заряд в положении 176 противоположен заряду замененного остатка VH1 или первого CH1 первой тяжелой цепи в положении 183; и

с) третьего полинуклеотида, причем третий полинуклеотид кодирует третий полипептид, содержащий легкую цепь второго антитела из а), и, при этом, легкая цепь содержит второй переменный участок легкой цепи (VL2) и второй участок CL; притом, что VL1 или первый домен CL содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену для введения положительно заряженной аминокислоты в положении остатка, выбранном из группы, состоящей из положений 38, 100 и 176 согласно нумерации EU, причем заряд в положении 38 противоположен заряду замененного остатка VH2 или второго CH1 второй тяжелой цепи в положении 39;

заряд в положении 100 противоположен заряду замененного остатка VH2 или второго CH1 второй тяжелой цепи в положении 44;

заряд в положении 176 противоположен заряду замененного остатка VH2 или второго CH1 второй тяжелой цепи в положении 183;

2) культивирование клетки-хозяина в условиях, при которых образуются полипептиды; и

3) выделение антигенсвязывающего белка из клетки-хозяина.

В рамках данного изобретения первый антиген в подпункте а) выше может быть одним из TL1A и TNF- $\alpha$ , а второй антиген может быть другим из них. Другой способ заявить эту же специфичность связывания состоит в том, чтобы сказать, что первое антитело в подпункте а) содержит одну из единицы, связывающейся с TL1A, или единицы, связывающейся с TNF- $\alpha$ , а второе антитело содержит другую из них.

Дополнительно или в качестве альтернативы, правильное спаривание тяжелой-легкой цепи может быть облегчено путем замены доменов CH1 и CL в карбокси-концевой связывающем домене Fab. В качестве примера, первый полипептид, который слит с карбоксильным концом тяжелой цепи, может содержать домен VL и домен CH1 из второго антитела, а второй полипептид может содержать домен VH и домен CL из второго антитела. В другом варианте реализации изобретения первый полипептид, который слит с карбоксильным концом тяжелой цепи, может содержать домен VH и домен CL из второго антитела, а второй полипептид может содержать домен VL и домен CH1 из второго антитела.

Константные участки тяжелой цепи или участки Fc биспецифических антигенсвязывающих белков, описанные в данном документе, могут содержать одну или большее количество аминокислотных замен, которые влияют на гликозилирование и/или эффекторную функцию антигенсвязывающего белка. Одна

из функций участка Fc иммуноглобулина заключается в том, чтобы сообщать иммунной системе, когда иммуноглобулин связывается со своей мишенью. Это обычно называют "эффекторной функцией". Коммуникация приводит к антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ), антителозависимому клеточному фагоцитозу (АЗКФ) и/или комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ). АЗКЦ и АЗКФ опосредуются связыванием участка Fc с рецепторами Fc на поверхности клеток иммунной системы. КЗЦ опосредуется связыванием Fc с белками системы комплемента, например, C1q. В некоторых вариантах реализации изобретения биспецифические антигенсвязывающие белки по изобретению содержат одну или большее количество аминокислотных замен в константном участке для повышения эффекторной функции, включая активность АЗКЦ, активность КЗЦ, активность АЗКФ, и/или клиренс или увеличения периода полувыведения антигенсвязывающего белка. Типичные аминокислотные замены (нумерация EU), которые могут усиливать эффекторную функцию, включают, но не ограничиваясь этим,

E233L, L234I, L234Y, L235S,

G236A, S239D, F243L, F243V, P247I, D280H, K290S, K290E, K290N, K290Y, R292P, E294L, Y296W, S298A, S298D, S298V, S298G, S298T, T299A, Y300L, V305I, Q311M, K326A, K326E, K326W, A330S, A330L, A330M, A330F, I332E, D333A, E333S, E333A, K334A, K334V, A339D, A339Q, P396L

или комбинации любого из вышеперечисленных.

В других вариантах реализации изобретения биспецифические антигенсвязывающие белки по изобретению содержат одну или большее количество аминокислотных замен в константном участке для снижения эффекторной функции. Типичные аминокислотные замены (нумерация EU), которые могут снижать эффекторную функцию, включают, но не ограничиваясь этим,

C220S, C226S, C229S, E233P, L234A,

L234V, V234A, L234F, L235A, L235E, G237A, P238S, S267E, H268Q, N297A, N297G, V309L,

E318A, L328F, A330S, A331S, P331S

или комбинации любого из вышеперечисленных. Типичные замены для обеспечения правильной сборки молекул гетеро Ig изображены на фиг. 1. Предпочтительные замены для формата гетеро Ig изображены в (v2) на фиг. 1 и приведены в табл. N. Все положения в табл. N соответствуют нумерации EU.

Таблица N

Мутации в молекулах гетеро Ig

Цепь	Домен	Мутация	№ EU
Легкая цепь 1	Вариабельный	E	38
	Константный	E	176
Легкая цепь 2	Вариабельный	K	38
	Константный	K	176
Тяжелая цепь 1	Вариабельный	K	39
	CH1	K	183
	CH3	D	392
	CH3	D	409
Тяжелая цепь 2	Вариабельный	E	39
	CH1	E	183
	CH3	K	356
	CH3	K	399

Предпочтительные заряженные аминокислоты для формата IgG-Fab, а также обмены доменов CH/CL, как описано в данном документе для фиг. 26, представлены в табл. O. "Fab 1" и "Fab 2" в табл. O являются такими, как изображено на фиг. 25 и 26. Fab 1 находится на N-конце молекулы IgG-Fab, а Fab 2 находится на ее C-конце. Идентичность и положение заряженных аминокислот в Fab отображаются справа от домена, приведенного в табл. O. Все положения соответствуют нумерации EU.

## Мутации в молекулах IgG-Fab

Обозначение	Домен	Мутация	№ EU	Домен	Мутация	№ EU
СРМv1	Fab 1 CL	Е	230	Fab 2 CL	К	230
	Fab 1 CH1	К	230	Fab 2 CH1	Е	230
Обмен СРМv1 Fab 1	Fab 1 CL	К	230	Fab 2 CL	К	230
	Fab 1 CH1	Е	230	Fab 2 CH1	Е	230
Обмен СРМv1 Fab 2	Fab 1 CL	Е	230	Fab 2 CL	Е	230
	Fab 1 CH1	К	230	Fab 2 CH1	К	230
Обмен СРМv1	Fab 1 CL	К	230	Fab 2 CL	Е	230
	Fab 1 CH1	Е	230	Fab 2 CH1	К	230
Fab 1 и 2						
СРМv2	Fab 1 CL	Е	230	Fab 2 CL	К	230
	Fab 1 CH1	К	230	Fab 2 CH1	Е	230
	Fab 1 VL	Е	46	Fab 2 VL	Е	46
	Fab 1 VH	К	46	Fab 2 VH	К	46
Обмен СРМv2 Fab 1	Fab 1 CL	К	230	Fab 2 CL	К	230
	Fab 1 CH1	Е	230	Fab 2 CH1	Е	230
	Fab 1 VL	Е	46	Fab 2 VL	Е	46
	Fab 1 VH	К	46	Fab 2 VH	К	46
Обмен СРМv2 Fab 2	Fab 1 CL	Е	230	Fab 2 CL	Е	230
	Fab 1 CH1	К	230	Fab 2 CH1	К	230
	Fab 1 VL	Е	46	Fab 2 VL	Е	46
	Fab 1 VH	К	46	Fab 2 VH	К	46
Обмен СРМv2 Fab 1 и 2	Fab 1 CL	К	230	Fab 2 CL	Е	230
	Fab 1 CH1	Е	230	Fab 2 CH1	К	230
	Fab 1 VL	Е	46	Fab 2 VL	Е	46
	Fab 1 VH	К	46	Fab 2 VH	К	46
СРМv3	Fab 1 CL	Е	230	Fab 2 CL	К	230
	Fab 1 CH1	К	230	Fab 2 CH1	Е	230
	Fab 1 VL	Е	141	Fab 2 VL	Е	51
	Fab 1 VH	К	51	Fab 2 VH	К	141
Обмен СРМv3 Fab 1	Fab 1 CL	К	230	Fab 2 CL	К	230
	Fab 1 CH1	Е	230	Fab 2 CH1	Е	230
	Fab 1 VL	Е	141	Fab 2 VL	Е	51
	Fab 1 VH	К	51	Fab 2 VH	К	141
Обмен СРМv3 Fab 2	Fab 1 CL	Е	230	Fab 2 CL	Е	230
	Fab 1 CH1	К	230	Fab 2 CH1	К	230
	Fab 1 VL	Е	141	Fab 2 VL	Е	51
	Fab 1 VH	К	51	Fab 2 VH	К	141
Обмен СРМv3 Fab 1 и 2	Fab 1 CL	К	230	Fab 2 CL	Е	230
	Fab 1 CH1	Е	230	Fab 2 CH1	К	230
	Fab 1 VL	Е	141	Fab 2 VL	Е	51
	Fab 1 VH	К	51	Fab 2 VH	К	141

Аффинность связывания и биологическая активность.

В другом варианте реализации вышеописанных аспектов изобретения анти-TL1A-антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент) или единица, связывающаяся с TL1A, биспецифического антигенсвязывающего белка гетеро Ig или антигенсвязывающего белка IgG-scFv связывается с TL1A с аффинностью

связывания ( $K_{D1}$ ) по меньшей мере  $1 \times 10^{-10} \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $5 \times 10^{-10} \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $1 \times 10^{-10} \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $5 \times 10^{-10} \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $8 \times 10^{-10} \text{ M}^{-1}$  или по меньшей мере  $1 \times 10^{-10} \text{ M}^{-1}$ , причем аффинность связывания измеряют методом поверхностного плазмонного резонанса, таким как Biacore. Более конкретно, изобретение относится к следующим вариантам реализации изобретения:

антитело против TL1A (или его антигенсвязывающий фрагмент) связывается с TL1A человека, притом, что антитело иммобилизовано на сенсорном чипе SCM5, с аффинностью связывания  $K_D$  от около 1 до около 5 пМ, или с TL1A яванского макака, притом, что антитело иммобилизовано на сенсорном чипе SCM5, с аффинностью связывания  $K_D$  от около  $1^{-10}$  до около  $7,5^{-10} \text{ M}^{-1}$ ;

единица, связывающаяся с TNF- $\alpha$ , биспецифического антигенсвязывающего белка гетеро Ig связывается с TNF- $\alpha$  человека, притом, что антигенсвязывающий белок иммобилизован на сенсорном чипе SCM5, с аффинностью связывания  $K_D$  от около  $1^{-10}$  до  $5^{-10} \text{ M}^{-1}$  пМ, предпочтительно от около 10 до около 12 пМ;

единица, связывающаяся с TL1A, биспецифического антигенсвязывающего белка гетеро Ig связывается с TL1A человека, притом, что антигенсвязывающий белок иммобилизован на сенсорном чипе SCM5, с аффинностью связывания  $K_D$  от около  $2^{-10}$  до  $6,5^{-10} \text{ M}^{-1}$ , предпочтительно от около 10 до около 11 пМ;

единица, связывающаяся с TNF- $\alpha$ , биспецифического антигенсвязывающего белка IgG-scFv связывается с TNF- $\alpha$  человека, притом, что антигенсвязывающий белок иммобилизован на сенсорном чипе SCM5, с аффинностью связывания  $K_D$  от около  $4,5^{-10}$  до около  $7,5^{-10} \text{ M}^{-1}$ , предпочтительно от около 10 до около 20 пМ; и

единица, связывающаяся с TL1A, биспецифического антигенсвязывающего белка IgG-scFv связывается с TL1A человека, притом, что антигенсвязывающий белок иммобилизован на сенсорном чипе SCM5, с аффинностью связывания  $K_D$  от около 1,5 до около 160 пМ.

Более подробная информация о связывании с TL1A и TNF- $\alpha$  представлена в примерах 13 и 15 ниже.

В другом варианте реализации вышеописанных аспектов единица, связывающаяся с TNF- $\alpha$ , биспецифического антигенсвязывающего белка IgG-Fab связывается с тримером TNF- $\alpha$  с аффинностью связывания ( $K_{D1}$ )  $1 \times 10^{-10} \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $5 \times 10^{-10} \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $1 \times 10^{-10} \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $5 \times 10^{-10} \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $8 \times 10^{-10} \text{ M}^{-1}$  или по меньшей мере  $1 \times 10^{-10} \text{ M}^{-1}$ , причем аффинность связывания измеряют методом поверхностного плазмонного резонанса, таким как Biacore.

В других вариантах реализации вышеописанных аспектов изобретения:

антитело против TL1A (или его антигенсвязывающий фрагмент) нейтрализует или ингибирует TL1A человека в репортерной клеточной линии TF-1 NF- $\kappa$ B с  $IC_{50}$  от около 0,08 до 3 нМ, с TL1A яванского макака в репортерной клеточной линии TF-1 NF- $\kappa$ B с  $IC_{50}$  от около 0,375 до около 10 нМ;

TNF-связывающая единица биспецифического антигенсвязывающего белка гетеро Ig нейтрализует или ингибирует человеческий TNF- $\alpha$  в репортерной клеточной линии TF-1 NF- $\kappa$ B с  $IC_{50}$  от около 50 до 550 пМ, предпочтительно от около 50 до 110 пМ; единица, связывающаяся с TL1A, биспецифического антигенсвязывающего белка гетеро Ig, нейтрализует или ингибирует TL1A человека в репортерной клеточной линии TF-1 NF- $\kappa$ B с  $IC_{50}$  от около 45 до около 3500 пМ, предпочтительно от около 45 до 190 пМ, единица, связывающаяся с TNF- $\alpha$ , биспецифического антигенсвязывающего белка IgG-scFv нейтрализует или ингибирует растворимый TNF- $\alpha$  человека в репортерной клеточной линии TF-1 NF- $\kappa$ B с  $IC_{50}$  от около 20 до около 75 пМ; и

единица, связывающаяся с TL1A, биспецифического связывающего белка IgG-scFv нейтрализует или ингибирует TL1A человека в репортерной клеточной линии TF-1 NF- $\kappa$ B с  $IC_{50}$  от около 19 до 200 пМ.

Более подробная информация об ингибировании TL1A и ингибировании TNF- $\alpha$  представлена в примерах 14 и 16 ниже. Иммуноконъюгаты, производные, варианты.

Антитела и биспецифические антитела по изобретению можно применять отдельно или в виде иммуноконъюгатов с терапевтическим агентом (например, цитотоксический агент). В некоторых вариантах реализации изобретения агент представляет собой химиотерапевтический агент. В некоторых вариантах реализации изобретения агент представляет собой радиоизотоп, включая, но не ограничиваясь этим, свинец-212, висмут-212, астатин-211, йод-131, скандий-47, рений-186, рений-188, иттрий-90, йод-123, йод-125, бром-77, индий-111 и делящиеся нуклиды, такие как бор-10 или актинид. В других вариантах реализации изобретения агент представляет собой токсин или цитотоксическое лекарственное средство, включая, но не ограничиваясь этим, рицин, абрин, модифицированный энтеротоксин A Pseudomonas, экзотоксин Pseudomonas, калихеамицин, адриамицин, 5-фторурацил, дифтерийный токсин и т.п. Способы конъюгации антител с такими агентами известны из литературы и включают прямую и непрямую конъюгацию.

Подходящие обнаружимые молекулы могут быть прямо или непрямо присоединены к антителам и биспецифическим антителам по данному изобретению. Подходящие обнаружимые молекулы включают радионуклиды, ферменты, субстраты, кофакторы, ингибиторы, флуоресцентные маркеры, хемилюминесцентные маркеры, магнитные частицы и т.п. Для непрямого присоединения обнаружимой или цитоток-

сической молекулы, обнаруживаемая или цитотоксическая молекула может быть конъюгирована с элементом комплементарной/анти-комплементарной пары, в которой другой элемент соединен со связывающим полипептидом или частью антитела. Типичной комплементарной/анти-комплементарной парой для этих целей является биотин/стрептавидин.

Биспецифические антитела и антитела по изобретению дополнительно включают производные, которые модифицированы, например, путем ковалентного присоединения любого типа молекулы к антителу, таким образом, что ковалентное присоединение не препятствует связыванию антитела с его эпитопом. Примеры подходящих производных включают, но не ограничиваясь этим, антитела или биспецифические антитела, которые являются фукозилированными, гликозилированными, ацетилированными, пэгиллированными, фосфорилированными или амидированными. Антитела и биспецифические антитела и их производные по изобретению могут сами по себе быть дериватизированы известными защитными/блокирующими группами, протеолитическим расщеплением, связыванием с клеточным лигандом или другими белками и т.п. В некоторых вариантах реализации изобретения по меньшей мере одна тяжелая цепь антитела или биспецифического антигенсвязывающего белка ПЭГилирована. В некоторых вариантах реализации изобретения ПЭГилирование осуществляется путем N-присоединения или присоединения через боковую цепь аминокислоты (например, лизина). Гликозилирование может способствовать эффекторной функции антител, в частности антител IgG1. Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения антигенсвязывающие белки по изобретению могут содержать одну или большее количество аминокислотных замен, которые влияют на уровень или тип гликозилирования связывающих белков. Гликозилирование полипептидов обычно является N-связанным или O-связанным. N-связанное относится к присоединению углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагинового остатка. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X представляет собой любую аминокислоту, кроме пролина, являются последовательностями распознавания для ферментативного присоединения углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагина. Таким образом, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования. O-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксиллозы к гидроксиаминокислоте, чаще всего к серину или треонину, хотя также можно применять 5-гидроксипролин или 5-гидроксиллизин.

В некоторых вариантах реализации изобретения степень гликозилирования антигенсвязывающих белков, описанных в данном документе, повышают путем добавления одного или большего количества сайтов гликозилирования, например, на участке Fc связывающего белка. Добавление сайтов гликозилирования к антигенсвязывающему белку может быть с удобством осуществлено путем модификации аминокислотной последовательности таким образом, чтобы она содержала одну или большее количество описанных выше трипептидных последовательностей (для сайтов N-связанного гликозилирования). Кроме того, модификация может быть осуществлена путем добавления или введения посредством замены одного или большего количества остатков серина или треонина в исходную последовательность (для сайтов O-связанного гликозилирования). Для удобства, аминокислотная последовательность антигенсвязывающего белка может быть модифицирована посредством изменений на уровне ДНК, в частности, путем мутации ДНК, кодирующей целевой полипептид, в положении заранее выбранных оснований, таким образом, что генерируются кодоны, которые будут трансформироваться в желаемые аминокислоты.

Изобретение дополнительно включает получение антигенсвязывающих белков с модифицированной углеводной структурой, что дает модифицированную эффекторную активность, включая антигенсвязывающие белки без фукозилирования или с уменьшенным фукозилированием, которые проявляют улучшенную активность АЗКЦ. В данной области техники известны различные способы уменьшения или исключения фукозилирования. Например, эффекторная активность АЗКЦ опосредуется связыванием молекулы антитела с рецептором FcγRIII, который, как было показано, зависит от углеводной структуры N-связанного гликозилирования у остатка N297 домена CH2. Нефукозилированные антитела связываются с этим рецептором с повышенной аффинностью и запускают эффекторные функции, опосредуемые FcγRIII, более эффективно, чем нативные, фукозилированные антитела. Например, рекомбинантное продуцирование нефукозилированного антитела в клетках CHO с нокаутом фермента альфа-1,6-фукозилтрансферазы дает антитело со 100-кратным увеличением активности АЗКЦ (см. Yamane-Ohnuki et al., *Biotechnol Bioeng.* 87(5): 614-22, 2004). Подобные эффекты могут быть достигнуты за счет снижения активности фермента альфа-1,6-фукозилтрансферазы или других ферментов в пути фукозилирования, например, посредством обработки мРНК или антисмысловой РНК сконструированных клеточных линий для нокаута фермента(-ов) или культивирования с селективными ингибиторами гликозилирования (см. Rothman et al., *Mol Immunol.* 26(12): 1113-23, 1989). Некоторые штаммы клеток-хозяев, например, Lec 13 или клеточная линия гибридомы крыс YB2/0 естественным образом продуцируют антитела с более низкими уровнями фукозилирования (см. Shields et al., *J Biol Chem.* 277(30): 26733-40, 2002, и Shinkawa et al., *J Biol Chem.* 278(5): 3466-73, 2003). Кроме того, было определено, что повышение уровня разделенных углеводов, например, посредством рекомбинантного продуцирования антитела в клетках, которые сверхэкспрессируют фермент GnTIII, увеличивает активность АЗКЦ (см. Umana et al., *Nat Bio-*

technol. 17(2):176-80, 1999).

В других вариантах реализации изобретения гликозилирование антигенсвязывающих белков, описанных в данном документе, уменьшают или исключают путем удаления одного или большего количества сайтов гликозилирования, например, на участке Fc связывающего белка. Аминокислотные замены, которые исключают или модифицируют N-связанные сайты гликозилирования, могут уменьшать или исключать N-связанное гликозилирование антигенсвязывающего белка. В некоторых вариантах реализации изобретения описанные в данном документе биспецифические антигенсвязывающие белки содержат мутацию в положении N297 (нумерация EU), такую как N297Q, N297A или N297G. В одном конкретном варианте реализации изобретения биспецифические антигенсвязывающие белки по изобретению содержат участок Fc из антитела IgG1 человека с мутацией N297G. Для улучшения стабильности молекул, содержащих мутацию N297, участок Fc таких молекул может быть дополнительно модифицирован. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения одна или большее количество аминокислот на участке Fc заменены цистеином в целях содействия образованию дисульфидной связи в димерном состоянии. Таким образом, остатки, соответствующие V259, A287, R292, V302, L306, V323 или I332 (нумерация EU) участка Fc IgG1, могут быть заменены цистеином. В одном варианте реализации изобретения конкретные пары остатков заменены цистеином таким образом, что они предпочтительно образуют дисульфидную связь друг с другом, таким образом ограничивая или предотвращая запутывание дисульфидных связей. В некоторых вариантах реализации изобретения пары включают, но не ограничиваясь этим, A287C и L306C, V259C и L306C, R292C и V302C и V323C и I332C. В конкретных вариантах реализации изобретения биспецифические антигенсвязывающие белки, описанные в данном документе, содержат участок Fc из антитела IgG1 человека с мутациями в положениях R292C и V302C. В таких вариантах реализации изобретения участок Fc может дополнительно содержать мутацию N297G.

Кроме того, могут быть желательными модификации антигенсвязывающих белков по изобретению в целях увеличения периода полувыведения из сыворотки, например, путем введения или добавления эпитопа, связывающегося с рецептором реутилизации (например, путем мутации соответствующего участка или путем введения эпитопа в пептидную метку, для которой в дальнейшем осуществляют слияние с антигенсвязывающим белком на любом конце или в середине, например, путем синтеза ДНК или пептида, см., например, WO96/32478) или добавления молекул, таких как ПЭГ или другие водорастворимые полимеры, включая полисахаридные полимеры. Эпитоп связывания с рецептором реутилизации предпочтительно представляет собой участок, где любые один или большее количество аминокислотных остатков из одной или двух петель участка Fc переносят в аналогичное положение антигенсвязывающего белка. В одном варианте реализации изобретения переносят три или большее количество остатков из одной или двух петель участка Fc. В одном варианте реализации изобретения эпитоп взят из домена CH2 участка Fc (например, участок Fc IgG) и перенесен на участок CH1, CH3 или VH или более чем один такой участок антигенсвязывающего белка. В качестве альтернативы, эпитоп взят из домена CH2 участка Fc и перенесен на участок CL или участок VL или оба участка антигенсвязывающего белка. Описание вариантов Fc и их взаимодействия с рецептором реутилизации см. в Международных заявках WO 97/34631 и WO 96/32478.

Биспецифические антитела и антитела по изобретению включают варианты, содержащие одну или большее количество аминокислотных замен, делеций, добавлений или замещений, которые сохраняют их биологические свойства (например, блокирование связывания TL1A и/или TNF- $\alpha$  с их соответствующими рецепторами, ингибирование биологической активности TL1A и TNF- $\alpha$ ). Специалист в данной области техники сможет создать варианты, содержащие одну или большее количество аминокислотных замен, делеций, добавок или замещений. Такие варианты могут включать, среди прочего: (a) варианты, в которых один или большее количество аминокислотных остатков заменены консервативными или неконсервативными аминокислотами, (b) варианты, в которых один или большее количество аминокислот добавлены или удалены из полипептида, (c) варианты, в которых одна или большее количество аминокислот содержат группу заместителя, и (d) варианты, в которых полипептид слит с другим пептидом или полипептидом, таким как партнер по слиянию, белковая метка или другой химический фрагмент, который может обеспечивать полипептиду полезные свойства, такие как, например, эпитоп для антитела, полигистидиновая последовательность, биотиновый фрагмент и т.п. Антитела и биспецифические антитела по изобретению могут включать варианты, в которых аминокислотные остатки от одного вида заменены соответствующим остатком другого вида, в консервативных или неконсервативных положениях. В другом варианте реализации изобретения аминокислотные остатки в неконсервативных положениях заменены консервативными или неконсервативными остатками. Методы получения таких вариантов, включая генетические (подавление, делеции, мутации и т.д.), химические и ферментативные методы, известны обычному специалисту в данной области техники.

Нуклеиновые кислоты, векторы, клетки-хозяева.

Изобретение дополнительно включает выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие биспецифические антитела по изобретению, что включает в себя, например, легкую цепь, вариабельный участок легкой цепи, константный участок легкой цепи, тяжелую цепь, вариабельный участок тяжелой цепи,

константный участок тяжелой цепи, линкеры и любые и все компоненты и их комбинации для биспецифических антител, описанных в данном документе. Нуклеиновые кислоты по изобретению включают нуклеиновые кислоты, обладающий гомологией по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере около 90%, более предпочтительно по меньшей мере около 95% и наиболее предпочтительно по меньшей мере около 98% с нуклеиновыми кислотами по изобретению. Термины "процент сходства", "процент идентичности" и "процент гомологии" при ссылке на конкретную последовательность используются, как указано в программном обеспечении GCG® Университета Висконсина. Кроме того, нуклеиновые кислоты по изобретению включают комплементарные нуклеиновые кислоты. В некоторых случаях последовательности будут полностью комплементарными (без несоответствий) при выравнивании. В других случаях в последовательностях может присутствовать до 20% несоответствия. В некоторых вариантах реализации изобретения предлагаются нуклеиновые кислоты, кодирующие как тяжелую цепь, так и легкую цепь антитела по изобретению.

Нуклеиновые кислоты по изобретению могут быть клонированы в вектор, такой как плаزمид, космида, бакмида, фаг, искусственная хромосома (BAC, YAC) или вирус, в которые может быть вставлена другая генетическая последовательность или элемент (ДНК или РНК), таким образом, чтобы обеспечить репликацию присоединенной последовательности или элемента. В некоторых вариантах реализации изобретения вектор экспрессии содержит сегмент конститутивно активного промотора (такого как, но не ограничиваясь этим, ЦМВ, SV40, фактор элонгации или последовательность LTR) или последовательность индуцибельного промотора, такого как индуцируемый стероидом вектор pIND (Invitrogen), таким образом, что экспрессию нуклеиновой кислоты можно регулировать. Векторы экспрессии по изобретению могут дополнительно содержать регуляторные последовательности, например, внутренний сайт входа рибосомы. Например, вектор экспрессии можно ввести в клетку путем трансфекции.

В случае биспецифических антигенсвязывающих белков IgG-Fab нуклеиновые кислоты, кодирующие каждый из трех компонентов, могут быть клонированы в один и тот же вектор экспрессии. В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновую кислоту, кодирующую легкую цепь молекулы IgG-Fab, и нуклеиновую кислоту, кодирующую второй полипептид (который содержит другую половину С-концевого домена Fab), клонируют в один вектор экспрессии, тогда как нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированную тяжелую цепь (гибридный белок, содержащий тяжелую цепь и половину домена Fab) клонируют во второй вектор экспрессии. В некоторых вариантах реализации изобретения все компоненты биспецифических антигенсвязывающих белков, описанных в данном документе, экспрессируются из одной и той же популяции клеток-хозяев. Например, даже если один или большее количество компонентов клонированы в отдельный вектор экспрессии, клетку-хозяин совместно трансфицируют обоими векторами экспрессии, таким образом, что одна клетка продуцирует все компоненты биспецифических антигенсвязывающих белков. В другом варианте реализации данное изобретение относится к вектору экспрессии, содержащему следующие функционально связанные элементы; промотор транскрипции; первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую цепь биспецифического антигенсвязывающего белка, антитела или антигенсвязывающего фрагмента по изобретению; вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую легкую цепь биспецифического антигенсвязывающего белка, антитела или антигенсвязывающего фрагмента по изобретению; и терминатор транскрипции. В другом варианте реализации данное изобретение относится к вектору экспрессии, содержащему следующие функционально связанные элементы; первый промотор транскрипции; первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую цепь биспецифического антигенсвязывающего белка, антитела или антигенсвязывающего фрагмента по изобретению; первый терминатор транскрипции; второй промотор транскрипции; вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую легкую цепь биспецифического антигенсвязывающего белка, антитела или антигенсвязывающего фрагмента по изобретению; и второй терминатор транскрипции.

Кроме того, последовательность секреторного сигнального пептида при желании может необязательно кодироваться вектором экспрессии, функционально связанным с представляющей интерес кодирующей последовательностью, таким образом, что экспрессируемый полипептид может секретироваться рекомбинантной клеткой-хозяином для более легкого выделения представляющего интерес полипептида из клетки. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения последовательности сигнальных пептидов могут быть присоединены/слиты с аминоконцом любой из полипептидных последовательностей, перечисленных в табл. E, J, K и L. В некоторых вариантах реализации изобретения сигнальный пептид, имеющий аминокислотную последовательность MKHLWFFLLLVAAPRWLS (SEQ ID NO: 499) слит с аминоконцом любой из полипептидных последовательностей из табл. D, I, J и K. В других вариантах реализации изобретения сигнальный пептид, имеющий аминокислотную последовательность METPAQLLFLLLLWLPDTTG (SEQ ID NO: 501) слит с аминоконцом любой из полипептидных последовательностей из табл. E, J, K и L. В других вариантах реализации изобретения сигнальный пептид, имеющий аминокислотную последовательность MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC (SEQ ID NO: 503) слит с аминоконцом любой из полипептидных последовательностей из табл. E, J, K и L. Каждый из вышеперечисленных сигнальных пептидов кодируется нуклеиновой кислотой с последовательностью, непосредственно предшествующей ему в перечне последовательностей. Другие подходящие последова-

тельности сигнальных пептидов, которые могут быть слиты с аминоконцом полипептидных последовательностей, описанных в данном документе, включают в себя:

MEAPAQLLFLLLLWLPDITG (SEQ ID

NO: 504), MEWTWRVFLVAAATGAHS (SEQ ID NO: 505) и MEWSWVFLFVSVTTGVHS

(SEQ ID NO: 506).

Другие сигнальные пептиды известны специалистам в данной области техники и могут быть слиты с любой из полипептидных цепей, перечисленных в табл. Е, J, K и L, например, для облегчения или оптимизации экспрессии в конкретных клетках-хозяевах.

Кроме того, предусмотрены рекомбинантные клетки-хозяева, содержащие такие векторы и экспрессирующие тяжелую и легкую цепи.

Клетки, продуцирующие антитела, и клетки, продуцирующие биспецифические антигенсвязывающие белки, содержат, в зависимости от формата биспецифического антигенсвязывающего белка, нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелую цепь, легкую цепь, конструкцию тяжелой цепи-scFv, конструкцию тяжелой цепи-вариабельного домена участку тяжелой цепи Fab и вариабельный домен легкой цепи Fab. Такие нуклеиновые кислоты можно применять для получения антител или биспецифических антител по изобретению в соответствии с методами, известными в данной области техники. Данное изобретение в одном варианте реализации относится к способу получения биспецифического антигенсвязывающего белка или антитела, включающему в себя культивирование рекомбинантной клетки-хозяина, экспрессирующей тяжелую и легкую цепи или другие конструкции, отмеченные выше, и выделение биспецифического антигенсвязывающего белка или антитела, продуцируемого клеткой. Рекомбинантная клетка-хозяин может быть прокариотической клеткой, например, клеткой *E. coli*, или эукариотической клеткой, например, клеткой млекопитающего или дрожжевой клеткой. Дрожжевые клетки включают в себя клетки *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* и *Pichia pastoris*. Клетки млекопитающих включают в себя клетки VERO, HeLa, яичника китайского хомяка (CHO), W138, почки детеныша хомяка (BHK), COS-7, MDCK, линию 293 эмбриональных клеток почки человека, линии нормальных клеток почки собаки, линии нормальных клеток почки кошки, клетки почки обезьяны, клетки почек африканской зеленой обезьяны, клетки COS и нетуморигенные клетки мышинных миобластов G8, линии клеток фибробластов, линии клеток миеломы, мышинные клетки NIH/3T3, клетки LMTK31, клетки Сертоли мыши, клетки цервикальной карциномы человека, клетки печени крыс линии буффало, клетки легкого человека, клетки печени человека, опухолевые клетки молочной железы мыши, клетки TRI, клетки MRC 5 и клетки FS4. Кроме того, клетки, продуцирующие антитела, и клетки, продуцирующие биспецифические антигенсвязывающие белки по изобретению, включают в себя любую известную клеточную линию экспрессии насекомых, такую как, например, клетки *Spodoptera frugiperda*. В предпочтительном варианте реализации изобретения клетки представляют собой клетки млекопитающего. В наиболее предпочтительном варианте реализации изобретения клетки млекопитающего являются клетками CHO.

Клетки, продуцирующие антитела, предпочтительно по существу свободны от конкурентов TL1A и TNF- $\alpha$ . В предпочтительных вариантах реализации изобретения клетки, продуцирующие антитела, содержат менее чем около 10%, предпочтительно менее чем около 5%, более предпочтительно менее чем около 1%, более предпочтительно менее чем около 0,5%, более предпочтительно менее чем около 0,1% и наиболее предпочтительно 0 мас.% связывающих конкурентов TL1A или TNF- $\alpha$ . В некоторых вариантах реализации изобретения продуцируемые антитела и биспецифические антитела по существу свободны от конкурентов TL1A и TNF- $\alpha$ . В предпочтительных вариантах реализации изобретения продуцируемые антитела и биспецифические антитела содержат менее чем около 10%, предпочтительно менее чем около 5%, более предпочтительно менее чем около 1%, более предпочтительно менее чем около 0,5%, более предпочтительно менее чем около 0,1% и наиболее предпочтительно 0 мас.% связывающих конкурентов как TL1A, так и TNF- $\alpha$ .

#### Очистка.

Способы очистки антител известны в данной области техники и могут применяться при получении антител и биспецифических антител по данному изобретению. В некоторых вариантах реализации изобретения способы очистки антител включают в себя фильтрацию, аффинную колоночную хроматографию, катионообменную хроматографию, анионообменную хроматографию и концентрацию. Стадия фильтрации предпочтительно включает в себя ультрафильтрацию и более предпочтительно ультрафильтрацию и диафильтрацию. Фильтрацию предпочтительно проводят по меньшей мере около 5-50 раз, более предпочтительно от 10 до 30 раз и наиболее предпочтительно 14-27 раз. Аффинную колоночную хроматографию можно осуществлять, например, как аффинную хроматографию PROSEP® (Millipore, Биллерика, штат Массачусетс). В предпочтительном варианте реализации изобретения аффинная хроматография включает в себя колоночную хроматографию PROSEP®-vA. Элюат можно промыть растворителем-детергентом. Катионообменная хроматография может включать в себя, например, катионообменную хроматографию SP-Sepharose. Анионообменная хроматография может включать в себя, например, но не ограничиваясь этим, анионный обмен с быстрым потоком Q-Sepharose. Стадия обмена аниона

предпочтительно является не связывающей, что позволяет удалить отходы, включая ДНК и БСА. Продукт в форме антитела предпочтительно подвергают нанофильтрации, например, с применением нанофильтра Pall DV 20. Продукт в форме антитела может быть концентрирован, например, с применением ультрафильтрации и диафильтрации. Способ может дополнительно включать в себя стадию эксклюзионной хроматографии для удаления агрегатов. Другие параметры очистки приводятся в рабочих примерах ниже.

Биспецифические антитела, антитела или антигенсвязывающие фрагменты дополнительно могут быть получены другими способами, известными в данной области техники, например, путем химического сочетания антител и фрагментов антител.

Применение моноспецифических и биспецифических антител по изобретению. Биспецифические антитела и моноспецифические антитела по данному изобретению пригодны, например, для ингибирования провоспалительных цитокинов, таких как  $TL1A$  и  $TNF-\alpha$ . Биспецифические антитела и моноспецифические антитела по изобретению можно применять для лечения воспалительных заболеваний и аутоиммунных заболеваний, таких как воспалительное заболевание кишечника (ВЗК), болезнь Крона (БК), язвенный колит (ЯК), синдром раздраженного кишечника (СРК), синдром мочевого пузыря/интерстициальный цистит, дисфункция мочевого пузыря/кишечника (urinary bowel dysfunction), сепсис, увеит, энцефаломиелит, миастения гравис, синдром Шегрена (СШ), склеродермия, рассеянный склероз (РС), цистофиброз (ЦФ), воспаление при хроническом заболевании почек (ХЗП), псориаз (Псо), псориатический артрит (ПсА), анкилозирующий спондилоартрит (АС), ревматоидный артрит (РА), ювенильный ревматоидный артрит (ЮРА), остеоартрит (ОА), спондилоартропатия, первичный склерозирующий холангит, первичный билиарный цирроз, атеросклероз, спленомегалия, воспаление при хроническом заболевании почек (ХЗП), атопический дерматит (АД), экзематозный дерматит, контактный дерматит, системный склероз, системная красная волчанка (СКВ), волчаночный нефрит (ВН), кожная красная волчанка, аутоиммунный тиреоидит, IgA нефропатия, диабетическая нефропатия, связанный с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (АНЦА) васкулит (ААВ), идиопатический нефротический синдром (липоидный нефроз), фокальный сегментарный гломерулосклероз (ФСГС), нефрогенный системный фиброз (NSF), нефрогенная фиброзирующая дерматопатия, фиброзирующий холестатический гепатит, эозинофильный фасцит (синдром Шульмана), склеромикседема (популярный муциноз), склеродермия, склероатрофический лишай, воспалительное поражение легких, такое как идиопатический легочный фиброз, астма, хроническое обструктивное заболевание легких (ХОЗЛ) гиперчувствительность дыхательных путей, хронический бронхит, аллергическая астма, экзема, инфекция *Helicobacter pylori*, внутрибрюшные спайки и/или абсцессы в результате перитонеального воспаления (например, вследствие инфекции, травмы и т.д.), нефротический синдром, идиопатическая демиелинизирующая полинейропатия, синдром Гийена-Барре, отторжение трансплантата, отторжение аллотрансплантата органа, болезнь "трансплантат против хозяина" (БТПХ) (например, из трансплантата, такого как кровь, костный мозг, почка, поджелудочная железа, печень, ортотопическая печень, легкое, сердце, кишечник, тонкий кишечник, толстый кишечник, тимус, аллогенная стволовая клетка, аллогенная с пониженной интенсивностью, кость, сухожилие, роговица, кожа, клапаны сердца, вены, артерии, кровеносные сосуды, желудок и яичко), нефропатия IgA, диабетическая нефропатия, сахарный диабет, идиопатический нефротический синдром (липоидный нефроз), нефрогенный системный фиброз (НСФ), нефрогенная фиброзная дерматопатия, фиброзный холестатический гепатит, эозинофильный фасцит (синдром Шульмана), склеромикседема (папулезный муциноз), склеродермия, склероатрофический лишай, болезнь Такацуки (или РЕР-синдром), нефротический синдром, РОЕМs-синдром, синдром Кроу-Фукаса, нефротический синдром, антинейтрофильные цитоплазматические антитела, васкулит, гигантоклеточный артериит и вызванное множественной миеломой литическое заболевание костей, индуцированный клеточной стенкой стрептококков (КСС) артрит, гингивит/пародонтит, герпетический стромальный кератит, глютензависимая энтеропатия, рес-теноз, болезнь Кавасаки и иммуно-опосредованные заболевания почек. Кроме того, биспецифические антитела и моноспецифические антитела, описанные в данном документе, можно применять для лечения рака, включая ангиогенез.

В одном варианте реализации изобретение относится к способам лечения одного или большего количества из вышеупомянутых заболеваний и расстройств у млекопитающего, нуждающегося в таком лечении, путем введения терапевтически эффективного количества моноспецифического или биспецифического антигенсвязывающего белка по данному изобретению. В предпочтительном варианте реализации изобретения млекопитающее является человеком. В другом предпочтительном варианте реализации изобретения заболевание или расстройство представляет собой ВЗК, БК или ЯК.

Изобретение дополнительно относится к применению биспецифических и моноспецифических антител по данному изобретению для лечения воспалительных заболеваний, характеризующихся наличием повышенных уровней  $TL1A$  или/(в случае биспецифических антител)  $TNF-\alpha$ , а также для лечения видов рака, характеризующихся наличием повышенных уровней  $TL1A$  и/или  $TNF-\alpha$ .

Соответственно, в одном варианте реализации данное изобретение относится к способу ингибирования одного или большего количества провоспалительных цитокинов, например,  $TL1A$  и  $TNF-\alpha$ , у мле-

копитающего, нуждающегося в таком лечении, причем способ включает в себя введение терапевтически эффективного количества биспецифического или моноспецифического антитела по изобретению млекопитающему, нуждающемуся в таком лечении. В предпочтительном варианте реализации изобретения млекопитающее является человеком. Способ можно применять для лечения расстройства, характеризующегося повышенной экспрессией или активностью TL1A или TNF- $\alpha$ . Моноспецифический или биспецифический антигенсвязывающий белок можно вводить с другим фармацевтическим агентом, в одной готовой форме или по отдельности.

В другом варианте реализации данное изобретение относится к композиции, содержащей моноспецифический или биспецифический антигенсвязывающий белок, как описано в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело, например, биспецифический антигенсвязывающий белок, по изобретению, может быть составлена в соответствии с известными способами получения фармацевтически пригодных композиций, в которых терапевтические антитела объединяют в смеси с фармацевтически приемлемым носителем. Говорят, что композиция содержит "фармацевтически приемлемый носитель", если ее введение может переноситься пациентом-реципиентом. Стерильный, буферизованный фосфатом физиологический раствор является одним из примеров фармацевтически приемлемого носителя. Другие подходящие носители хорошо известны специалистам в данной области техники. См., например, Getman, ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 19<sup>th</sup> Edition, Mack Publishing Company (1995).

Для фармацевтического применения антитело, например, биспецифический антигенсвязывающий белок по данному изобретению, составляют для парентерального, в частности внутривенного или подкожного введения, в соответствии с обычными способами. Внутривенное введение может осуществляться путем инъекции болюса, контролируемого высвобождения, например, с применением мини-насосов или другой подходящей технологии или путем инфузии, обычно на протяжении периода от одного до нескольких часов. В общем, фармацевтические готовые формы будут содержать антитело, например, биспецифический антигенсвязывающий белок, по изобретению, в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем, таким как физиологический раствор, буферизованный физиологический раствор, 5% раствор декстрозы в воде и т.п. Готовые формы могут дополнительно содержать одно или большее количество вспомогательных веществ, консервантов, солубилизаторов, буферных агентов, альбумин для предотвращения потери белка на поверхностях пузырьков и т.д. При применении такой комбинированной терапии антитела, которые включают биспецифические антитела, могут быть объединены в одной готовой форме или могут быть введены в виде отдельных готовых форм. Способы составления готовых форм хорошо известны в данной области техники и раскрыты, например, в Gennaro, ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton Pa. (1990), который включен в данный документ посредством ссылки. Терапевтические дозы обычно находятся в диапазоне от 0,1 до 100 мг/кг массы тела пациента в сутки, предпочтительно 0,5-20 мг/кг в сутки, причем точную дозу определяет клиницист в соответствии с принятыми стандартами, с учетом природы и степени тяжести состояния, подлежащего лечению, показателей пациента и т.д. Определение дозы находится в пределах компетенции обычного специалиста в данной области техники. Чаще всего антитела будут вводиться на протяжении одной недели или менее, часто на протяжении одного-трех дней. Как правило, дозы вводимых антител будут варьироваться в зависимости от таких факторов, как возраст, масса тела, рост, пол, общее состояние здоровья и анамнез пациента. Как правило, желателно вводить реципиенту дозу антител, которая находится в диапазоне от около 1 пг/кг до 10 мг/кг (количество агента/массу тела пациента), хотя более низкая или более высокая доза также может вводиться, если это диктуется обстоятельствами.

Введение антитела, например, биспецифического антигенсвязывающего белка по изобретению, субъекту может осуществляться внутривенной, внутриартериальной, внутрибрюшинной, внутримышечной, подкожной, внутривенной, интратекальной инъекции, путем перфузии через регионарный катетер или путем прямой внутриочаговой инъекции. При введении терапевтических антител путем инъекции введение может осуществляться путем непрерывной инфузии или в виде одного или большего количества болюсов.

Дополнительные способы введения включают пероральный, через слизистую оболочку, легочный и трансдермальный. Пероральное введение подходит для микросфер из полиэстера, микросфер из зеина, протеноидных микросфер, полицианакрилатных микросфер и систем на основе липидов (см., например, DiBase et al., "Oral Delivery of Microencapsulated Proteins", in Sanders et al., eds., Protein Delivery: Physical Systems, pp. 255-288, Plenum Press (1997)). Примером возможности интраназального введения является такой способ введения инсулина (см., например, Hinchcliffe et al., Adv. Drug Deliv. Rev., 35: 199 (1999)). Сухие или жидкие частицы, содержащие антитела по изобретению, могут быть получены и введены ингаляцией с помощью диспергаторов сухого порошка, генераторов жидких аэрозолей или небулайзеров (например, Pettit et al., TIVTECH, 16: 343 (1998); Patton et al., Adv. Drug Deliv. Rev., 35: 235 (1999)). Этот подход иллюстрируется системой управления диабетом AERX®, которая представляет собой ручной электронный ингалятор, доставляющий аэрозольный инсулин в легкие. Исследования показали, что белки размером до 48 000 кДа вводились через кожу в терапевтических концентрациях с помощью низко-

частотного ультразвука, что иллюстрирует возможность трансдермального введения (Mitragotri et al., *Science*, 269:850 (1995)). Трансдермальное введение с помощью электропорации обеспечивает другое средство для введения молекулы, обладающей активностью связывания с IL-17 и TNF- $\alpha$ /p19 (Potts et al., *Pharm. Biotechnol.*, 10:213 (1997)). В целях терапии композиции, содержащие антитело, например, биспецифический антигенсвязывающий белок, по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель, вводят пациенту в терапевтически эффективном количестве. Говорят, что комбинация антитела, например, биспецифического антигенсвязывающего белка, по данному изобретению и фармацевтически приемлемого носителя, вводится в "терапевтически эффективном количестве", если вводимое количество является физиологически значимым. Агент является физиологически значимым, если его присутствие приводит к обнаружимому изменению физиологии пациента-реципиента.

Например, агент, применяемый для лечения воспаления, является физиологически значимым, если его присутствие смягчает воспалительный ответ. Эффективное лечение можно оценивать различными способами. В одном варианте реализации изобретения эффективное лечение определяется по уменьшению воспаления. В других вариантах реализации изобретения эффективное лечение отмечается ингибированием воспаления. В еще других вариантах реализации изобретения эффективная терапия измеряется увеличением благосостояния пациента, включая такие признаки, как увеличение массы тела, восстановление силы, уменьшение боли, прогрессирующее улучшение и субъективные показатели у пациента с лучшим состоянием здоровья. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело, например, биспецифический антигенсвязывающий белок, по изобретению, может быть представлена в жидкой форме, в форме аэрозоля или в твердой форме. Типичными примерами жидких форм являются инъекционные растворы и суспензии для перорального применения. Типичные твердые формы включают капсулы, таблетки и формы с контролируемым высвобождением. Типичным примером последней формы являются миниосмотические насосы и импланты (Bremer et al., *Pharm. Biotechnol.*, 10: 239 (1997); Ranade, "Implants in Drug Delivery", в Ranade et al., eds., *Drug Delivery Systems*, pp. 95-123, CRC Press (1995); Bremer et al., "Protein Delivery with Infusion Pumps", в Sanders et al., eds., *Protein Delivery: Physical Systems*, pp. 239-254, Plenum Press (1997); Yewey et al., "Delivery of Proteins from a Controlled Release Injectable Implant", в Sanders et al., eds., *Protein Delivery: Physical Systems*, pp. 93-117, Plenum Press (1997).

Липосомы обеспечивают одно из средств для введения терапевтических полипептидов субъекту внутривенно, внутрибрюшинно, интратекально, внутримышечно, подкожно или посредством перорального введения, ингаляции или интраназального введения. Липосомы представляют собой микроскопические везикулы, которые состоят из одного или большего количества липидных бислоев, окружающих водные отсеки (в общем см. Bakker-Woudenberg et al., *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 12 (Suppl. 1): 561 (1993), Kim, *Drugs*, 46: 618 (1993), и Ranade, "Site-Specific Drug Delivery Using Liposomes as Carriers", в Ranade et al., eds., *Drug Delivery Systems*, pp. 3-24, CRC Press (1995)). Липосомы сходны по составу с клеточными мембранами, в результате чего липосомы могут безопасно вводиться и являются биоразлагаемыми. В зависимости от способа получения липосомы могут быть однослойными или многослойными, а размер липосомы может варьироваться в диапазоне от диаметра 0,02 до более 10 мкм. В липосомах могут быть инкапсулированы различные агенты: распределение гидрофобных агентов в бислоях и распределение гидрофильных агентов во внутреннем(-их) водном(-ых) пространстве(-ах) (см., например, Machy et al., *Liposomes in Cell Biology and Pharmacology*, John Libbey (1987), и Ostro et al., *American J. Hosp. Pharm.*, 46: 1576 (1989)). Более того, можно контролировать терапевтическую доступность инкапсулированного агента путем варьирования размера липосом, количества бислоев, состава липидов, а также характеристик заряда и поверхности липосом.

Липосомы могут поглощаться практически любым типом клеток и затем медленно высвобождать инкапсулированный агент. В качестве альтернативы, поглощенная липосома может быть подвергнута эндоцитозу в клетках, которые представляют собой фагоциты. Эндоцитоз сопровождается внутрилизосомной деградацией липосомальных липидов и высвобождением инкапсулированных агентов (Scherphof et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 446: 368 (1985)). После внутривенного введения липосомы небольшого размера (от 0,1 до 1,0 мкм) обычно захватываются клетками ретикулоэндотелиальной системы, расположенными главным образом в печени и селезенке, тогда как липосомы размером более чем 3,0 мкм осаждаются в легком. Такой предпочтительный захват небольших липосом клетками ретикулоэндотелиальной системы применяется для доставки химиотерапевтических агентов в макрофаги и опухоли печени.

Ретикулоэндотелиальную систему можно обойти несколькими способами, включая насыщение большими дозами липосомных частиц или избирательную инактивацию макрофагов фармакологическими средствами (Claassen et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 802: 428 (1984)). Кроме того, было показано, что включение дериватизированных гликолипидами или полиэтиленгликолем фосфолипидов в липосомные мембраны приводит к значительному уменьшению поглощения ретикулоэндотелиальной системой (Allen et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1068: 133 (1991); Allen et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1150: 9(1993)).

Липосомы дополнительно могут быть составлены для направленного действия на определенные клетки или органы путем варьирования состава фосфолипидов или путем введения в липосомы рецепторов или лигандов. Например, липосомы, составленные с высоким содержанием неионогенного поверхностно-активного вещества, применяли для направленного действия на печень (Hayakawa et al., *Japanese*

Patent No. 04-244,018; Kato et al., *Biol. Pharm. Bull.*, 16: 960 (1993)). Указанные готовые формы составляли путем смешивания соевого фосфатидилхолина, альфа-токоферола и этоксилированного гидрогенизированного касторового масла (НСО-60) в метаноле, концентрирования смеси под вакуумом и последующего разбавления смеси водой. Кроме того, было показано, что липосомальная готовая форма дипальмитилфосфатидилхолина (ДПФХ) со смесью полученных из сои стерилглюкозидов (СГ) и холестерина (Х) направленно действует на печень (Shimizu et al., *Biol. Pharm. Bull.*, 20:881 (1997)).

В качестве альтернативы, с поверхностью липосомы могут быть связаны различные направленно действующие лиганды, такие как антитела, фрагменты антител, углеводы, витамины и транспортные белки. Например, липосомы могут быть модифицированы производными галактозиллипидов разветвленного типа для направленного действия на рецепторы асиалогликопротеина (галактозы), которые экспрессируются исключительно на поверхности клеток печени (Kato et al., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 14: 287 (1997); Murahashi et al., *Biol. Pharm. Bull.*, 20: 259 (1997)). Подобным образом, Wu et al., *Hepatology*. 27: 772 (1998), продемонстрировали, что введение в липосомы асиалофетуиновой метки приводило к уменьшению периода полувыведения липосом из плазмы и значительно усилило захвата меченых асиалофетуином липосом гепатоцитами. С другой стороны, накопление в печени липосом, содержащих производные галактозиллипидов разветвленного типа, может ингибироваться предварительной инъекцией асиалофетуина (Murahashi et al., *Biol. Pharm. Bull.*, 20:259 (1997)). Липосомы полиаконитилированного сывороточного альбумина человека предлагают другой подход к направленному действию липосом на клетки печени (Kamps et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 94: 11681 (1997)). Более того, Geho et al. в патенте США № 4603044 описывают направленно действующие на гепатоциты систему доставки липосомных везикул, обладающей специфичностью в отношении гепатобилиарных рецепторов, связанных со специализированными метаболическими клетками печени.

В более общем подходе к направленному действию на ткани, клетки-мишени предварительно маркируют биотинилированными антителами, специфическими в отношении лиганда, экспрессируемого клеткой-мишенью (Harasym et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 32: 99 (1998)). После удаления из плазмы несвязанного антитела вводят конъюгированные со стрептавидином липосомы. В другом подходе направленно действующие антитела непосредственно присоединяли к липосомам (Harasym et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 32: 99 (1998)).

Антитела могут быть инкапсулированы в липосомы с применением стандартных методов микрокапсулирования белка (см., например, Anderson et al., *Infect. Immun.*, 31: 1099 (1981), Anderson et al., *Cancer Res.*, 50: 1853 (1990), и Cohen et al., *Biochim. Biophys. Acta.* 1063: 95 (1991), Alving et al., "Preparation and Use of Liposomes in Immunological Studies", в Gregoriadis, ed., *Liposome Technology*. 2nd Edition, Vol. III, p. 317, CRC Press (1993), Wassef et al., *Meth. Enzymol.* 149:124 (1987)). Как отмечено выше, терапевтически пригодные липосомы могут содержать множество компонентов. Например, липосомы могут содержать липидные производные поли(этиленгликоля) (Allen et al., *Biochim. Biophys. Acta.* 1150: 9 (1993)).

Разлагаемые полимерные микросферы были разработаны для поддержания высоких системных уровней терапевтических белков. Микросферы получают из разлагаемых полимеров, таких как поли(лактид-со-гликолид) (ПЛГ), полиангидриды, поли(ортоэфир), небiorазлагаемые этилвинилацетатные полимеры, в которых белки захвачены полимером (Gombotz et al., *Bioconjugate Chem.*, 6:332 (1995); Ranade, "Role of Polymers in Drug Delivery", в Ranade et al., eds., *Drug Delivery Systems*, pp. 51-93, CRC Press (1995); Roskos et al., "Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery", в Sanders et al., eds., *Protein Delivery: Physical Systems*, pp. 45-92, Plenum Press (1997); Bartus et al., *Science*. 281: 1161 (1998); Putney et al., *Nature Biotechnology*. 16: 153 (1998); Putney, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2: 548 (1998)). Кроме того, покрытые полиэтиленгликолем (ПЭГ) наносферы могут обеспечивать носитель для внутривенного введения терапевтических белков (см., например, Gref et al., *Pharm. Biotechnol.*, 10: 167 (1996)).

При необходимости, готовая форма может дополнительно содержать более чем одно активное соединение для конкретного показания, подлежащего лечению, предпочтительно с дополняющими видами активности, которые не оказывают неблагоприятного воздействия друг на друга. В качестве альтернативы или дополнительно, композиция может содержать агент, который усиливает ее функцию, например, цитотоксический агент, цитокин, химиотерапевтический агент или ингибитор роста. Такие молекулы подходящим образом присутствуют в комбинации в количествах, эффективных для предусмотренной цели.

В одном варианте реализации изобретения антитело, например, биспецифический антигенсвязывающий белок, по изобретению вводят в составе комбинированной терапии, т.е., в сочетании с другими агентами, например, терапевтическими агентами, которые пригодны для лечения патологических состояний или расстройств, таких как аутоиммунные расстройства и воспалительные заболевания. Термин "в комбинации" в этом контексте означает, что агенты вводят по существу одновременно, параллельно или последовательно. При последовательном введении, на момент начала введения второго соединения первое из двух соединений предпочтительно все еще обнаруживается в эффективных концентрациях в месте лечения.

Например, комбинированная терапия может включать в себя одно или большее количество антител,

например, биспецифических антител, по изобретению, составленных совместно и/или вводимых совместно с одним или большим количеством дополнительных терапевтических агентов, например, одним или большим количеством ингибиторов цитокинов и факторов роста, иммуносупрессантов, противовоспалительных агентов, ингибиторов метаболизма, ингибиторов ферментов и/или цитотоксических или цитостатических агентов, как описано более подробно ниже. Кроме того, одно или большее количество антител, например, биспецифических антител, описанных в данном документе, можно применять в комбинации с двумя или большим количеством терапевтических агентов, описанных в данном документе. В таких комбинированных схемах терапии предпочтительно можно применять более низкие дозы вводимых терапевтических агентов, таким образом избегая возможной токсичности или осложнений, связанных с различными видами монотерапии.

Предпочтительными терапевтическими агентами для применения в комбинации с антителом, например, биспецифическим антигенсвязывающим белком, по изобретению являются такие агенты, которые препятствуют воспалительному ответу на разных его стадиях. В одном варианте реализации изобретения одно или большее количество антител, например, биспецифических антител, описанных в данном документе, можно составлять совместно и/или вводить совместно с одним или большим количеством дополнительных агентов, таких как другие антагонисты цитокинов или факторов роста (например, растворимые рецепторы, пептидные ингибиторы, молекулы небольшого размера, слияния лигандов); или антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с другими мишенями (например, антитела, которые связываются с другими цитокинами или факторами роста, их рецепторами или другими молекулами клеточной поверхности); и противовоспалительные цитокины или их агонисты. Неограничивающие примеры агентов, которые можно применять в комбинации с антителами, описанными в данном документе, включают, но не ограничиваясь этим, антагонисты одного или большего количества интерлейкинов (IL) или их рецепторов, например, антагонисты IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17A-F, IL-18, IL-20, IL-21, IL-22, IL-25 и IL-31; антагонисты цитокинов или факторов роста или их рецепторов, такие как LT, EMAP-II, GM-CSF, FGF и PDGF. Кроме того, антитела по изобретению могут быть объединены с ингибиторами, например, антагонистическими антителами, молекул клеточной поверхности, таких как CD2, CD3, CD4, CD8, CD20 (например, ингибитор CD20 ритуксимаб (RITUXAN®)), CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD90 или их лиганды, включая CD154 (gp39 или CD40L) или LFA-1/ICAM-1 и VLA-4/VCAM-1 (Yusuf-Makagiansar et al., Med. Res. Rev., 22:146-167 (2002)). Предпочтительные антагонисты, которые можно применять в комбинации с одним или большим количеством антител, например, биспецифических антител, описанных в данном документе, включают антагонисты IL-1, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-15, IL-18, IL-20, IL-22 и IL-31.

Примеры таких агентов включают антагонисты IL-12, такие как химерные, гуманизированные, человеческие или полученные *in vitro* антитела (или их антигенсвязывающие фрагменты), которые связываются с IL-12 (предпочтительно IL-12 человека), например, антитело, раскрытое в WO 00/56772, ингибиторы рецептора IL-12, например, антитела к рецептору IL-12 человека; и к растворимым фрагментам рецептора IL-12, например, рецептора IL-12 человека. Примеры антагонистов IL-15 включают в себя антитела (или их антигенсвязывающие фрагменты) против IL-15 или его рецептора, например, химерные, гуманизированные, человеческие или полученные *in vitro* антитела к IL-15 человека или его рецептору, растворимым фрагментам рецептора IL-15 и связывающимся с IL-15 белкам. Примеры антагонистов IL-17 включают бродалуумаб, секукинумаб и иксекизумаб. Примеры антагонистов IL-18 включают антитела, например, химерные, гуманизированные, человеческие или полученные *in vitro* антитела (или их антигенсвязывающие фрагменты), к IL-18 человека, растворимым фрагментам рецептора IL-18 и связывающимся с IL-18 белкам (IL-18BP). Примеры антагонистов IL-1 включают ингибиторы интерлейкин-1-превращающего фермента (ИПФ), такие как Vx740, антагонисты IL-1, например, IL-1 RA (анакинра, Kineret®), sIL1RII и антитела против рецептора IL-1 (или их антигенсвязывающие фрагменты).

В других вариантах реализации изобретения одно или большее количество антител, например, биспецифических антител, описанных в данном документе, можно вводить в комбинации с одним или большим количеством из следующего: антагонисты IL-13, например, растворимые рецепторы IL-13 (sIL-13) и/или антитела против IL-13; антагонисты IL-2, например, DAB 486-IL-2 и/или DAB 389-IL-2 (гибридные белки IL-2, Seragen) и/или антитела к IL-2R, например, анти-Гас (гуманизированное анти-IL-2R, Protein Design Labs). Еще одна комбинация включает в себя одно или большее количество антител, например, биспецифических антител, по изобретению, антагонистические молекулы небольшого размера и/или ингибирующие антитела в комбинации с неистоющими ингибиторами анти-CD4 (DEC-CE9.1/SB 210396; неистоющее приматированное антитело против CD4, IDEC/SmithKline). Другие предпочтительные комбинации включают антагонисты костимуляторного пути CD80 (B7.1) или CD86 (B7.2), включая антитела, растворимые рецепторы или антагонистические лиганды; а также гликопротеиновый лиганд р-селектина (PSGL), противовоспалительные цитокины, например, IL-4 (DNAX/Schering); IL-10 (SCH 52000, рекомбинантный IL-10 DNAX/Schering); IL-13 и TGF-бета, а также их агонисты (например, агонистические антитела).

В других вариантах реализации изобретения одно или большее количество антител, например, бис-

пещифических антител, по изобретению, можно составлять совместно и/или вводить совместно с одним или большим количеством противовоспалительных лекарственных средств, иммуносупрессантов или ингибиторов метаболизма или ферментов, Неограничивающие примеры лекарственных средств или ингибиторов, которые можно применять в сочетании с антителами, описанными в данном документе, включают, но не ограничиваясь этим, одно или большее количество из: нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП), например, ибупрофен, тенидап, напроксен, мелоксикам, пироксикам, диклофенак и индометацин; сульфасалазина; кортикостероидов, таких как преднизолон; подавляющих цитокины противовоспалительных препаратов (ПЦПВП); ингибиторов биосинтеза нуклеотидов, например, ингибиторов биосинтеза пурина, антагонистов фолата (например, метотрексат (N-[4-[[[2,4-диамино-6-птеридинил)метил]метиламино]бензоил]-глутаминовая кислота); и ингибиторы биосинтеза пириимидина, например, ингибиторы дигидрооратдегидрогеназы (ДГОДГ). Предпочтительные терапевтические агенты для применения в комбинации с одним или большим количеством антител, например, биспецифических антител, по изобретению, включают в себя ингибиторы НПВП, ПЦПВП, ингибиторы (ДГОДГ) (например, лефлуномид) и антагонисты фолата (например, метотрексат). Примеры дополнительных ингибиторов включают в себя один или большее количество из: кортикостероидов (пероральных, ингаляционных и для местной инъекции), иммуносупрессантов, например, циклоспорин, такролимус (FK-506); и ингибиторов mTOR, например, сиролимус (рапамицин - RAPAMUNE® или производные рапамицина, например, растворимые производные рапамицина (например, сложноэфирные производные рапамицина, например, CCI-779)); агентов, которые препятствуют передаче сигналов провоспалительных цитокинов, таких как IL-1 (например, IRAK, NIK, IKK, p38 или киназы MAP ингибиторы); ингибиторов ЦОГ-2, например, целекоксиб, рофекоксиб и их варианты; ингибиторов фосфодиэстеразы, например, R973401 (ингибитор фосфодиэстеразы типа IV); ингибиторов фосфолипазы, например, ингибиторы цитозольной фосфолипазы 2 (сPLA2) (например, аналоги трифторметилкетона); ингибиторов фактора роста сосудистых эндотелиальных клеток или рецептора фактора роста, например, ингибитор VEGF и/или ингибитор VEGF-R; и ингибиторов ангиогенеза. Предпочтительными терапевтическими агентами для применения в комбинации с антителами по изобретению являются иммуносупрессанты, например, циклоспорин, такролимус (FK-506); ингибиторы mTOR, например, сиролимус (рапамицин) или производные рапамицина, например, растворимые производные рапамицина (например, сложноэфирные производные рапамицина, например, CCI-779); ингибиторы ЦОГ-2, например, целекоксиб и их варианты; и ингибиторы фосфолипазы, например, ингибиторы цитозольной фосфолипазы 2 (сPLA2), например, аналоги трифторметилкетона. Дополнительные примеры терапевтических агентов, которые можно сочетать с антителом, например, биспецифическим антигенсвязывающим белком, по изобретению, включают в себя один или большее количество из: 6-меркаптопуринов (6-МП); азатиоприна; сульфасалазина; месалазина; олсалазина; хлорохина/гидроксихлорохина (PLAQUENIL®); пенициллина; ауортиорналата (внутримышечный и пероральный); азатиоприна; колхицина; агонистов бета-2 адренорецепторов (сальбутамол, тербуталин, салметераль); ксантинов (теофиллин, аминофиллин); кромогликата; недокромила; кетотифена; ипратропия и окситропия; микофенолята мофетила; агонистов аденозина; антитромботических агентов; ингибиторов комплемента; и адренергических агентов. Анти-TL1A-антитела по изобретению можно сочетать с антагонистами TNF- $\alpha$  для лечения тех же состояний, которые указаны в данном документе для анти-TL1A/анти-TNF- $\alpha$  биспецифических антигенсвязывающих белков. Такие антагонисты TNF- $\alpha$  включают в себя, например, этанерсепт, адалимумаб, инфликсимаб, голимумаб и сертолизумаб пэгол.

Неограничивающие примеры агентов для лечения или предупреждения артритных расстройств (например, ревматоидный артрит, воспалительный артрит, ревматоидный артрит, ювенильный ревматоидный артрит, остеоартрит и псориагический артрит), с которыми можно сочетать антитело, например, биспецифический антигенсвязывающий белок, по изобретению, включают в себя один или большее количество из следующего: антагонисты IL-12, как описано в данном документе; НПВП; ПЦПВП; неистощающие анти-CD4-антитела, как описано в данном документе; антагонисты IL-2, как описано в данном документе; противовоспалительные цитокины, например, IL-4, IL-10, IL-13 и TGF- $\alpha$ , или их агонисты; антагонисты IL-1 или рецептора IL-1, как описано в данном документе; ингибиторы фосфодиэстеразы, как описано в данном документе; ингибиторы ЦОГ-2, как описано в данном документе; илопрост: метотрексат; талидомид и родственные талидомиду лекарственные средства (например, Celgen); лефлуномид; ингибитор активации плазминогена, например, транексамовую кислоту; ингибитор цитокина, например, T-614; простагландин E1; азатиоприн; ингибитор интерлейкин-1-превращающего фермента (ИПФ); ингибитор zap-70 и/или 1 sk (ингибитор тирозинкиназы zap-70 или 1 sk); ингибитор фактора роста сосудистых эндотелиальных клеток или рецептора фактора роста сосудистых эндотелиальных клеток, как описано в данном документе; ингибитор ангиогенеза, как описано в данном документе; кортикостероидные противовоспалительные лекарственные средства (например, SB203580); ингибиторы TNF- $\alpha$ -конвертазы; IL-1; IL-13; ингибиторы IL-17; золото; пеницилламин; хлорохин; гидроксихлорохин; хлорамбуцил; циклофосфамид; циклоспорин; тотальное облучение лимфоидной ткани; анти timoцитарный глобулин; CD5-токсины; перорально вводимые пептиды и коллаген; лобензарит динатрий; регуляторы цитокинов (PC) HP228 и HP466 (Houghten Pharmaceuticals, Inc.); антисмысловые фосфоротиоатные олигодезоксинуклео-

тиды ICAM-1 (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); растворимый рецептор 1 комплемента (TP 10; T Cell Sciences, Inc.); преднизон; орготелин; гликозаминогликана полисульфат; миноциклин (MINOCIN®); антитела против IL2R; морские и ботанические липиды (жирные кислоты рыб и семян растений); ауранофин; фенилбутазон; меклофенамовая кислота; флуфенамовая кислота; внутривенный иммунный глобулин; зилейтон; микофеноловая кислота (RS-61443); такролимус (FK-506); сиролимус (рапамицин); амиприлоза (терафектин); кладрибин (2-хлордезоксаденозин); и азарибин. Предпочтительные комбинации включают одно или большее количество антител, например, биспецифических антител, по изобретению, в сочетании с метотрексатом или лефлуномидом, а также, в случаях умеренного или тяжелого ревматоидного артрита, с циклоспорином.

Предпочтительные примеры ингибиторов для применения в комбинации с одним или большим количеством антигенсвязывающих белков, например, биспецифических антигенсвязывающих белков, по изобретению для лечения артритных расстройств, включают антагонисты IL-12, IL-15, IL-18, IL-22; истощающие Т-клетки и В-клетки агенты (например, антитела против CD4 или CD22); низкомолекулярные ингибиторы, например, метотрексат и лефлуномид; сиролимус (рапамицин) и его аналоги, например, CCI-779; ингибиторы ЦОГ-2 и sPLA2; НПВП; ингибиторы p38, ингибиторы TPL-2, Mк-2 и NF κB; RAGE или растворимый RAGE; ингибиторы Р-селектина или PSGL-1 (например, низкомолекулярные ингибиторы, антитела к PSGL-1, антитела к Р-селектину); агонисты эстрогенового рецептора бета (ЭРБ) или антагонисты ЭРБ-NF κB. Наиболее предпочтительные дополнительные терапевтические агенты, которые можно вводить совместно и/или составляя совместно с одним или большим количеством антител, например, биспецифических антител, по изобретению, являются один или более из: метотрексата, лефлуномида или сиролимуса (рапамицин) или его аналога, например, CCI-779.

Неограничивающие примеры агентов для лечения или предупреждения воспалительного заболевания или расстройства (например, ВЗК, БК, ЯК, СПК), с которыми можно сочетать антитело, например, биспецифический антигенсвязывающий белок, по изобретению, включают в себя следующие: будесонид; эпидермальный фактор роста; кортикостероиды; циклоспорин; сульфасалазин; аминосалицилаты; б-меркаптопурин; азатиоприн; метронидазол; ингибиторы липоксигеназы; мезаламин; олсалазин; балсалазид; антиоксиданты; ингибиторы тромбксана; антагонисты рецептора IL-1; моноклональные антитела против IL-1; моноклональные антитела против IL-6 (например, антитела против рецептора IL-6 и антитела против IL-6); факторы роста; ингибиторы эластазы; пиридинил-имидазольные соединения; цитокины IL-4, IL-10, IL-13 и/или TGF-бета или их агонисты (например, агонистические антитела); IL-11; глюкуроноид- или декстран-конъюгированные пролекарства преднизолона, дексаметазона или будесонида; антисмысловые фосфоротиоатные олигонуклеотиды ICAM-1 (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); растворимый рецептор 1 комплемента (TP10; T Cell Sciences, Inc.); мезалазин замедленного высвобождения; метотрексат; антагонисты фактора активации тромбоцитов (ФАТ); ципрофлоксацин; и лигнокаин.

Неограничивающие примеры агентов для лечения или предупреждения рассеянного склероза, которые можно сочетать с одним или большим количеством антител, например, биспецифических антител, по изобретению, включают в себя следующее: интерфероны, например, интерферон-α (например, AVONEX®, Biogen) и интерферон-1b (BETASERON®, Chiron/Berlex); Сополимер 1 (Cop-1, COPAXONE®, Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); диметилфумарат (например, BG-12; Biogen); гипербарический кислород; внутривенный иммуноглобулин; кладрибин; кортикостероиды; преднизолон; метилпреднизолон; азатиоприн; циклофосфамид; циклоспорин; циклоспорин А, метотрексат; 4-аминопиридин; и тизанидин. Дополнительные антагонисты, которые можно применять в комбинации с антителами по изобретению, включают в себя антитела или антагонисты других цитокинов человека или факторов роста, например, LT, IL-1, IL-2, IL-6, EL-7, IL-8, IL-12 IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-11, GM-CSF, FGF и PDGF. Антитела, как описано в данном документе, можно сочетать с антителами к молекулам клеточной поверхности, таким как CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90 или их лиганды. Кроме того, одно или большее количество антител, например, биспецифических антител, по изобретению, можно сочетать с агентами, такими как метотрексат, циклоспорин, FK506, рапамицин, микофенолят мофетил, лефлуномид, НПВП, например, ибупрофен, кортикостероиды, такие как преднизолон, ингибиторы фосфодиэстеразы, агонисты аденозина, антитромботические агенты, ингибиторы комплемента, адренергические агенты, препятствующие передаче сигналов провоспалительных цитокинов агенты, как описано в данном документе, ингибиторы IL-1b-превращающего фермента (например, Vx740), анти-P7s, PSGL, ингибиторы TACE, ингибиторы передачи сигналов Т-клеток, такие как ингибиторы киназы, ингибиторы металлопротеиназы, сульфасалазин, азатиоприн, б-меркаптопурины, ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента, растворимые рецепторы цитокинов и их производные, как описано в данном документе, и противовоспалительные цитокины (например, IL-4, IL-10, IL-13 и TGF).

Предпочтительные примеры терапевтических агентов против рассеянного склероза, с которыми можно сочетать антитела по изобретению, включают в себя диметилфумарат (например, BG-12, Biogen), интерферон-бета, например, IFN-β-1a и IFN-β-1b; COPAXONE®, кортикостероиды, ингибиторы IL-1, антитела к лиганду CD40 и CD80, антагонисты IL-12.

Неограничивающие примеры агентов для лечения или предупреждения псориаза, с которыми можно сочетать антитело, например, биспецифический антигенсвязывающий белок, по изобретению, включают в себя следующие: кортикостероиды; витамин D<sub>3</sub> и его аналоги; ретиноиды (например, сориатан); метотрексат; циклоспорин, 6-тиогуанин; аккутан; гидреа; гидроксимочевина; сульфасалазин; микофенолят мофетил; азатиоприн; такролимус; эфиры фумаровой кислоты; биологические агенты, такие как AMEVIVE®, Raptiva устекинумаб и XR-828L; фототерапия; и фотохимиотерапия (например, комбинация псоралена и фототерапия ультрафиолетом).

Неограничивающие примеры агентов для лечения или предупреждения воспалительных заболеваний дыхательных путей/респираторных заболеваний (например, хронического обструктивного заболевания легких, астмы), с которыми можно сочетать антитело, например, биспецифический антигенсвязывающий белок, по изобретению, включают следующие: агонисты бета2-адренорецепторов (например, сальбутамол (альбутерол), левальбутерол, тербуталин, битолтерол); агонисты бета2-адренорецепторов длительного действия (например, сальметерол, формотерол, бамбутерол); адренергические агонисты (например, ингаляционный адреналин и таблетки эфедрина); антихолинергические препараты (например, ипратропия бромид); комбинации ингаляционных стероидов и бронходилататоров длительного действия (например, флутиказон/сальметерол (ADVAIR® в США и Seretide в Соединенном Королевстве)) или будесонид/формотерол (SYMBICORT®)); ингаляционные глюкокортикоиды (например, циклезонид, беклометазон, будесонид, флунизолид, флутиказон, мометазон, триамцинолон); модификаторы лейкотриенов (например, монтелукаст, зафирлукаст, пранлукаст и zileйтон); стабилизаторы тучных клеток (например, кромогликат (кромоллин) и недокромил); антимускарины/антихолинергические средства (например, ипратропий, окситропий, тиотропий); метилксантины (например, теofilлин, аминофиллин); антигистаминные препараты; блокаторы IgE (например, омализумаб); M<sub>3</sub> мускариновые антагонисты (антихолинергические средства) (например, ипратропий, тиотропий); кромоны (например, кромогликат, недокромил); ксантины (например, теofilлин); ингибиторы IL-17 (например, бродалумаб, секукинумаб, иксекизумаб), ингибиторы IL-4; и ингибиторы IL-13.

В одном варианте реализации изобретения антитело, например, биспецифический антигенсвязывающий белок, по изобретению, можно применять в комбинации с одним или большим количеством антител, направленно действующих на другие мишени, участвующие в регуляции иммунных реакций, например, при отторжении трансплантата.

Неограничивающие примеры агентов для лечения или предупреждения иммунных реакций, с которыми можно сочетать антитело, например, биспецифический антигенсвязывающий белок, по изобретению, включают в себя следующие: антитела против других молекул поверхности клеток, включая, но не ограничиваясь этим, CD25 (рецептор-а интерлейкина-2), CD11a (LFA-1), CD54 (ICAM-1), CD4, CD45, CD28/CTLA4 (CD80 (B7.1), например, CTLA4 Ig (абатасепт, ORENCIA®), ICOSL, ICOS и/или CD86 (B7.2)). В еще одном варианте реализации изобретения антитело по изобретению применяют в комбинации с одним или большим количеством общих иммуносупрессантов, такими как циклоспорин А или FK506.

В других вариантах реализации изобретения антитела применяют в качестве адъювантов вакцины против аутоиммунных заболеваний, воспалительных заболеваний и т.д. Комбинация адъювантов для лечения этих типов расстройств подходит для применения в сочетании с широким спектром антигенов из числа направленно действующих аутоантигенов, т.е., аутоантигенов, участвующих в аутоиммунных процессах, например, основной белок миеллина, воспалительные аутоантигены (например, амилоидный пептидный белок) или антигены трансплантата (например, аллоантигены). Антиген может содержать пептиды или полипептиды, полученные из белков, а также фрагменты любого из следующего: сахараиды, белки, полинуклеотиды или олигонуклеотиды, аутоантигены, амилоидный пептидный белок, антигены трансплантата, аллергены или другие макромолекулярные компоненты. В некоторых случаях антигенная композиция содержит более одного антигена.

Например, желательные вакцины для смягчения ответов на аллергены у позвоночного хозяина, которые содержат адъювантные комбинации по данному изобретению, включают в себя такие, которые содержат аллерген или его фрагмент. Примеры таких аллергенов описаны в патенте США № 5830877 и публикации РСТ № WO 99/51259, которые включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме, и включают пыльцу, яды насекомых, перхоть животных, споры грибов и лекарственные средства (такие как пенициллин). Вакцины препятствуют выработке антител IgE, известной причины аллергических реакций. В другом примере желательные вакцины для предупреждения или лечения заболеваний, характеризующиеся отложением амилоида у позвоночного хозяина, которые содержат адъювантные комбинации по данному изобретению, включают в себя такие, которые содержат части амилоидного пептидного белка (АПП). Это заболевание упоминается по-разному как болезнь Альцгеймера, амилоидоз или амилоидогенное заболевание. Таким образом, вакцины по данному изобретению содержат адъювантные комбинации по данному изобретению плюс А.бета. пептид, а также фрагменты пептида Аβ и антител к пептиду Аβ или его фрагментам.

В другом варианте реализации изобретения фармацевтические композиции могут поставляться в

виде набора, включающего емкость, которая содержит антитело, биспецифический антигенсвязывающий белок или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Антитела, например, биспецифические антитела по изобретению, могут быть представлены в виде однодозового или многодозового инъекционного раствора или в виде стерильного порошка для разведения перед инъекцией. В качестве альтернативы, такой набор может включать диспергатор сухого порошка, генератор жидкого аэрозоля или небулайзер для введения антигенсвязывающего белка (например, анти-TL1A/анти-TNF- $\alpha$  биспецифический антигенсвязывающий белок). Такой набор может дополнительно содержать письменную информацию о показаниях и применении фармацевтической композиции. Более того, такая информация может включать в себя утверждение о том, что композиция антитела противопоказана пациентам с известной гиперчувствительностью к TL1A и TNF- $\alpha$ .

В другом варианте реализации данное изобретение относится к промышленному изделию, содержащему: (a) композицию вещества, содержащую антитело, биспецифический антигенсвязывающий белок или антигенсвязывающий фрагмент, как описано в данном документе; (b) емкость, содержащую указанную композицию; и (c) этикетку, прикрепленную к указанной емкости, или листок-вкладыш в упаковку, включенный в указанную емкость, который относится к применению указанного антитела для лечения связанного с иммунной системой заболевания.

В другом аспекте композиция содержит дополнительный активный ингредиент, который может быть, например, дополнительным антителом или противовоспалительным, цитотоксическим или химиотерапевтическим средством. Предпочтительно композиция является стерильной.

Кроме того, антитела, например, биспецифические антитела, как описано в данном документе, пригодны для приготовления лекарственных средств и медикаментов для лечения иммунных и воспалительных заболеваний, включая, например, СПК, ВЗК, БК, ЯК. В конкретном аспекте такие лекарственные средства и медикаменты содержат терапевтически эффективное количество биспецифического антигенсвязывающего белка, антитела или антигенсвязывающего фрагмента по изобретению с фармацевтически приемлемым носителем. В варианте реализации изобретения смесь является стерильной.

Биспецифические антигенсвязывающие белки по изобретению пригодны для обнаружения TL1A и/или TNF- $\alpha$  в биологических образцах и идентификации клеток или тканей, которые экспрессируют рецептор DR3 TL1A и/или рецептора TNF- $\alpha$ . Например, биспецифические антигенсвязывающие белки можно применять в диагностических анализах, например, анализах связывания, для обнаружения и/или количественного определения связывания и/или экспрессии в ткани или клетке TL1A и/или TNF- $\alpha$ . Кроме того, описанные в данном документе биспецифические антигенсвязывающие белки можно применять для ингибирования образования комплекса TL1A с его рецептором DR3, таким образом модулируя биологическую активность TL1A или DR3 в клетке или ткани. Подобным образом, биспецифические антигенсвязывающие белки, описанные в данном документе, можно применять для ингибирования образования комплекса TNF- $\alpha$  с его рецептором, таким образом модулируя биологическую активность TNF- $\alpha$  или его рецептора в клетке или ткани. Типичная активность, которую можно модулировать, включает в себя, но не ограничиваясь этим, ингибирование и/или уменьшение воспаления.

Биспецифические антигенсвязывающие белки, описанные в данном документе, можно применять в диагностических целях для обнаружения, диагностики или мониторинга заболеваний и/или состояний, связанных с TL1A и/или TNF- $\alpha$ . Дополнительно представлены способы обнаружения присутствия TL1A и/или TNF- $\alpha$  в образце с применением классических иммуногистологических методов, известных специалистам в данной области техники. См., например, Tijssen (1993), *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*, Vol 15 (Eds R.H. Burdon and P.H. van Knippenberg, Elsevier, Amsterdam); Zola (1987), *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp. 147-158 (CRC Press, Inc.); Jalkanen et al. (1985), *J. Cell. Biol.* 101: 976-985; Jalkanen et al. (1987), *J. Cell Biol.* 105: 3087-3096. Обнаружение TL1A и/или TNF- $\alpha$  можно выполнять *in vivo* или *in vitro*.

Предлагаемое в данном документе диагностическое применение включает применение антигенсвязывающих белков для обнаружения экспрессии TL1A и/или TNF- $\alpha$  и связывания этих лигандов с их рецепторами. Примеры способов, пригодных для обнаружения присутствия лиганда, включают в себя иммуноанализы, такие как иммуноферментный анализ (ИФА) и радиоиммуноанализ (РИА).

Для диагностического применения в антигенсвязывающий белок обычно будет введена метка в виде обнаруживаемой группы метки. Подходящие группы метки включают, но не ограничиваясь этим, следующие: радиоизотопы или радионуклиды (например,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ), флуоресцентные группы (например, ФИТЦ, родамин, люминофоры на основе комплексов лантанидов), ферментные группы (например, пероксидаза хрена, Р-галактозидаза, люцифераза, щелочная фосфатаза), хемилюминесцентные группы, биотинильные группы или предварительно определенные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, последовательности пар лейцинового zipper, сайты связывания для вторичных антител, сайты связывания с металлом, эпитопные метки). В некоторых вариантах реализации изобретения группа метки соединена с антигенсвязывающим белком через спейсерные плечи различной длины для уменьшения потенциального стерического препятствия. Различные способы введения метки в белки известны в данной области техники и могут быть применены.

В другом варианте реализации изобретения описанный в данном документе биспецифический антигенсвязывающий белок можно применять для идентификации клетки или клеток, которые экспрессируют TL1A и/или TNF- $\alpha$ . В конкретном варианте реализации изобретения в антигенсвязывающий белок вводят метку в форме группы метки и обнаруживают связывание меченого антигенсвязывающего белка с TL1A и/или TNF- $\alpha$ . В еще одном конкретном варианте реализации изобретения связывание антигенсвязывающего белка с TL1A и/или TNF- $\alpha$  обнаруживают *in vivo*. В еще одном конкретном варианте реализации изобретения биспецифический антигенсвязывающий белок выделяют и проводят измерения с применением методов, известных в данной области техники. См., например, Harlow and Lane, 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor (ред. 1991 и периодические дополнения); John E. Coligan, ed., 1993, *Current Protocols In Immunology* New York: John Wiley & Sons.

В другом аспекте изобретения предлагается обнаружение присутствия тестируемой молекулы, которая конкурирует за связывание с TL1A и/или TNF- $\alpha$  с антигенсвязывающими белками, описанными в данном документе. Пример одного из таких анализов будет включать в себя обнаружение количества несвязанного антигенсвязывающего белка в растворе, содержащем некоторое количество TL1A и/или TNF- $\alpha$ , в присутствии или в отсутствие тестируемой молекулы. Увеличение количества несвязанного антигенсвязывающего белка (т.е., антигенсвязывающего белка, не связанного с TL1A и/или TNF- $\alpha$ ), указывает на то, что тестируемая молекула способна конкурировать с биспецифическим антигенсвязывающим белком за связывание с TL1A и/или TNF- $\alpha$ . В одном варианте реализации изобретения в антигенсвязывающий белок вводят метку в виде группы метки. В качестве альтернативы, метку вводят в тестируемую молекулу, и количество несвязанной тестируемой молекулы отслеживают в присутствии и в отсутствие антигенсвязывающего белка.

### Рабочие примеры

Далее изобретение проиллюстрировано следующими рабочими примерами, которые иллюстрируют, но не ограничивают объем изобретения.

Пример 1. Получение моноклональных антител против TL1A Xenomouse® Линии мышей.

Полностью человеческие антитела к TL1A человека были получены путем иммунизации трансгенных мышей XENOMOUSE®. Патенты США №№ 6114598; 6162963; 6833268; 7049426; 7064244, которые включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме; Green et al. (1994), *Nature Genetics* 7: 13-21; Mendez et al. (1997), *Nature Genetics* 15: 146-156; Green and Jakobovitis (1998), *J. Ex. Med.* 188: 483-495; Kellerman and Green (2002), *Current Opinion in Biotechnology* 13, 593-597; каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Для иммунизации во всех случаях использовали животных линий XENOMOUSE® XMG1-KL, XMG2-K, XMG2-K/Balbc, XMG2-KL, XMG4-K и XMG4-KL. Получение иммуногена TL1A.

Полипептиды TL1A, содержащие N-концевую метку His (H6), в которых первые 22 аминокислоты являются сигнальным пептидом VK1, получают путем временной трансфекции клеток 293НЕК соответствующими кДНК. Для облегчения обнаружения и последующей очистки применяют широко используемую метку polyHis.

Клетки 293-6Е в количестве  $9,48 \times 10^5$  клеток/мл трансфецируют 0,5 мг/л ДНК (0,1 мг/л His-TL1A в векторе рТТ5 с 0,4 мг/л пустого вектора рТТ5) (Durocher et al. (2002) *NRCC, Nucleic Acids. Res.* 30, e9) с 3 мл ПЭИ/мг ДНК в среде FreeStyle 293 (Invitrogen). Триптон N1 добавляют к культурам через 1 ч после трансфекции. Клетки выращивают в суспензии в экспрессионной среде FreeStyle 293, дополненной 0,1% Pluronic F68 и 50 мкг/мл генетицина в течение 7 дней и собирают для очистки.

Пример 2. Генерация TL1A.

Полипептиды TL1A, содержащие N-концевую метку His (H6), в которых первые 22 аминокислоты являются сигнальным пептидом VK1, получают путем временной трансфекции клеток 293НЕК соответствующими кДНК. Для облегчения обнаружения и последующей очистки применяют широко используемую метку polyHis.

Клетки 293-6Е в количества  $9,48 \times 10^5$  клеток/мл трансфецируют 0,5 мг/л ДНК (0,1 мг/л His-TL1A в векторе рТТ5 с 0,4 мг/л пустого вектора рТТ5) (Durocher et al., *NRCC, Nucleic Acids. Res.* (2002) 30, e9) с 3 мл ПЭИ/мг ДНК в среде FreeStyle 293 (Invitrogen). Триптон N1 добавляют к культурам через 1 ч после трансфекции. Клетки выращивают в суспензии в экспрессионной среде FreeStyle 293, дополненной 0,1% Pluronic F68 и 50 мкг/мл генетицина в течение 7 дней и собирают для очистки.

Иммунизация.

Иммунизацию проводят с применением одной или большего количества подходящих форм антигена TL1A, включая рекомбинантный TL1A человека, экспрессируемый на клетках, и растворимый белок рекомбинантного TL1A или их комбинации.

Для начальной иммунизации Xenomouse® применяют подходящее количество иммуногена (т.е., 10 мкг белка, вводимого инъекцией в брюшную полость). После начальной иммунизации последующую бустерную иммунизацию иммуногеном (т.е.,  $2 \times 10^6$  клеток или 5 мкг белка) проводят по графику на протяжении периода времени, необходимого для индукции у мышей подходящего титра антитела против TL1A. Титры определяют любым подходящим способом, например, с помощью иммуноферментного

анализа или проточной цитометрии (FACS).

Для получения иммунных ответов против TL1A человека применяли множество иммуногенов и способов иммунизации. С целью генетической иммунизации мышей иммунизировали 12-16 раз на протяжении 6-8 недель с применением системы Helios Gene Gun в соответствии с инструкциями производителя (BioRad, Геркулес, штат Калифорния). Вкратце, векторами экспрессии, кодирующими TL1A дикого типа человека или яванского макака, покрывают гранулы золота (BioRad, Геркулес, штат Калифорния) и вводят в эпидермис выбритого брюха мыши. С целью клеточной иммунизации мышей иммунизируют адаптированной к суспензии клеточной линией CHO-K1 (Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния), стабильно трансфицированной вектором экспрессии, кодирующим TL1A человека. Животных иммунизируют клетками, смешанными с алюминиевыми квасцами, полученными из сульфата калия алюминия (EMD Chemicals Inc., Гибстаун, Нью-Джерси), и CpG-ODN (Eurofins MWG Oregon LLC, Хантсвилл, штат Алабама) 10-12 раз на протяжении 6-8 недель, с применением протокола, в котором чередуют подкожные и внутрибрюшинные инъекции. Первоначальный бустер содержит  $4 \times 10^6$  клеток, в то время как последующие бустеры содержат  $2 \times 10^6$  клеток. В случае иммунизации растворимым рекомбинантным белком мышей иммунизируют 6х меченной His тримерной формой внеклеточного домена TL1A человека и яванского макака (аминокислоты 72-251 последовательностей TL1A). Животных иммунизируют рекомбинантным белком, смешанным с алюминиевыми квасцами, и CpG-ODN, 8-12 раз на протяжении 4-8 недель с применением подкожных инъекций. Первоначальный бустер содержит 10 мкг, а последующие - 5 мкг. Специфические в отношении TL1A человека титры сыворотки контролируют с помощью анализа FACS с живыми клетками на проточном цитометре Accuri или FACS Calibur (BD Biosciences). Животных с самыми высокими антиген-специфическими титрами сыворотки, направленно действующими на TL1A человека и яванского макака, умерщвляют и используют для генерации гибридомы (Kohler and Milstein, 1975).

Пример 3. Получение моноклональных антител.

Генерация гибридомы.

Идентифицируют животные с подходящими титрами, лимфоциты получают из дренированных лимфатических узлов и, при необходимости, объединяют в пул для каждой когорты. Объединенные в пул лимфоциты (из каждой когорты иммунизации) диссоциируют от лимфоидной ткани путем измельчения в подходящей среде (например, модифицированная Дульбекко среда Игла (МДСИ), Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния). В-клетки можно отобрать и/или развести с применением подходящего способа и осуществить слияние с подходящим партнером по слиянию; например, клетками несекреторной миеломы P3X63Ag8.653 (Американская Коллекция Типовых Культур CRL 1580, Kearney et al., J. Immunol. 123, 1979, 1548-1550), с применением способов, известных в данной области техники. В-клетки отбирают и/или разводят с применением стандартных способов и осуществляют слияние с подходящим партнером по слиянию при помощи методов, которые известны в данной области техники.

В одном подходящем способе слияния лимфоциты смешивают с клетками-партнерами по слиянию в соотношении 1:4. Смесь клеток осторожно осаждают путем центрифугирования при  $400 \times g$  в течение 4 мин, супернатант декантируют, и смесь клеток осторожно перемешивают (например, с помощью пипетки емкостью 1 мл). Слияние индуцируют ПЭГ/DMCO (полиэтиленгликоль/диметилсульфоксид, доступны от Sigma-Aldrich, Сент-Луис, штат Миссури, 1 мл на миллион лимфоцитов). ПЭГ/DMCO медленно добавляют при осторожном перемешивании в течение одной минуты и перемешивают еще одну минуту. Затем добавляют МИСД (МДСИ без глутамина, 2 мл на миллион В-клеток) в течение 2 мин при осторожном перемешивании, с последующим добавлением дополнительного количества МИСД (8 мл на миллион В-клеток), которое проводят в течение 3 мин.

Гибридные клетки осторожно гранулируют ( $400 \times g$ , 6 мин) и ресуспендируют в 20 мл селекционной среды (например, МДСИ, содержащей азасерин и гипоксантин [ГК] и, при необходимости, другие дополнительные материалы) на миллион В-клеток. Клетки инкубируют в течение 20-30 мин при  $37^\circ C$ , после чего ресуспендируют в 200 мл селекционной среды и культивируют в течение трех-четырех дней в колбах T175 до нанесения на 96-луночные планшеты.

Клетки распределены на 96-луночных планшетах с применением стандартных способов максимизации клонирования полученных колоний. Через несколько дней культивирования супернатанты собирают и подвергают скрининговым анализам, как описано в примерах ниже, включая подтверждение связывания с TL1A человека, оценку перекрестной реактивности с TL1A других видов (например, TL1A яванского макака) и способность ингибировать активности TL1A. Далее отбирают клетки с положительными результатами и подвергают стандартным методам клонирования и субклонирования. Клональные линии могут быть разведены *in vitro*, и секретлируемые человеческие антитела могут быть получены для анализа.

Таким образом мышей иммунизируют рекомбинантным растворимым белком TL1A человека на протяжении в общей сложности 15 иммунизации в течение около 2 месяцев; получены несколько линий клеток гибридомы, секретирующих TL1A-специфические антитела, и антитела дополнительно охарактеризованы. Их последовательности представлены в перечне последовательностей и табл. А, С и D, а ре-

зультаты различных тестов с применением этих антител представлены в данном документе.

В табл. А-Е данного документа представлены последовательности антител против TL1A, полученных в соответствии с данным рабочим примером.

Пример 4. Антигенное обогащение гибридных пулов.

В качестве источника материала для обогащения на основе FACS используют пулы слитой гибридомы после избирательного сбора иммунной ткани. Для обогащения гибридом, экспрессирующих антитела, специфические в отношении нативного (полноразмерного, на клетках) TL1A человека получают мембраны клеток 293Т, временно экспрессирующих конструкцию кДНК TL1A. Через 24 ч после трансфекции с применением 293Fectin™ (ThermoFisher Scientific Inc.) клетки биотинилируют с помощью E-Z связи NHS-LC-LC-Биотин в соответствии с рекомендациями производителя (ThermoFisher Scientific Inc.). После биотинилирования клетки гомогенизируют при помощи иглы и шприца для получения фрагментов мембран, которые называют "препаратами мембран". Затем биотинилированные препараты мембран используют для обнаружения гибридом, экспрессирующих поверхностные антитела, специфические в отношении целевой мишени, посредством стандартной химии биотина-стрептавидина.

С целью обогащения гибридных пулов представляющим интерес антигеном, их сначала инкубируют с зондом мембранных препаратов. Затем несвязанный зонд вымывают, а антигенспецифические гибридомы идентифицируют путем одновременного обнаружения поверхностного IgG (с помощью конъюгированного с Alexa 488 вторичного Gt антитела против Fc человека, Jackson ImmunoResearch) и зонда биотинилированного мембранного препарата TL1A (конъюгированный с Alexa Fluor 647 стрептавидин, Jackson ImmunoResearch). Гибридомы, экспрессирующие поверхностный IgG и связывающие антиген, обнаруживают с помощью анализа FACS на проточном цитометре Accuri. Двойные положительные события сортируют как отдельные клетки в 384-луночные планшеты на сортировщике клеток FACS Aria (BD Biosciences). Через несколько дней культивирования супернатанты гибридомы, содержащие моноклональные антитела, собирают и используют в скрининговых анализах, описанных в примерах ниже.

Пример 5. Первоначальная селекция TL1A-специфических связывающих антител.

TL1A человека экспрессируют на клетках-хозяевах эмбриональной почки 293 человека путем трансфекции с применением вектора экспрессии, экспрессирующего кДНК huTL1A, среды Gibco™ Opti-MEM® (Gibco, кат. № 31985088) и реагента 293Fectin™ (Invitrogen, кат. № 12347019) в соответствии с протоколом, установленным изготовителем. Супернатанты гибридом подвергают скринингу на предмет присутствия huTL1A-специфических моноклональных антител с применением системы скрининга FMAX 8200 (Molecular Devices) и платформы для визуализации с высоким содержанием CellInsight™ (ThermoFisher Scientific). Количество huTL1A-положительных лунок (т.е., таких, для которых сигнал превышает сигнал супернатанта нерелевантной гибридомы) представлено в табл. 5.1. Для скринов CellInsight, 15 мкл/лунку супернатанта гибридомы (и положительного и отрицательного контроля) помещают на черные 384-луночные планшеты с прозрачным дном (Corning кат. № 3712), с последующим добавлением 30 мкл/лунку смеси клеток TL1A/293Т, ядерного красителя Hoescht (Pierce, кат. № 62249) и Alexa 488-козьего антитела против Ig человека (H+L) (Jackson, кат. № 109-545-088). Через 3 ч инкубации при комнатной температуре планшеты промывают 2 раза на устройстве для промывания планшетов AquaMax 4000 (снабженном 384-луночной головкой для промывания клеток) и считывают на приборе CellInsight в соответствии с рекомендациями производителя. Для скринов на основе FMAX, 20 мкл/лунку супернатанта гибридомы (и положительного и отрицательного контроля) помещают на черные 384-луночные планшеты с прозрачным дном, а затем добавляют 40 мкл/лунку смеси клеток TL1A/293Т, родительских клеток 293Т и Cy5-козьего анти-человеческого IgG (Fc) (Jackson, кат. № 109-075). Через 3 ч инкубации при комнатной температуре планшеты считывают в системе FMAX 8200 в соответствии с рекомендациями производителя.

Таблица 5.1

Отобранные TL1A-специфические антитела

Сбор №	Платформа	Общее кол-во положительных
1	FMAX 8200	1488
2	FMAX 8200	900
5	CellInsight	1830
6	FMAX 8200	438
7 и 8	CellInsight	1541

Пример 6. Идентификация антител, блокирующих рецептор-лиганд TL1A.

Биотинилированный huTL1A получают введением в реакцию 100 мкг/мл NHS LC LC биотина (Pierce, кат. № 21338) и 100 мкг huTL1A (полученный, как описано в примере 2) в 1 мл ФСБ, pH 8,5, в течение 1 ч при комнатной температуре. Непрореагировавший биотин удаляют ультрафильтрацией с

применением спиновой колонки Amicon Ultra 5 кДа (Millipore, кат. № UFC8 005). Супернатанты гибридомы, содержащие huTL1A-связывающие антитела, анализируют на предмет их способности блокировать связывание huTL1A с Death Receptor 3 человека (huDR3) с помощью анализа рецептора-лиганда на основе ИФА. Планшеты ИФА (Corning, кат. № 3702) покрывают 40 мкл/лунку химеры DR3-Fc человека (1 мкг/мл) (R & D Systems, кат. № 943-D3) в покрывающем буфере (1× ФСБ/0,05% азида), затем инкубируют в течение ночи при 4°C. Далее планшеты 3 раза промывают водой и блокируют 90 мл разбавителя (1× ФСБ/1% молока) в течение 30 мин при комнатной температуре. 15 мкл супернатанта гибридомы против TL1A предварительно инкубируют с 45 мкл биотинилированного TL1A (конечная концентрация 30 нг/мл) на 96-луночных планшетах для хранения (Sigma, кат. № P6866) в разбавителе для анализа в течение 2 ч при комнатной температуре перед добавлением на планшеты ИФА с предварительно заблокированным DR3. Затем аналитические планшеты инкубируют в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее планшеты с образцами промывают 3 раза, после чего добавляют 40 мкл/лунку стрептавидина-ПХ (Pierce, кат. № 21126) и еще 1 ч инкубируют при комнатной температуре. Планшеты промывают еще три раза и добавляют 40 мкл ТМБ (Neogen, кат. № 308177). Реакционную смесь с ТМБ инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре, и затем гасят 40 мкл/лунку 1 н соляной кислоты. В конце, планшеты считывают на устройстве для считывания ИФА планшетов на длине волны 450 нм. Пороги устанавливаются на уровне <38% от сигнала отрицательного контроля, нерелевантных ИСН (истощенных супернатантов). Количество образцов, способных блокировать взаимодействие huTL1A-DR3 (определенное согласно указанному порогу), приведено в табл. 6.1.

Таблица 6.1

## Выбранные блокаторы TL1A/DR3

Сбор №	Общее кол-во блокаторов TL1A/DR3
1	208
2	39

Пример 7. Анализ функционального блокирования TL1A.

Для скрининга гибридом, способных блокировать функциональную активность TL1A, применяют анализ высвобождения IFN $\gamma$  из первичных Т-клеток или анализ репортера NF- $\kappa$ B в клетках TF1. Для анализа высвобождения IFN $\gamma$ , очищенные первичные Т-клетки человека (Biological Specialty Corp., кат. № 215-01-10) стимулируют растворимым TL1A человека в присутствии или в отсутствие супернатантов гибридомы, специфических в отношении TL1A.  $2 \times 10^5$  первичных Т-клеток человека стимулируют 8-16 нг/мл TL1A человека (Amgen), 1-2 нг/мл IL-12 (Peprotech) и 0,5-1 нг/мл IL-18 (R&D Systems) в присутствии супернатантов гибридомы, содержащих антитела против TL1A, на 96-луночном круглодонном планшете при 37°C в течение 72 ч. Далее тестируют уровень IFN $\gamma$  в супернатантах культур методом ИФА в соответствии с инструкциями производителя (R&D Systems). Для анализа чувствительного репортера TL1A линию репортерных клеток TF-1 NF- $\kappa$ B (Amgen) стимулируют растворимым или мембраносвязанным TL1A человека или растворимым TL1A яванского макака. 0,2-3 нМ или 2-20 нМ растворимого TL1A человека или яванского макака (соответственно) инкубируют с  $10^4$ - $10^5$  репортерных клеток TF-1 NF- $\kappa$ B в присутствии последовательно разведенных супернатантов гибридомы (или контроля) на 96- или 384-луночных планшетах при 37°C в течение ночи. Для тестирования образцов против мембраносвязанного TL1A, анализ активности проводят путем совместного культивирования линии репортерных клеток TF-1 NF- $\kappa$ B с экспрессирующими TL1A человека клетками AM1D.  $10^5$  репортерных клеток TF-1 NF- $\kappa$ B и  $10^3$  клеток AM1D совместно культивируют в присутствии 5 мкг/мл антитела против TL1A (или контрольных) на 384-луночном планшете при 37°C в течение ночи. Сигнал репортера в каждой лунке определяют с применением системы анализа люциферазы Steady-Glo в соответствии с рекомендациями изготовителя (Promega).

Пример 8. Выделение молекул и секвенирование антител, блокирующих рецептор-лиганд TL1A.

РНК (общую или мРНК) очищают из лунок, содержащих клетки гибридомы, которые продуцируют нейтрализующие TL1A антитела, с применением набора Qiagen RNeasy mini или Invitrogen mRNA catcher plus. Очищенную РНК используют для амплификации генов варибельного участка (V) тяжелой и легкой цепи антитела с применением синтеза кДНК посредством обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР). Тяжелую цепь гамма полностью человеческого антитела получают с применением набора для ПЦР с обратной транскриптазой Qiagen One Step (Qiagen). Этот способ применяют для получения первой цепи кДНК из шаблона РНК, а затем для амплификации варибельного участка тяжелой цепи гамма с применением мультиплексной ПЦР (полный список праймеров, SEQ ID NO: 1191-1252, соответственно, см. в табл. 8.1). Специфический в отношении гамма-цепи 5'-праймер отжигают к сигнальной последовательности тяжелой цепи антитела, тогда как 3'-праймер отжигают к участку константного домена гамма. Полностью человеческую легкую цепь каппа получают с применением набора для ПЦР с обратной транскриптазой Qiagen One Step (Qiagen). Этот способ применяют для получения первой цепи кДНК из шаблона РНК, а затем для амплификации варибельного участка легкой

цепи каппа с применением мультиплексной ПЦР. Специфический в отношении легкой цепи каппа 5'-праймер отжигают к сигнальной последовательности легкой цепи антитела, в то время как 3'-праймер отжигают к участку константного домена каппа. Полностью человеческую легкую цепь лямбда получают с применением набора для ПЦР с обратной транскриптазой Qiagen One Step (Qiagen). Этот способ применяют для получения первой цепи кДНК из шаблона РНК, а затем для амплификации вариабельного участка легкой цепи лямбда с применением мультиплексной ПЦР. Специфический в отношении легкой цепи лямбда 5'-праймер отжигают к сигнальной последовательности легкой цепи, в то время как 3'-праймер отжигают к участку константного домена лямбда.

Аmplифицированную кДНК очищают ферментативно с применением экзонуклеазы I и щелочной фосфатазы, и последовательность очищенного продукта ПЦР определяют прямым секвенированием. Аминокислотные последовательности выводят из соответствующих последовательностей нуклеиновой кислоты биоинформативным способом. Для каждого образца гибридомы выполняют два дополнительных независимых, полных цикла ОТ-ПЦР амплификации и секвенирования, чтобы подтвердить, что любые наблюдаемые мутации не являются следствием ПЦР. Затем полученные аминокислотные последовательности анализируют для определения источника последовательностей зародышевой линии антител и для идентификации отклонений от последовательности зародышевой линии. Аминокислотные последовательности, соответствующие CDR секвенированных антител, выравнивают, и результаты такого выравнивания используют для группировки клонов по подобию.

Таблица 8.1

Мультиплексные праймеры, применяемые для амплификации генов V антитела

Тяжелая цепь	Последовательность 5'-3'	SEQ ID NO.
5' праймер	C ACC ATG GAC TGG ACC TGG AGG ATC	1191
	C ACC ATG GAC TGG ACC TGG AGC ATC	1192
	C ACC ATG GAC TGC ACC TGG AGG ATC	1193
	C ACC ATG GAC TGG ACC TGG AGA ATC	1194
	C ACC ATG GAC TGG ACC TGG AGG G	1195
	C ACC ATG GAC TGG ATT TGG AGG ATC C	1196
	C ACC ATG GAC ACA CTT TGC TCC ACG	1197
	C ACC ATG GAC ACA CTT TGC TAC ACA CTC C	1198
	C ACC ATG GAG TTT GGG CTG AGC TG	1199
	C ACC ATG GAA TTG GGG CTG AGC TG	1200
	C ACC ATG GAG TTG GGG CTG AGC TG	1201
	C ACC ATG GAA CTG GGG CTC CGC	1202
	C ACC ATG GAA TTT GGG CTG AGC TGG	1203
	C ACC ATG GAG TTG GGG CTG TGC TG	1204
	C ACC ATG GAG TTT GGG CTT AGC TGG	1205
	C ACC ATG GAG TTT TGG CTG AGC TGG	1206
	C ACC ATG AAA CAC CTG TGG TTC TTC CTC	1207
	C ACC ATG AAG CAC CTG TGG TTC TTC C	1208
	C ACC ATG AAA CAT CTG TGG TTC TTC CTT CTC	1209
	C ACC ATG GGG TCA ACC GCC ATC C	1210
C ACC ATG TCT GTC TCC TTC CTC ATC TTC	1211	
3' праймер	GCTGAGGGAGTAGAGTCCTGAGGACTGT	1212
Цепь каппа	Последовательность 5'-3'	SEQ ID NO.
5' праймер	C ACC ATG GAC ATG AGG GTC CCC G	1213
	C ACC ATG GAC ATG AGG GTC CCT GC	1214
	C ACC ATG GAC ATG AGG GTC CTC GC	1215
	C ACC ATG AGG CTC CCT GCT CAG C	1216
	C ACC ATG AGG CTC CTT GCT CAG CTT C	1217
	C ACC ATG GAA ACC CCA GCG CAG C	1218
	C ACC ATG GAA GCC CCA GCG CAG	1219
	C ACC ATG GAA GCC CCA GCT CAG	1220
	C ACC ATG GAA CCA TGG AAG CCC CAG	1221
	C ACC ATG GTG TTG CAG ACC CAG GTC	1222
	C ACC ATG GGG TCC CAG GTT CAC C	1223
	C ACC ATG TTG CCA TCA CAA CTC ATT GGG	1224
	C ACC ATG GTG TCC CCG TTG CAA TTC	1225
	3' праймер	ACCCGATTGGAGGGCGTTATCCACC

	C ACC ATG GCC TGG TCC CCT CTC	1227
	C ACC ATG GCC TGG TCT CCT CTC C	1228
	C ACC ATG GCC AGC TTC CCT CTC C	1229
	C ACC ATG GCC GGC TTC CCT CTC	1230
	C ACC ATG ACC TGC TCC CCT CTC C	1231
	C ACC ATG GCC TGG GCT CTG CTC	1232
	C ACC ATG GCC TGG GCT CTG CTC	1233
	C ACC ATG GCA TGG ATC CCT CTC TTC	1234
	C ACC ATG GCC TGG ACC GCT CTC	1235
	C ACC ATG GCC TGG ACC CCT CTC	1236
	C ACC ATG GCC TGG ATC CCT CTC C	1237
	C ACC ATG GCC TGG ACC GTT CTC C	1238
5' праймер	C ACC ATG GCA TGG GCC ACA CTC C	1239
	C ACC ATG GCC TGG ATC CCT CTA C	1240
	C ACC ATG GCC TGG GTC TCC TTC TAC	1241
	C ACC ATG GCC TGG ACC CAA CTC C	1242
	C ACC ATG GCT TGG ACC CCA CTC C	1243
	C ACC ATG GCC TGG ACT CCT CTC C	1244
	C ACC ATG GCC TGG ACT CCT CTT CTT C	1245
	C ACC ATG GCC TGG ACT CTT CTC CTT C	1246
	C ACC ATG GCC TGG GCT CCA CTA C	1247
	C ACC ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTT C	1248
	C ACC ATG GCC TGG ATG ATG CTT CTC C	1249
	C ACC ATG GCC TGG GCT CCT CTG	1250
	C ACC ATG CCC TGG GCT CTG CTC	1251
3' праймер	GGA GGG TKT GGT GGT CTC CAC TCC C	1252

(где К=G+Т).

Пример 9. Получение конструкций гетеро Ig.

Генерация биспецифического антитела посредством совместной экспрессии двух разных антител дает отходы, главным образом состоящие из неправильно спаренных тяжелых и легких цепей. Предпочтительная биспецифическая молекула гетеротетрамера с двумя разными тяжелыми цепями, соединенными с правильно спаренными легкими цепями, составляет лишь небольшую часть от общего количества комбинаций, которые могут быть собраны. Отходы возникают главным образом по двум причинам. Первая причина состоит в том, что тяжелая цепь, которая объединяется на участке Fc антитела, может гомодимеризоваться, что дает обычное моноспецифическое антитело, или гетеродимеризоваться, что дает потенциальное биспецифическое антитело. Вторая причина заключается в том, что легкая цепь не обладает разборчивостью и может спариваться с любой из тяжелых цепей, что приводит к ошибочной сборке Fab из легкой-тяжелой цепи, которая не может сохранить связывание с желаемой мишенью. По этим причинам конструирование биспецифических молекул является двухстадийным процессом. Первая цель состоит в предотвращении гомодимеризации тяжелых цепей и содействии гетеродимеризации. Это может быть достигнуто путем конструирования участка Fc антител с применением, например, стратегий выступов-во-впадинах или мутаций зарядовой пары. Вторая цель состоит в конструировании интерфейса легкой-тяжелой цепи таким образом, чтобы легкая цепь специфически связывалась только с составляющей ей пару тяжелой цепью.

В технологии платформы "Hetero-Ig" (см., например, WO2009089004 и WO2014081955, обе из которых таким образом включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме) используется преимущество электростатического управляющего механизма для преодоления упомянутых выше проблем спаривания. В частности, введенные или используемые заряженные остатки приводят к гетеродимеризации тяжелой цепи и правильному соединению легкой-тяжелой цепи. Мутации зарядовой пары (МЗП) в домене СН3 участка Fc приводят к гетеродимеризации двух разных тяжелых цепей через противоположные заряды, которые вызывают электростатическое притяжение (см., например, WO2009089004 и патент США № 8592562); две идентичные комбинации тяжелых цепей имеют одинаковые сопоставимые заряды и поэтому отталкиваются. Правильное спаривание тяжелой цепи-легкой цепи облегчается посредством МЗП на интерфейсе связывания HC/LC или интерфейсе связывания HC1/HC2 (см. фиг. 1). Правильные комбинации тяжелой цепи-легкой цепи будут иметь противоположные заряды и поэтому будут притягиваться друг к другу, тогда как неправильные комбинации тяжелой цепи-легкой цепи будут иметь одинаковые заряды, сопоставимые друг с другом, что приводит к отталкиванию. На фиг. 1 правильно собранные молекулы гетеро Ig содержат две или три МЗП HC1/HC2 и от двух до четырех МЗП HC/LC, которые направляют сборку предпочтительного гетеротетрамера, содержащего две разных тяжелых цепи и две разных легких цепи, таким образом, что гетеротетрамер будет основным компонентом, который генерируется системой экспрессии. ДНК, кодирующие анти-TL1A/анти-TNF- $\alpha$  гетеро Ig1, содержат фрагменты, кодирующие анти-TL1A (или анти-TNF- $\alpha$ ) тяжелую цепь и анти-TNF- $\alpha$  (или анти-

TL1A) Fab. ДНК клонируют в вектор рТТ5.1. Эти векторы экспрессии в дальнейшем применяют для трансфекции и экспрессии биспецифических молекул анти-TL1A/анти-TNF- $\alpha$  в клетках человека 293 6Е.

Антитела против TNF- $\alpha$  3.2, 234 и сертолизумаб применяют с антителами против TL1A 3В3, 2G11, 23В3 VН3, 23В3 VН4 и 3С6 для конструирования молекул гетеро Ig, как описано в табл. J, с применением высокопроизводительного клонирования, экспрессии и очистки. Каждая из биспецифических молекул гетеро Ig имела один из четырех форматов, изображенных на фиг. 1, с применением лишнего эффекторных функций скаффолда IgG1 или скаффолда IgG2. Предпочтительные молекулы IgG содержат зарядовые мутации, изображенные на фиг. 1 (v2), которые представлены в табл. M. Лишенный эффекторных функций скаффолд IgG1 содержит замены R292C и V302C и может также содержать замену N297G (также известен как скаффолд SEFL2).

Пример 10. Способ экспрессии и очистки молекул анти-TL1A/анти-TNF- $\alpha$  гетеро-Ig.

Экспрессию гетеро Ig осуществляют с помощью временной трансфекции клеток 293-6Е. За один день до трансфекции культуру N-1 помещают в одноразовый биореактор фирмы Wave емкостью 20 л при 36-37°C, 5% CO<sub>2</sub>, переключив на 0,2 л/мин с общим объемом 9 л культуры при 8,5 E5 жизнеспособных клеток/мл в средах Freestyle F-17 (Thermo Fisher). Затем готовят трансфекционный комплекс путем смешивания среды FreeStyle F-17, предварительно нагретой с 0,5 мг/л ДНК для трансфекции, с соотношением цепей плазмидной ДНК 1:1:1:1. Объем трансфекционного комплекса (среды+ДНК+ПЭИ-реагент) составляет 10% от конечного объема культуры. Через четыре часа после трансфекции добавляют подкормку из дрожжей и глюкозы. Культуру собирают на шестой день при 2,11 E6 клеток/мл и жизнеспособности 78,2%. Титр экспрессии измеряют с применением системы ForteBio Octet Q при 84,0 мг/л. Кондиционированную среду собирают центрифугированием и фильтруют с применением фильтра из ацетата целлюлозы с размером пор 0,2 мкм, с применением перистальтического насоса.

Для очистки молекул гетеро-Ig применяют хроматографию аффинного захвата MabSelect SuRe (GE Life Sciences, Пискатауэй, штат Нью-Джерси), с применением Дульбекко-ФСБ без двухвалентных катионов (Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния) в качестве промывочного буфера и 100 мМ уксусной кислоты, pH 3,6, в качестве буфера для элюации (фиг. 3). Во всех случаях выделение проводят при температуре окружающей среды. Пик элюации объединяют на основе хроматограммы, нейтрализуют до pH 7,0 с помощью основания 2 М трис, разбавляют 5 объемами воды и фильтруют сквозь фильтр из ацетата целлюлозы с размером пор 0,22 мкм. Чтобы удалить половинки антител, образец далее загружают на колонку сефарозы SP-HP (GE Life Sciences, Пискатауэй, штат Нью-Джерси) и промывают 8 объемами колонки SP-Буфера А (20 мМ фосфата натрия, pH 7,0), а затем элюируют с градиентом 20 объемов колонки до 60% SP-Буфера В (20 мМ фосфата натрия, 1 М NaCl, pH 7,0) (фиг. 4). Пул получают на основе хроматограммы и анализа фракций Caliper LabChip (Perkin Elmer, Уолтхэм, штат Массачусетс) фракций. Пул кондиционируют равным объемом 2X буфера ХГВ (200 мМ фосфата натрия, 1,5 М сульфата аммония, pH 7,0) и фильтруют сквозь фильтр из ацетата целлюлозы с размером пор 0,2 мкм. Чтобы удалить неправильно спаренные молекулы, образец помещают на колонку с сефарозой Butyl-HP (GE Life Sciences, Пискатауэй, штат Нью-Джерси) и промывают 8 объемами колонки Butyl Буфера А (50 мМ фосфата натрия, 0,75 М сульфата аммония, pH 7,0) с последующей элюацией с применением градиента 20 объемов колонки до 100% Butyl Буфера В (50 мМ фосфата натрия, pH 7,0) (фиг. 5). Пул получают на основе хроматограммы и анализа фракций Caliper LabChip (Perkin Elmer, Уолтхэм, штат Массачусетс) в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях. Пул обрабатывают диализацией против около 30 объемов 10 мМ ацетата натрия, 9% сахарозы, pH 5,2, с применением диализных кассет Slide-A-Lyzer с пороговым значением мембраны 10 кДа (Pierce, Рокфорд, штат Иллинойс) и далее концентрируют с помощью центрифужного концентратора Vivaspin-20 с пороговым значением мембраны 10 кДа (Sartorius Stedim Biotech, Геттинген, Германия). Затем концентрированный материал фильтруют сквозь фильтр из ацетата целлюлозы с размером пор 0,8/0,2 мкм, и концентрацию определяют по поглощению на длине волны 280 нм с применением коэффициента экстинкции около 212000. Чистоту образцов определяют анализом Caliper LabChip в восстанавливающих (с 2% 2-меркаптоэтанола) и невосстанавливающих (с 25 мМ йодацетамида) условиях (фиг. 6). Аналитическую ЭХ проводят с применением колонки Zenix-C SEC-300 (Serax Technologies, Ньюарк, штат Делавэр) с изократической элюацией в 50 мМ фосфате натрия, 250 мМ NaCl, pH 6,9, на 18 дюймах (фиг. 7).

Для оценки как целостности гетеро Ig, так и подтверждения спаривания тяжелой цепи-легкой цепи, проводили ЖХ-МС на невосстановленных гетеро Ig, а также на гетеро Ig после ограниченной лизилэндопротеиназы С (Wako, Ричмонд, штат Вирджиния) для получения участков гетеро-Ig Fab (антигенсвязывающий фрагмент) гетеро Ig. Анализ невосстановленного гетеро-Ig проводят простым разведением 30 мкг нативного образца гетеро-Ig, 1:1 в 0,1% ТФУ с инъекцией 20 мкг. Анализ Fab проводят путем инкубации гетеро-Ig в присутствии лизилэндопротеиназы С, с применением соотношения фермент/субстрат 1:400, в присутствии 100 мМ Трис, с коррекцией pH до 8, в течение 30 мин при 37°C. Затем реакцию останавливают разбавлением равным объемом 0,1% ТФУ. Начальное расщепление антитела лизилэндопротеиназой С находится чуть выше дисульфидных связей шарнира после лизина в мотиве последовательности SCDK/ТНТСРРС, что дает фрагменты Fab и Fc.

Анализ массы проводят с применением масс-спектрометра Agilent 6230 ИЭР-ВП и четырехкомпонентной системы ВЭЖХ 1260, оснащенной колонкой Zorbax 300SB-C8, 2,1×50 мм 3,5 мкм (Agilent, Санта-Клара, штат Калифорния). Подвижная фаза А состоит из 0,1% ТФУ, а подвижная фаза В состоит из 90% н-пропанола, 0,1% ТФУ в воде. Условия хроматографического градиента для анализа невосстановленного гетеро-Ig следующие: 20% подвижной фазы В в течение 1 мин; 1-9 мин, 20-70% В; 9-10 мин, 70-100% В; 10-11 мин, 100% В. Температуру колонки поддерживают на уровне 75°C и постколоночное уравнивание при 20% подвижной фазы В проводят в течение 7 мин перед инъекцией следующего образца. Параметры ИЭР-ВП следующие: капиллярное напряжение, 5900 В; температура газа, 340°C; сухой газ, 13 л/мин; давление распылителя, 25 фунт/кв.дюйм; напряжение фрагментора 460 В и напряжение скиммера, 95 В (фиг. 8).

Анализ гетеро-Ig, расщепленного лизилэндопротеиназой С, проводят путем инъекции 20 мкг на колонку обращенно-фазовой ВЭЖХ и элюации с применением следующего градиента ЖХ: 2% подвижной фазы выдерживают в течение 2 мин; 2-12 мин, 2-45% В; 12-16 мин, 45-90% В; 16-17 мин 90% В. Температуру колонки поддерживают на уровне 75°C, а постколоночное уравнивание при 20% подвижной фазы В проводят в течение 7 мин перед инъекцией следующего образца (фиг. 9).

Пример 11. Получение конструкций IgG-ScFv.

Каждый анти-TL1A/анти-TNF- $\alpha$  антигенсвязывающий белок IgG-scFv состоит из двух антигенсвязывающих доменов, один направлен против TL1A, а другой против TNF- $\alpha$ . ДНК, кодирующие анти-TL1A/анти-TNF- $\alpha$  IgG-scFv, содержат фрагменты, кодирующие анти-TL1A (или анти-TNF- $\alpha$ ) тяжелую цепь (HC), в которой С-конец слит с одноцепочечным Fv (scFv) анти-TNF- $\alpha$  (или анти-TL1A) антитела (см. фиг. 2) с цистеиновым зажимом или без него, с целью улучшения биофизических свойств. Чтобы ввести цистеиновый зажим, положения 44 (нумерация Кабата) VH и 100 (нумерация Кабата) VL мутированы до цистеина. ДНК клонируют в вектор pTT5.1. Указанные векторы экспрессии в дальнейшем используют для трансфекции и экспрессии анти-TL1A/анти-TNF- $\alpha$  биспецифических молекул в клетках человека 293-6E. Полноразмерные последовательности анти-TL1A/анти-TNF- $\alpha$  антигенсвязывающих белков IgG-scFv приведены в табл. L и M.

Пример 12. Способ очистки анти-TL1A/анти-TNF $\alpha$  молекул IgL-scFv.

Экспрессию IgG-ScFv выполняют посредством временного продуцирования в 293. За один день до трансфекции культуры помещают в восемь колб емкостью 5 л Thompson Ultra Yield общим объемом 2250 л культуры при концентрации 8,5E5 жизнеспособных клеток/мл в средах Freestyle F-17 (Thermo Fisher). Культуры выдерживают при 36-37°C, 5% CO<sub>2</sub> и встряхивании при 120 об/мин. Трансфекционный комплекс получают путем смешивания сред FreeStyle F-17 с 0,5 мг/л ДНК с применением 20% кодирующей плазмиды и 80% пустого вектора pTT5 и ПЭИ в конечном объеме 10% от объема культуры. Через четыре часа в каждую колбу добавляют подкормку с лизатом дрожжей и глюкозой. Через шесть дней после трансфекции клетки собирают путем центрифугирования, объединяют в пул и фильтруют. Средний титр по данным Forte Bio Octet составляет 25 мг/л.

Молекулы IgG-scFv обрабатывают хроматографией с аффинным захватом MabSelect SuRe (GE Life Sciences, Пискатауэй, штат Нью-Джерси), с применением ФСБ Дульбекко без двухвалентных катионов (Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния) в качестве промывочного буфера и 100 мМ уксусную кислоту, pH 3,6, как буфера для элюации (фиг. 10). Аффинное разделение проводят при температуре окружающей среды. Пик элюации объединяют на основе хроматограммы, нейтрализуют до pH 7,0 с помощью основания 2 М трис, разбавляют одним объемом 10 мМ цитрата, 75 мМ лизина, 4% трегалозы, pH 7,0, и концентрируют до около 20 мг/мл с помощью центрифужного концентратора Vivacell-100 с пороговым значением мембраны 30 кДа (Sartorius Stedim Biotech, Геттинген, Германия). Для удаления высокомолекулярных агрегатов образец фильтруют сквозь фильтр из ацетата целлюлозы с размером пор 0,8/0,2 мкм, затем помещают на препаративную колонку Superdex 200 (GE Life Sciences, Пискатауэй, штат Нью-Джерси), уравнивающую 10 мМ цитрата, 75 мМ лизина, 4% трегалозы, pH 7,0, и элюируют тем же буфером с изократическим градиентом (фиг. 11). Разделение гель-фильтрацией проводят при около 7°C. Пул получают на основе хроматограммы и аналитической ЭХ фракций с применением колонки Zenix-C SEC-300 (Sepax Technologies, Ньюарк, штат Делавэр). Пул дополнительно концентрируют с помощью центрифужного концентратора Vivaspin-20 с пороговым значением мембраны 30 кДа (Sartorius Stedim Biotech, Геттинген, Германия) и фильтруют сквозь фильтр из ацетата целлюлозы с размером пор 0,8/0,2 мкм. Концентрацию определяют по поглощению на длине волны 280 нм с применением коэффициента экстинкции около 341000. Чистоту образцов определяют методом анализа Caliper LabChip в восстанавливающих (с 2% 2-меркаптоэтанола) и невосстанавливающих (с 25 мМ йодацетамида) (фиг. 12) условиях. Аналитическую ЭХ проводят с помощью колонки Zenix-C SEC-300 (Sepax Technologies, Ньюарк, штат Делавэр) с изократической элюацией в 50 мМ фосфата натрия, 250 мМ NaCl, pH 6,9, на 18 дюймах (фиг. 13).

Из-за большого размера Ig-scFv - 200 кДа или более - в анализе массы ИЭР-ВП точная масса не была получена. В целях верификации массы и оценки качества, проводят анализ Ig-scFv после расщепления протеазой IdeS (Promega, Мэдисон, штат Висконсин), которая осуществляет расщепление немного ниже

дисульфидных связей шарнира IgG, между остатками глицина в мотиве последовательности СРРСРА-PELLG/GP, давая (Fab)<sub>2</sub> и Fc, слитый на своем С-конце с scFv. Ig-scFv инкубируют в присутствии протеазы IdeS с применением соотношения фермента/субстрата 1:10 в течение 1 ч при 37°C. Затем образец разбавляют 1:1 0,1% ТФУ и 20 мкг инжестируют для ЖХ-МС.

Анализ массы проводят с применением масс-спектрометра Agilent 6230 ИЭР-ВП и четырехкомпонентной системы ВЭЖХ 1260, оснащенной колонкой Zorbax 300SB-C8, 2,1×50 мм 3,5 мкм (Санта-Клара, штат Калифорния). Подвижная фаза А состоит из 0,1% ТФУ, а подвижная фаза В состоит из 90% н-пропанола, 0,1% ТФУ в воде. Анализ Ig-scFv, расщепленного протеазой IdeS, проводят путем инъекции 20 мкг и элюирования с применением следующего градиента ЖХ: 2% подвижной фазы выдерживают в течение 2 мин; 2-12 мин, 2-45% В; 12-16 мин, 45-90% В; 16-17 мин, 90% В. Температуру колонки поддерживают на уровне 75°C, а постколоночное уравнивание при 20% подвижной фазы В проводят в течение 7 мин перед инъекцией следующего образца (фиг. 14).

Пример 13. Анализ связывания с TL1A.

Козий анти-человеческий Fc (Jackson Lab, кат. № 109-005-098) вначале иммобилизируют на сенсорном чипе SCM5 с помощью аминного сочетания. Моноклональные антитела против TL1A, фрагмент Fab (с применением антитела против huFab, GE Healthcare, кат. № 28-9583-25) или анти-TL1A/анти-TNF-α биспецифические молекулы инжестируют на чип со скоростью 10 мкл/мин в течение 1 мин, различные белки TL1A человека или яванского макака от 0,78 до 25 нМ в буфере для образцов (ФСБ, 0,005% P20, 0,1 мг/мл БСА) инжестируют при скорости потока 50 мкл/мин для 3-минутной ассоциации, 10-минутной диссоциации. Скорость ассоциации, скорость диссоциации и равновесную константу диссоциации вычисляют с применением модели связывания 1:1 в программном обеспечении BIAevaluation.

В табл. 13.1-13.3 представлены данные связывания с TL1A для антител против TL1A, биспецифических антител гетеро Ig1 и биспецифических антител IgG-scFv.

Таблица 13.1

Связывание антител против TL1A с TL1A

mAb против TL1A	Белок №	SEQ ID NO:	TL1A человека			TL1A яванца		
			ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (M)	ka(1/Мс)	kd (1/с)	KD (M)
3C6	PL-39112	50, 52	НД	<5,0E-05	<1,0E-10	5,7E+05	1,4E-03	2,4E-09
Исходное 3В3	PL-39114	66, 68	4,0E+05	9,5E-05	2,4E-10	2,5E+05	1,4E-04	5,7E-10
5G4	PL-39115	455, 457	5,0E+05	1,8E-04	3,6E-10	2,9E+05	1,9E-04	6,6E-10
17E9	PL-39113	459, 461	2,5E+05	5,3E-05	2,2E-10	7,3E+05	2,0E-03	2,8E-09
9C8	PL-39116	58, 60	1,6E+05	5,3E-05	3,4E-10	9,4E+04	6,9E-05	7,3E-10
23B3	PL-36543	62, 64	4,7E+05	4,2E-04	8,9E-10	2,3E+05	3,2E-04	1,4E-09
2G11	PL-36544	54, 56	1,7E+05	1,8E-04	1,1E-09	6,6E+04	4,9E-05	7,3E-10
Вариант 3В3	PL-36552	130, 134	4,3E+05	2,2E-04	5,0E-10	2,8E+05	1,4E-04	5,0E-10

Таблица 13.2

## Связывание анти-TL1A фрагмента Fab с TL1A

Анти-TL1A Fab	Белок №	TL1A человека			TL1A яванца		
		ка (1/Мс)	kd (1/с)	KD (M)	ка (1/Мс)	kd (1/с)	KD (M)
3C6	PL-39193	НД	<5,0E-05	<1,0E-10	НС до 100 нМ		
Исходный 3В3	PL-39195	4,1E+05	1,6E-04	4,0E-10	3,5E+05	1,8E-04	5,1E-10
5G4	PL-39196	4,7E+05	3,3E-04	7,0E-10	4,4E+05	1,6E-04	3,7E-10
17E9	PL-39194	НД	<5,0E-05	<1,0E-10	НС до 100 нМ		
9C8	PL-39197	НД	<5,0E-05	<1,0E-10	НД	<5,0E-05	<1,0E-10
23В3	PL-38024	7,6E+05	6,4E-04	8,5E-10	5,3E+05	1,6E-04	3,1E-10
2G11	PL-38025	НД	<5,0E-05	<3,0E-10	НД	<5,0E-05	<1,0E-10
Вариант 3В3	PL-38026	3,8E+05	4,1E-04	1,1E-09	4,5E+05	5,6E-05	1,3E-10

Таблица 13.3

## Связывание биспецифических антител гетеро Ig с TL1A

iPS	анти-TNF	анти-TL1A	ка (1/Мс)	kd (1/с)	KD (M)
376541	Исходный сертолизумаб	вариант 3В3 (322520)	7,1E+05	2,1E-04	3,0E-10
376542	C234	вариант 3В3 (322520)	7,1E+05	2,1E-04	3,0E-10
376543	Вариант сертолизумаба	вариант 3В3 (322520)	7,2E+05	2,3E-04	3,2E-10
349461	Вариант сертолизумаба	вариант 2G11	5,4E+05	1,3E-04	2,5E-10
349463	Вариант сертолизумаба	23В3 VH4	6,3E+05	4,0E-04	6,4E-10
371222	3.2/CC	вариант 3В3 (322520)	6,6E+05	1,4E-04	2,1E-10

Пример 14. Анализ активности TL1A.

Анализ активности TL1A проводят с применением репортерной клеточной линии TF-1 NF-κB. Вкратце, 30 нг/мл (EC90) TL1A человека или яванского макака инкубируют с  $10^4$  репортерных клеток TF-1 NF-κB в присутствии последовательных разведений антител против TL1A или анти-TL1A/анти-TNF-α биспецифических молекул на 96-луночном планшете при 37°C в течение ночи. В каждую лунку добавляют 50 мкл раствора для тестирования люциферазы Steady-glo (Promega). Планшет накрывают и инкубируют при встряхивании в течение 10 мин. Активность люциферазы анализируют с помощью считывателя микробета.

В табл. 14.1-14.3 представлен контроль качества (КК) анти-TL1A и данные активности для антител против TL1A, биспецифических антител гетеро Ig, биспецифических антител IgG-scFv и Fab с TL1A человека и яванского макака.

Таблица 14.1

Анти-TL1A активность антител против TL1A и фрагментов Fab

mAb	mAb/Fab	huTL1A (0,2 нМ) NF-κB IC50 нМ	TL1A яванца (2 нМ) NF-κB IC50 нМ
3C6	mAb	0,153	>100
	Fab	0,162	>100
17E9	mAb	0,168	>100
	Fab	70,83	>100
3B3S65A	mAb	0,083	0,595
	Fab	0,178	0,434
3B3/7B3	mAb	0,037	0,390
	Fab	0,112	0,647
5G4	mAb	0,058	0,622
	Fab	2,838	10,06
2G11	mAb	0,223	0,938
	Fab	0,551	1,637
9C8	mAb	0,131	0,721
	Fab	2,434	2,748
23B3	mAb	0,089	0,619
	Fab	2,992	2,629

Таблица 14.2

КК и активность биспецифических антител гетеро Ig

iP S №					ЭХ- ВЭЖХ		Caliper						Актив ность	
	TL1A	TNF- α	Коне ч- ная конц .	Кон еч- ный вых од	В М	Осн о- вн ые	N R 1	N R 2	H C1	H C2	L C1	L C2	TL 1A (п М)	T NF - α ( п М)
37 65 41	Серголиз умаб (исходны й)	3B3 (вариан т)	12,05	295	0, 7	100, 3	7 2	2 8	42	5 8	51	49	187	5 1
34 94 61	Серголиз умаб (вариант)	2G11 (вариан т)	10,49	188	0,7	99,3	4 5	5 5	10 0	0	51	49	128 4	6 0
34 94 63	Серголиз умаб (вариант)	23B3 (VH4)	10,61	450	0, 6	99,4	6 3	3 7	50	5 0	33	67	346 4	6 4
37 65 42	C234	3B3 (вариан т)	9,76	174	0, 0	100, 0	7 1	2 9	44	5 6	50	50	147	5 4 4
37 65 43	Серголиз умаб (вариант)	3B3 (вариан т)	13,60	320	0, 4	99,6	7 5	2 5	43	5 7	51	49	158	1 0 7

КК и активность биспецифических антител IgG-scFv

iPS	IgG	scFv	Конечная конц.	Конечный выход	ЭХ-ВЭЖХ			Caliper				Активность	
					ВМ	Основные	Плечо	NR 1	NR 2	HC 1	LC1	TL1A (пМ)	TNF-α (пМ)
371213	TNF-α (адалиму маб)	TL1A (3B3 Вар2)	12,40	310	0,05	98,3	1,4	11	89	81	19	61	64
371217	TNF-α (C234)	TL1A (3B3 Вар 2/CC)	13,06	290	0,4	98,5	1,2	39	61	81	18	69	40
369989	TNF-α (адалиму маб)	TL1A (9C8)	13,83	199	0,3	98,1	1,1	27	73	76	18	140	59
369995	TNF-α (3.2)	TL1A (9C8)	15,81	217	1,0	97,9	1,6		100	80	17	199	53
370001	TNF-α (C234)	TL1A (9C8)	12,41	289	0,2	98,2	1,1	42	58	84	16	119	52
369992	TNF-α (адалиму маб)	TL1A (9C8/CC)	11,48	169	0,3	98,2	1,6	16	84	84	16	151	72
370004	TNF-α (C234)	TL1A (9C8/CC)	11,34	111	0,3	98,2	1,5	45	55	84	16	163	70
370013	TL1A (9C8)	TNF-α (3.2)	16,53	464	0,3	98,3	1,5	41	59	79	18	171	25
371219	TL1A (3B3 Вар2)	TNF-α (3.2)	10,9	197	0,4	98,1	1,4	100		70	20	53	22
371222	TL1A (3B3 Вар2)	TNF-α (3.2/CC)	20,07	157	0,2	98,3	1,5	100		78	18	86	26
370018	TL1A (23B3)	TNF-α (адалиму маб)	11,59	112	2,2	96,5	1,5	100		86	14	157	25
370021	TL1A (23B3)	TNF-α (адалиму маб /CC)	15,29	321	0,0	100,0	1,3	7	93	86	14	139	24

Пример 15. Анализ связывания с TNF-α.

Козий анти-человеческий Fc вначале иммобилизируют на сенсорном чипе SCM5 с помощью аминокислотного сочетания. Моноклональные антитела против TNF, фрагмент Fab или TL1A/TNF биспецифические молекулы инжестируют на чип со скоростью 10 мкл/мин в течение 1 мин. Различные белки TNF человека или яванского макака от 0,78 до 25 нМ в буфере для образцов (ФСБ, 0,005% P20, 0,1 мг/мл БСА) инжестируют при скорости потока 50 мкл/мин для 3-минутной ассоциации, 10-минутной диссоциации. Скорость ассоциации, скорость диссоциации и равновесную константу диссоциации вычисляют с применением модели связывания 1:1 в программном обеспечении BIAevaluation.

В табл. 15.1-15.3 активности связывания с TNF-α для антител против TNF-α, биспецифических антител гетеро Ig, биспецифических антител IgG-scFv и биспецифических антител IgG-Fab.

Таблица 15.1

Активность связывания антител и фрагмента Fab против TNF- $\alpha$  с TNF- $\alpha$ 

		TNF- $\alpha$ человека			TNF- $\alpha$ яванского макака		
		$k_a$ (1/MC)	$k_d$ (1/c)	KD (M)	$k_a$ (1/MC)	$k_d$ (1/c)	KD(M)
3.2	mAb	1,5E+06	7,3E-05	4,8E-11	9,0E+05	9,9E-05	1,1E-10
	Fab		<5,0E-5			<5,0E-5	
4.14	mAb	5,3E+05	6,1E-05	1,2E-10	3,5E+05	1,0E-04	2,9E-10
	Fab		<5,0E-5			<5,0E-5	
234	mAb	1,5E+06	7,9E-05	5,2E-11	1,2E+06	1,0E-04	8,7E-11
	Fab		<5,0E-5			<5,0E-5	
Адали- муаб	mAb	7,1E+05	6,1E-05	8,6E-11	6,4E+05	5,5E-05	8,7E-11
	Fab	4,5E+05	1,4E-04	3,2E-10	3,6E+05	8,1E-05	2,3E-10
Сертоли- зумаб пэггол	Пэг-Fab	3,9E+06	6,2E-05	1,6E-11	6,4E+06	2,2E-03	3,5E-10

Таблица 15.2

Активность связывания биспецифических антител гетеро Ig с TNF- $\alpha$ 

iPS	Серия	анти-TNF- $\alpha$	анти-TL1A	$k_a$ (1/Mc)	$k_d$ (1/c)	KD (M)
376541	PL-42786	Сертолизумаб исходный	вариант 3B3 (322520)	3,2E+06	4,4E-05*	1,4E-11
376542	PL-42789	C234	вариант 3B3 (322520)	2,3E+06	1,1E-04	4,8E-11
376543	PL-42790	Сертолизумаб вариант	вариант 3B3 (322520)	3,6E+06	5,5E-05	1,6E-11
349461	PL-42787	Сертолизумаб вариант	вариант 2G11	3,4E+06	6,4E-05	1,9E-11
349463	PL-42788	Сертолизумаб вариант	23B3 VH4	3,4E+06	5,5E-05	1,6E-11

Таблица 15.3

Активность связывания биспецифических антител IgG-scFv с TNF- $\alpha$ 

iPS	Серия	IgG	scFV	$k_a$ (1/Mc)	$k_d$ (1/c)	KD (M)
369989	PL-42765	TNF- $\alpha$ (Адалимуаб)	TL1A (9C8)	1,2E+06	7,6E-05	6,6E-11
369992	PL-42770	TNF- $\alpha$ (Адалимуаб)	TL1A (9C8/CC)	1,2E+06	8,4E-05	7,3E-11
369995	PL-42779	TNF- $\alpha$ (3.2)	TL1A (9C8)	1,7E+06	7,7E-05	4,4E-11
370001	PL-42767	TNF- $\alpha$ (C234)	TL1A (9C8)	1,7E+06	9,9E-05	5,9E-11
370004	PL-42785	TNF- $\alpha$ (C234)	TL1A (9C8/CC)	1,7E+06	1,0E-04	5,9E-11
370013	PL-42781	TL1A (9C8)	TNF- $\alpha$ (3.2)	1,3E+06	8,8E-05	6,5E-11

370018	PL-42763	TL1A (23B3)	TNF- $\alpha$ (Адалимумаб)	1,1E+06	5,3E-05	5,0E-11
370021	PL-42778	TL1A (23B3)	TNF- $\alpha$ (Адалимумаб /CC)	1,1E+06	4,9E-05*	4,5E-11
371213	PL-42771	TNF- $\alpha$ (Адалимумаб)	TL1A (3B3.322520/CC)	1,3E+06	8,2E-05	6,5E-11
371217	PL-42782	TNF- $\alpha$ (C234)	TL1A (3B3.322520/CC)	1,9E+06	8,8E-05	4,8E-11
371219	PL-42774	TL1A (3B3.322520)	TNF- $\alpha$ (3.2)	1,3E+06	5,5E-05	4,2E-11
371222	PL-42783	TL1A (3B3.322520)	TNF- $\alpha$ (3.2/CC)	1,3E+06	6,3E-05	4,7E-11

Пример 16. Анализы активности TNF- $\alpha$ .

Анализ активности TNF- $\alpha$  проводят с применением репортерной клеточной линии TF-1 NF- $\kappa$ B. Вкратце, 1 нг/мл (EC<sub>90</sub>) TNF- $\alpha$  человека или яванского макака инкубируют с 10<sup>4</sup> репортерных клеток TF-1 NF- $\kappa$ B в присутствии последовательных разведений антител против TNF- $\alpha$  или TL1A/-TNF- $\alpha$  биспецифических молекул на 96-луночном планшете при 37°C в течение ночи. В каждую лунку добавляют 50 мкл раствора для тестирования люциферазы Steady-glo (Promega). Планшет накрывают и инкубируют при встряхивании в течение 10 мин. Активность люциферазы анализируют с помощью считывателя микробета.

В табл. 16.1 представлен контроль качества (КК) анти-TNF- $\alpha$  и данные активности для антител против TNF. В табл. 14.2 и 14.3 представлена активность связывания с TNF- $\alpha$  биспецифических антигенсвязывающих белков гетеро Ig и биспецифических антигенсвязывающих белков IgG-scFv, соответственно.

Таблица 16.1

Анти-TNF- $\alpha$  активность антител против TNF- $\alpha$  и фрагментов Fab

Обозначение антитела	Модалность	TNF человека (20 пМ) IC50 (пМ) NF $\kappa$ B	TNF яванского макака (20 пМ) IC50 (пМ) NF $\kappa$ B
3.2	mAb	75	334
	Fab	367	2950
4.14	mAb	127	739
	Fab	526	3105
234	mAb	74	138
	Fab	825	2027
адалимумаб	mAb	119	180
	Fab	670	1800
сертолизумаб пэгол	Пэг-Fab	91	1,38 мкМ

Пример 17. Активность биспецифических молекул.

Активность связывания биспецифических антигенсвязывающих белков с TL1A и TNF- $\alpha$  человека и яванского макака определяют, как описано в примерах 13 и 15. Данные приведены в табл. 17.1.

Таблица 17.1

Активность связывания с TL1A и TNF человека и яванского макака

Образцы	Активный фрагмент против TL1A	Активный фрагмент против TNF- $\alpha$	iPS №	Связывание с TL1A (Kd пМ)		Связывание с TNF (Kd пМ)	
				Hu TL1A	TL1A яванца	Hu TNF	TNF яванца
Гетеро-Ig	3B3 V2	сертолизумаб	376543	11	26	12	210
IgG-scFv	9C8/CC	адалимумаб	381505	120	150	21	33
IgG-scFv	9C8/CC	C234	381489	160	94	10	19
IgG-scFv	3B3 V2/CC	адалимумаб	381513	1,8	6,6	19	23

Блокирующую активность биспецифических антигенсвязывающих белков против TL1A и TNF- $\alpha$  человека и яванского макака определяют, как описано в примерах 14 и 16. Данные приведены в табл. 17.2.

Таблица 17.2

Блокирующая активность против TL1A и TNF- $\alpha$  человека и яванского макака

Образцы	Активный фрагмент против TL1A	Активный фрагмент против TNF- $\alpha$	iPS №	Анализ TL1A IC50 пМ			Анализ TNF IC50 пМ		
				растворимый hu	мем hu	растворимый яванца	растворимый hu	мем hu	растворимый яванца
Гетеро-Ig	3B3 V2	сертолизумаб	376543	45,5	50,1	49,7	101,1	942,6	0,9 $\mu$ M
IgG-scFv	9C8/CC	адалимумаб	381505	52,2	46,5	45,3	72,9	719,5	96,4
IgG-scFv	9C8/CC	C234	381489	66,7	46,3	62,6	95,8	639,2	157,2
IgG-scFv	3B3 V2/CC	адалимумаб	381513	35,6	19,2	23,7	69,7	906,3	91,3

Пример 18. Генотипирование ОНП.

Для оценки потенциальной связи генотипов TL1A с экспрессией, геномная ДНК (гДНК) была выделена у здоровых доноров МПК с помощью набора Gentra Puregene Tissue от Qiagen. Геномную ДНК генотируют с применением анализов генотипирования ОНП TaqMan для rs7848647, rs6478109, rs6478108 и rs3810936 анализов от LifeTech и стандартных протоколов на платформе цифровой капельной ПЦР Bio-Rad. Вкратце, 10 нг гДНК от каждого донора смешивают с dnPCR<sup>TM</sup> Supermix для зондов (Bio-Rad) и анализом генотипирования ОНП TaqMan (LifeTech) для каждого представляющего интерес ОНП. Капли генерируют для каждой реакции с применением генератора капель QX100<sup>TM</sup> (Bio-Rad) и подвергают циклической термообработке на термоблоке для проведения реакций C1000 Touch<sup>TM</sup> (Bio-Rad). После амплификации флуоресценцию капель считывают на капельном считывателе QX100<sup>TM</sup> (Bio-Rad), и данные анализируют с применением программного обеспечения QuantaSoft (Bio-Rad). Доноров относят к гомозиготному гаплотипу риска, если только аллели риска присутствуют во всех 4 генотипированных ОНП (rs7848647, rs6478109, rs6478108 и rs3810936). Доноров относят к гомозиготному безрисковому гаплотипу, если во всех 4 генотипированных ОНП присутствуют только безрисковые аллели. Доноров относят к гетерозиготному гаплотипу, если как аллели риска, так и безрисковые аллели присутствуют во всех 4 генотипированных ОНП. У доноров, которых относят к "рекомбинантным", присутст-

вуют только гомозиготные аллели риска в rs7848647, rs6478109 и rs6478108, но они являются гетерозиготными (присутствуют аллели риска и безрисковые аллели) по rs3810936.

Наличие синонимических ОНП (rs3810936) в экзоне 4 гена TL1A позволило нам отслеживать экспрессию аллелей риска против безрисковых аллелей при помощи цифровой капельной ПЦР (цкПЦР) с применением аллельспецифических флуоресцентных зондов в исследовании дисбаланса экспрессии аллелей (ДЭА). Частоту использования аллелей риска по сравнению с безрисковыми аллелями в гетерозиготных МПК на базальном уровне или после стимуляции иммунным комплексом оценивали в различные моменты времени. Вкратце, МПК, гетерозиготные по генотипу TL1A, обрабатывают иммунным комплексом на протяжении различных промежутков времени. Затем РНК выделяют из МПК с применением набора RNeasy mini с одноклоночным расщеплением ДНКазой I от Qiagen. РНК из каждого образца превращают в кДНК с применением высокопродуктивного набора для обратной транскрипции кДНК в соответствии с инструкциями производителя (LifeTech). Аллельспецифическую экспрессию при rs3810936 определяют с применением анализа для генотипирования ОНП TaqMan, специфического в отношении rs3810936 (LifeTech) и стандартных протоколов на платформе цифровой капельной ПЦР Bio-Rad. Вкратце, количество кДНК на входе вначале оптимизируют для экспрессии TNFSF15 в каждый момент времени, чтобы повысить точность, максимизировав количество положительных капель, подсчитываемое для каждого образца программным обеспечением QuantaSoft. Оптимальное количество кДНК на образец смешивают с ddPCR™ Supermix для зондов (Bio-Rad) и анализом для генотипирования ОНП TaqMan (LifeTech) для rs3810936. Капли генерируют для каждой реакции с применением генератора капель QX100™ (Bio-Rad) и подвергают циклической термообработке на термоблоке для проведения реакций C1000 Touch™ (Bio-Rad). После амплификации флуоресценцию капель считывают на капельном считывателе QX100™ (Bio-Rad). Данные анализируют с применением программного обеспечения QuantaSoft (Bio-Rad) и определяют количество копий/мл каждого аллеля в rs3810936. Соотношение экспрессии аллелей вычисляют путем деления количества копий аллеля риска /мл на количество копий безрискового аллеля /мл. Общее количество копий каждого аллеля нормализуют по количеству кДНК на входе (количество копий/нг), а кратность индукции для каждого аллеля в каждый момент времени вычисляют путем деления количества копий/нг в интересующий момент времени на начальное значение количества копий/нг (0 ч). В исследовании дисбаланса экспрессии аллелей наблюдалась более высокая степень индукции аллеля риска TL1A в МПК после обработки иммунным комплексом, по сравнению с безрисковым аллелем в гетерозиготных МПК.

Изобретатель(-и) идентифицировал(-и) небольшое количество доноров, гомозиготных по аллелям риска в rs7848647, rs6478109 и rs6478108, но гетерозиготных по rs3810936, вероятно, из-за рекомбинации между rs6478109 и синонимическим ОНП rs3810936. Поскольку эти доноры являются гетерозиготными по синонимическому ОНП rs381093, изобретатель(-и) могут отслеживать использование аллелей риска и безрисковых аллелей и оценивать, сохранялся ли у этих доноров по-прежнему дисбаланс экспрессии аллелей. Интересно, что по сравнению с гетерозиготными донорами у указанных рекомбинантных индивидуумов не было обнаружено дисбаланса экспрессии аллелей до или после стимуляции иммунным комплексом. Это демонстрирует, что синонимический ОНП rs381093 сам по себе не несет ответственности за регулирование дисбаланса аллелей. Регуляторные ОНП, вероятно, происходят из rs7848647, rs6478109, rs6478108 и/или других ОНП, расположенных в направлении 5' относительно синонимического ОНП rs3810936.

Чтобы оценить, коррелируют ли данные дисбаланса экспрессии аллелей TL1A с экспрессией локусов количественных признаков (ЭЛКП), донорам МПК с гомозиготным аллелем риска TL1A, гомозиготными безрисковыми аллелями или гетерозиготными аллелями вводили иммунный комплекс. РНК из каждого образца выделяют и затем превращают в кДНК, как было описано ранее. Общую экспрессию TL1A (TNFSF15) у каждого донора определяют с помощью цифровой ПЦР. Вкратце, кДНК из каждого образца смешивали с ddPCR™ Supermix для зондов (Bio-Rad) и анализом PrimeTime® (кПЦР) ID Hs.PT.56a.41003970. Капли генерируют для каждой реакции с применением генератора капель QX100™ (Bio-Rad) и подвергают циклической термообработке на термоблоке для проведения реакций C1000 Touch™ (Bio-Rad). После амплификации флуоресценцию капель считывают на капельном считывателе QX100™ (Bio-Rad). Данные анализируют с применением программного обеспечения QuantaSoft (Bio-Rad), а количество копий TL1A/мкл определяют и нормируют по количеству кДНК на входе (количество копий/нг). Значения P для различий в уровнях экспрессии TL1A между различными гаплотипами TNFSF15 определяют с применением t-критерия Стьюдента. TL1A экспрессируется на очень низком базальном уровне в МПК, но в высокой степени индуцируется после стимуляции иммунным комплексом. На базальном уровне, МПК доноров, гомозиготных по ОНП риска TL1A, содержат меньше мРНК TL1A по сравнению с гомозиготными безрисковыми донорами, хотя при очень низком количестве копий, что согласуется с данными исследования дисбаланса экспрессии аллелей, которое продемонстрировало более низкое соотношение аллеля риска по сравнению с безрисковым аллелем без стимуляции. Однако после стимуляции иммунным комплексом в МПК доноров, гомозиготных по ОНП риска TL1A, присутствует более высокая экспрессия TL1A по сравнению с гомозиготными безрисковыми донорами. изобре-

татель(-и) предполагают, что при таких воспалительных состояниях, как ВЗК, у доноров, несущих ОНП риска TL1A, скорее всего, развивается более высокая степень индукции TL1A после столкновения со стимулами, такими как цитокины, опсонизированные или неопсонизированные микробы.

Таким образом, ОНП риска TL1A можно использовать для стратификации пациентов для ингибитора TL1A или анти-TL1A/анти-TNF- $\alpha$  биспецифических ингибиторов.

Чтобы оценить, является ли регуляция экспрессии, опосредованная генотипом TL1A, специфичной для тканей, клетки HUVeC от разных доноров были генотипированы, как было описано ранее. Генотипированные клетки HUVeC от разных доноров обрабатывают IL-1 в различные моменты времени. Общее количество копий каждого аллеля измеряют, как было описано ранее. Соотношение экспрессии аллелей вычисляют путем деления количество копий аллеля риска/мл на количество копий безрискового аллеля/мл. В клетках HUVeC не наблюдался дисбаланс экспрессии аллелей, с обработкой IL-1 или без нее.

Пример 19. Мышиные модели ВЗК.

Для оценки роли TL1A в ВЗК была проведена серия доклинических экспериментов на мышиных моделях ВЗК. Влияние ингибирования TL1A оценивали на модели спонтанного колита у мышей *mdr1a*<sup>-/-</sup>. Ген *Mdr1a* кодирует ген устойчивости ко множественным лекарственным средствам для Р-гликопротеина 170. Мыши с нокаутом гена *mdr1a* склонны к развитию спонтанного колита с 12-недельного возраста из-за ослабленного кишечного барьера. Течение заболевания болезни зависит от кишечных микробов. В нашем эксперименте самки *Mdr1a*<sup>-/-</sup> или контрольные животные дикого типа FVB были получены от Taconic в возрасте 4-6 недель. Массу тела животных и активность клинического заболевания регулярно контролировали. Оценку активности клинического заболевания осуществляют при помощи суммирования полученных баллов оценки анального воспаления (0=отсутствует, 1=легкое, 2=умеренное, 3=тяжелое, 4=ректальный пролапс) и консистенции стула (0=нормальный, 1=влажный/липкий, 2=мягкий, 3=диарея, 4=с примесью крови). Мышей (n=10, возраст 6-7 недель) рандомизируют в разные группы на основании исходных показателей активности клинического заболевания и лечат внутрибрюшинным введением один раз в неделю 500 мкг антитела против мышиного TL1A, антитела против IL23p19, антитела против мышиного IL17RA или мышиного контрольного изотипа или оставляют без еженедельного лечения на протяжении 8 недель. Затем мышей умерщвляют, получают срезы кишечника и обрабатывают, окрашивая Г&Э, перед оценкой баллов заболевания патологоанатомом. Следующий балл определяют на основании гистопатологии: 0=нормальный; 1=минимальный, инфильтрация моноядерными клетками и/или эпителиальная гипертрофия/гиперплазия; 2=легкий, инфильтрация моноядерными клетками и/или эпителиальная гипертрофия/гиперплазия; 3=умеренный, инфильтрация моноядерными клетками и/или эпителиальная гипертрофия/гиперплазия с редкими абсцессами крипт; 4=выраженный, то же, что для 3, плюс обильные абсцессы крипт и выпадение крипт и/или очаговое изъязвление; 5=тяжелый, то же, что для 4, но с большими участками выпадения крипт и/или обширными участками изъязвления. Статистический анализ проводят с применением одностороннего ANOVA с критерием Даннетта по сравнению с группой mIgG1. В заключение, профилактическое лечение mAb против TL1A ингибировало спонтанное развитие колита у мышей *mdr1a*<sup>-/-</sup>.

Кроме того, изобретатель(-и) оценивали, будет ли введение белка TL1A усугублять развитие колита у мышей *mdr1a*<sup>-/-</sup>, которые склонны к развитию спонтанного колита с 12-недельного возраста из-за ослабленного кишечного барьера. Мышам *mdr1a*<sup>-/-</sup> или контрольным мышам дикого типа в возрасте 6-8 недель вводят внутрибрюшинно один раз в неделю 150 мкг рекомбинантного гибридного белка mFc-TL1A или контрольный изотип три раза в неделю в течение 4 недель. Мониторинг активности клинического заболевания осуществляют путем оценки анального воспаления и консистенции стула, как было описано ранее. Через 4 недели лечения мышей умерщвляют, получают срезы кишечника и обрабатывают, окрашивая Г&Э, перед оценкой баллов заболевания, как было описано ранее. Статистический анализ проводят с применением одностороннего ANOVA с критерием Даннетта по сравнению с группой mIgG1. Введение белка TL1A значительно усугубляет развитие колита у мышей *mdr1a*<sup>-/-</sup>, но не у мышей дикого типа.

Изобретатель(-и) дополнительно исследовал(-и) влияние введения TL1A на лимфоциты собственной пластинки слизистой оболочки у мышей *mdr1a*<sup>-/-</sup> по сравнению с мышами дикого типа. Вкратце, лимфоциты собственной пластинки слизистой оболочки выделяют, как было описано ранее (D'Souza WN et al., J, V168: 5566-5572, 2002). Вкратце, кишечник извлекают, разрезают в продольном направлении, промывают буфером и разрезают на кусочки 0,5 см. Затем их дважды промывают ЭДТА и супернатанты отбрасывают. Кусочки промывают RPMI и инкубируют в коллагеназе/ДНКазе в течение 30 мин. Выделенные клетки пропускают через градиент перколла и клетки, собранные на интерфазе, окрашивают на предмет поверхностных антигенов и анализируют методом FACS. Введение TL1A у мышей *mdr1a*<sup>-/-</sup> привело к увеличению содержания воспалительных клеток в собственной пластинке слизистой оболочки.

Пример 20. Фармакодинамические исследования.

Чтобы оценить, вызывает ли введение TL1A и TNF сходные или различные фармакодинамические эффекты, мышам C57B1/6 (8 недель, самки) вначале вводят внутрибрюшинно 500 мкг/мышь антитело

против мышиноного TL1A, антитело против мышиноного TNF- $\alpha$  или ФСБ. Через 4 ч мышам вводят 100 мкг/мышь TL1A или 10 мкг/мышь TNF- $\alpha$  или оставляют без введения. Сыворотку собирают через 24 ч. Цитокины измеряют с помощью МСД (IL-22 измеряют с помощью ИФА). Введение белка TL1A или TNF у мышей приводило к индукции разных цитокинов. Введение TL1A индуцировало главным образом IFN- $\gamma$  и IL-5, тогда как введение TNF индуцировало IL-6, IL-8 и IL-10.

Изобретатель(-и) оценивали индукцию цитокинов в МПК человека при обработке TL1A или TNF. Вкратце, свежeweделенные МПК из крови человека культивируют в средах (RPMI1640 с добавлением 10% СТЭ, 2 мМ глутамин, 1 мМ пирувата натрия,  $5 \times 10^{-5}$  М 2-МЭ и антибиотиков) в присутствии 100 нг/мл TL1A или TNF-а человека. Супернатант собирают через 72 ч. Цитокины в супернатанте измеряют с помощью МСД (IL-22 измеряют с помощью ИФА). Подобно эксперименту с введением мышам, обработка TL1A МПК человека приводила к индукции IFN- $\gamma$ , IL-5 и IL-22, тогда как обработка TNF приводила к повышению уровня IL-8, IL-10 и MCP-1. Таким образом, TL1A и TNF индуцируют разные профили цитокинов в МПК человека.

Пример 21. Молекулы IgG-Fab.

Биспецифические антигенсвязывающие белки были получены с подмножеством антител против TNF $\alpha$  и антител против TL1A. В некоторых вариантах реализации такого формата IgG-Fab, полипептид, содержащий домен VH-CH1 из второго антитела, слит через пептидный линкер с карбокси-концом тяжелой цепи первого антитела с образованием модифицированной тяжелой цепи. Полипептид, содержащий остальные домены фрагмента Fab из первого антитела (т.е., домен VL-CL), экспрессируют совместно с легкой цепью первого антитела и модифицированной тяжелой цепью для получения полноразмерной молекулы. Сборка полноразмерной молекулы дает четырехвалентный связывающий белок, содержащий два антигенсвязывающих домена против первого антигена, расположенные на аминоконцевой стороне димеризованного участка Fc иммуноглобулина, и два антигенсвязывающих домена против второго антигена, расположенные на карбокси-концевой стороне димеризованного участка Fc.

TNF $\alpha$ /TL1A IgG-Fab состоит из двух антигенсвязывающих доменов, один направлен против TNF $\alpha$ , а другой против TL1A. Молекулы ДНК, кодирующие молекулы TNF $\alpha$ /TL1A IgG-Fab, содержат фрагменты, кодирующие легкую цепь антитела против TNF $\alpha$  (или против TL1A), тяжелую цепь антитела против TNF $\alpha$  (или против TL1A), слитую на своем С-конце с (i) легкой цепью антитела против TL1A (или против TNF $\alpha$ ) или (ii) анти-TL1A (или анти-TNF $\alpha$ ) Fd (VH-CH1) и третий полипептид, содержащий вторую половину фрагмента Fab для завершения карбокси-концевого связывающего домена; например, (i) анти-TL1A (или анти-TNF $\alpha$ ) Fd или (ii) легкую цепь антитела против TL1A (или против TNF $\alpha$ ). Биспецифические молекулы IgG-Fab содержат мутации зарядовой пары, вводимые в домены CH1 и CL каждого участка Fab (Fab 1 и Fab 2, как изображено на фиг. 3). Зарядовые пары предназначены для обеспечения предпочтительной сборки пары анти-TNFAR легкой цепи/VHCH1(Fd) и пары анти-TL1A легкой цепи/VHCH1 (Fd). В качестве дополнительного подхода, способствующего правильному спариванию пары легкой цепи/VHCH1 (Fd), для подмножества генерируемых молекул IgG-Fab, участки CL и CH1 в карбокси-концевом Fab (т.е., Fab 2) были поменяны местами таким образом, что полипептид, слитый с карбокси-концевым участком тяжелой цепи второго антитела, содержал участки VL и CH1 из первого антитела, а второй полипептид содержал участки VH и CL из первого антитела. См. молекулы, перечисленные в табл. 21.1 и 21.3, с CDR VL и VH, перечисленными в табл. 21.2A и 21.2B, и чистотой, указанной в табл. 21.4. Молекулы ДНК были получены синтезированными gBlock и клонированы в вектор pTT5.1. Такие векторы экспрессии используют для трансфекции и экспрессии биспецифических молекул TNF $\alpha$ /TL1A в клетках человека 293-6E. Получено 144 различных биспецифических молекулы IgG-Fab. Полноразмерные последовательности для каждой молекулы представлены в табл. 21.1 и в перечне последовательностей.

Молекулы IgG-Fab очищают с применением хроматографии с аффинным захватом MabSelect SuRe (GE Life Sciences, Пискатауэй, штат Нью-Джерси) при помощи широкоформатного автосамплера (LFAS, Amgen, Inc., Таузанд-Окс, штат Калифорния). Осветленные, кондиционированные среды помещают на колонку HiTrap MabSelect SuRe 1 мл (GE Life Sciences, Пискатауэй, штат Нью-Джерси), уравновешенную буферизованным фосфатом физиологическим раствором Дульбекко без двухвалентных катионов (Д-ФСБ, Life Technologies, Гранд-Айленд, штат Небраска). Колонки MabSelect промывают 8 объемами колонки Д-ФСБ и элюируют 100 мМ уксусной кислотой, pH 3,6. Если поглощение элюатов белка А на длине волны 280 нм составляет более чем 5 мЕП, (mAU) то элюент непосредственно помещают на обессоливающую колонку HiTrap (GE Life Sciences, Пискатауэй, штат Нью-Джерси) и обрабатывают 1,2 объемами колонки 10 мМ ацетата натрия, 150 мМ NaCl, pH 5.0. Если поглощение обессоленных элюатов на длине волны 280 нм составляет более чем 3 мЕП (mAU), то запускается сбор образцов, и фракции собирают в 96-луночные блоки с глубокими ячейками до максимального объема 2 мл каждой. Чистоту образца определяют анализом Caliper LabChip в восстанавливающих (с 2% 2-меркаптоэтанола) и невосстанавливающих (с 25 мМ йодацетамида) условиях. Аналитическую ЭХ проводят с применением колонки Zenix-C SEC-300 (Sepax Technologies, Ньюарк, штат Делавэр) с изократической элюацией в 50 мМ фосфате натрия, 250 мМ NaCl, pH 6,9, на 8 дюймах.

Молекулы IgG-Fab тестируют на предмет возможности экспрессии (титр и выход) и активность. Результаты представлены на фиг. 27-33 и в табл. 21.3. В табл. 21.3 и повсюду "ада" относится к адалимумабу.

Анализ активности TL1A проводят с применением репортерной клеточной линии TF-1 NF-κB. Вкратце, 30 нг/мл (EC<sub>90</sub>) TL1A человека или яванского макака инкубируют с 10<sup>4</sup> репортерных клеток TF-1 NF-κB в присутствии последовательных разведений антител против TL1A или TL1A/TNF-α биспецифических молекул на 96-луночном планшете при 37°C в течение ночи. В каждую лунку добавляют 50 мкл раствора для тестирования люциферазы Steady-glo (Promega). Планшет накрывают и инкубируют при встряхивании в течение 10 мин. Активность люциферазы анализируют с помощью считывателя микробета.

Анализ активности TNFα проводят с применением репортерной клеточной линии TF-1 NF-κB. Вкратце, 1 нг/мл (EC<sub>90</sub>) TNF-α человека или яванского макака инкубируют с 10<sup>4</sup> репортерных клеток TF-1 NF-κB в присутствии последовательных разведений антител против TNF-α или TL1A/TNFα биспецифических молекул на 96-луночном планшете при 37°C в течение ночи. В каждую лунку добавляют 50 мкл раствора для тестирования люциферазы Steady-glo (Promega). Планшет накрывают и инкубируют при встряхивании в течение 10 мин. Активность люциферазы анализируют с помощью считывателя микробета.

Таблица 21.1

## Аминокислотные последовательности анти-TL1A анти-TNF-α молекулы IgG-Fab

Обозначение молекулы (IPS №)	Источник IgG, источник Fab, ак замены	Легкая цепь 1 SEQ ID NO	Легкая цепь 2 SEQ ID NO	Тяжелая цепь SEQ ID NO
376597	001_Адалимумаб_IgG.001_3B3v2_VH_CH1(S183E)	1254	1256	1258
376601	002_Адалимумаб_IgG.001_9C8_VH_CH1(S183E)	1260	1262	1264

## 048161

376605	003_Адалимуаб_IgG.001_23B3_VH4_VH_CH1(S183E)	1266	1268	1270
376609	004_3.2_IgG.001_3B3v2_VH_CH1(S183E)	1272	1274	1276
376613	005_3.2_IgG.001_9C8_VH_CH1(S183E)	1278	1280	1282
376617	006_3.2_IgG.001_23B3_VH4_VH_CH1(S183E)	1284	1286	1288
376621	007_3B3v2_IgG.001_Адалимуаб_VH_CH1(S183E)	1290	1292	1294
376625	008_3B3v2_IgG.001_3.2_VH_CH1(S183E)	1296	1298	1300
376629	009_9C8_IgG.001_Адалимуаб_VH_CH1(S183E)	1302	1304	1306
376633	010_9C8_IgG.001_3.2_VH_CH1(S183E)	1308	1310	1312
376637	011_23B3_VH4_IgG.001_Адалимуаб_VH_CH1(S183E)	1314	1316	1318
376641	012_23B3_VH4_IgG.001_3.2_VH_CH1(S183E)	1320	1322	1324
376645	013_Адалимуаб_CK(S176K)_Fc_3B3v2_VH_CH1(S183E)	1326	1328	1330
376651	014_Адалимуаб_CK(S176K)_Fc_9C8_VH_CH1(S183E)	1332	1334	1336
376655	015_Адалимуаб_CK(S176K)_Fc_23B3_VH4_VH_CH1(S183E)	1338	1340	1342
376659	016_3.2_CL(S176K)_Fc_3B3v2_VH_CH1(S183E)	1344	1346	1348
376665	017_3.2_CL(S176K)_Fc_9C8_VH_CH1(S183E)	1350	1352	1354
376669	018_3.2_CL(S176K)_Fc_23B3_VH4_VH_CH1(S183E)	1356	1358	1360
376673	019_3B3v2_CK(S176K)_Fc_Адалимуаб_VH_CH1(S183E)	1362	1364	1366
376679	020_3B3v2_CK(S176K)_Fc_3.2_VH_CH1(S183E)	1368	1370	1372
376683	021_9C8_CK(S176K)_Fc_Адалимуаб_VH_CH1(S183E)	1374	1376	1378
376689	022_9C8_CK(S176K)_Fc_3.2_VH_CH1(S183E)	1380	1382	1384
376693	023_23B3_VH4_CK(S176K)_Fc_Адалимуаб_VH_CH1(S183E)	1386	1388	1390
376699	024_23B3_VH4_CK(S176K)_Fc_3.2_VH_CH1(S183E)	1392	1394	1396

## 048161

376703	025_Адалимуаб_IgG.001_3B3v2_VH_CK(S176E) NA	1398	1400	1402
376709	026_Адалимуаб_IgG.001_9C8_VH_CK(S176E)	1404	1406	1408
376715	027_Адалимуаб_IgG.001_23B3_VH4_VH_CK(S176E)	1410	1412	1414
376721	028_3.2_IgG.001_3B3v2_VH_CK(S176E)	1416	1418	1420
376725	029_3.2_IgG.001_9C8_VH_CK(S176E)	1422	1424	1426
376729	030_3.2_IgG.001_23B3_VH4_VH_CK(S176E)	1428	1430	1432
376733	031_3B3v2_IgG.001_Адалимуаб_VH_CK(S176E)	1434	1436	1438
376739	032_3B3v2_IgG.001_3.2_VH_CL(S176E)	1440	1442	1444
376745	033_9C8_IgG.001_Адалимуаб_VH_CK(S176E)	1446	1448	1450
376750	034_9C8_IgG.001_3.2_VH_CL(S176E)	1452	1454	1456
376755	035_23B3_VH4_IgG.001_Адалимуаб_VH_CK(S176E)	1458	1460	1462
376760	036_23B3_VH4_IgG.001_3.2_VH_CL(S176E)	1464	1466	1468
376765	037_Адалимуаб_CK(S176K)_Fc_3B3v2_VH_CK(S176E)	1470	1472	1474
376770	038_Адалимуаб_CK(S176K)_Fc_9C8_VH_CK(S176E)	1476	1478	1480
376775	039_Адалимуаб_CK(S176K)_Fc_23B3_VH4_VH_CK(S176E)	1482	1484	1486
376779	040_3.2_CL(S176K)_Fc_3B3v2_VH_CK(S176E)	1488	1490	1492
376784	041_3.2_CL(S176K)_Fc_9C8_VH_CK(S176E)	1494	1496	1498
376789	042_3.2_CL(S176K)_Fc_23B3_VH4_VH_CK(S176E)	1500	1502	1504
376793	043_3B3v2_CK(S176K)_Fc_Адалимуаб_VH_CK(S176E)	1506	1508	1510
376797	044_3B3v2_CK(S176K)_Fc_3.2_VH_CL(S176E)	1512	1514	1516
376801	045_9C8_CK(S176K)_Fc_Адалимуаб_VH_CK(S176E)	1518	1520	1522
376806	046_9C8_CK(S176K)_Fc_3.2_VH_CL(S176E)	1524	1526	1528

376811	047_23B3_VH4_CK(S176K)_Fc_Адалимумаб_VH_CK(S176E)	1530	1532	1534
376816	048_23B3_VH4_CK(S176K)_Fc_3.2_VH_CL(S176E)	1536	1538	1540
376821	059_Адалимумаб_IgG.002_3B3v2_VH_CH1(S183E).001	1542	1544	1546
376826	060_Адалимумаб_IgG.002_9C8_VH_CH1(S183E).001	1548	1550	1552
376830	061_Адалимумаб_IgG.002_23B3_VH4_VH_CH1(S183E).001	1554	1556	1558
376834	062_3.2_IgG.002_3B3v2_VH_CH1(S183E).001	1560	1562	1564
376868	063_3.2_IgG.002_9C8_VH_CH1(S183E).001	1566	1568	1570
376842	064_3.2_IgG.002_23B3_VH4_VH_CH1(S183E).001	1572	1574	1576
376846	065_3B3v2_IgG.002_Адалимумаб_VH_CH1(S183E).001	1578	1580	1582
376850	066_3B3v2_IgG.002_3.2_VH_CH1(S183E).001	1584	1586	1588
376854	067_9C8_IgG.002_Адалимумаб_VH_CH1(S183E).001	1590	1592	1594
376858	068_9C8_IgG.002_3.2_VH_CH1(S183E).001	1596	1598	1600
376862	069_23B3_VH4_IgG.002_Адалимумаб_VH_CH1(S183E).001	1602	1604	1606
376867	070_23B3_VH4_IgG.002_3.2_VH_CH1(S183E).001	1608	1610	1612
376872	071_Адалимумаб_CK(S176K)_Fc.001_3B3v2_VH_CH1(S183E).001	1614	1616	1618
376879	072_Адалимумаб_CK(S176K)_Fc.001_9C8_VH_CH1(S183E).001	1620	1622	1624
376884	073_Адалимумаб_CK(S176K)_Fc.001_23B3_VH4_VH_CH1(S183E).001	1626	1628	1630
376889	074_3.2_CL(S176K)_Fc.001_3B3v2_VH_CH1(S183E).001	1632	1634	1636
376896	075_3.2_CL(S176K)_Fc.001_9C8_VH_CH1(S183E).001	1638	1640	1642
376901	076_3.2_CL(S176K)_Fc.001_23B3_VH4_VH_CH1(S183E).001	1644	1646	1648
376906	077_3B3v2_CK(S176K)_Fc.001_Адалимумаб_VH_CH1(S183E).001	1650	1652	1654
376913	078_3B3v2_CK(S176K)_Fc.001_3.2_VH_CH1(S183E).001	1656	1658	1660

## 048161

376918	079_9C8_CK(S176K)_Fc.001_Адали мумаб_VH_CH1(S183E).001	1662	1664	1666
376925	080_9C8_CK(S176K)_Fc.001_3.2_V H_CH1(S183E).001	1668	1670	1672
376930	081_23B3_VH4_CK(S176K)_Fc.001 _Адалимумаб_VH_CH1(S183E).001	1674	1676	1678
376937	082_23B3_VH4_CK(S176K)_Fc.001 _3.2_VH_CH1(S183E).001	1680	1682	1684
376941	083_Адалимумаб_IgG.002_3B3v2_ VH_CK(S176E).001	1686	1688	1690
376948	084_Адалимумаб_IgG.002_9C8_VH _CK(S176E).001	1692	1694	1696
376955	085_Адалимумаб_IgG.002_23B3_V H4_VH_CK(S176E).001	1698	1700	1702
376962	086_3.2_IgG.002_3B3v2_VH_CK(S1 76E).001	1704	1706	1708
376967	087_3.2_IgG.002_9C8_VH_CK(S176 E).001	1710	1712	1714
376972	088_3.2_IgG.002_23B3_VH4_VH_C K(S176E).001	1716	1718	1720
376976	089_3B3v2_IgG.002_Адалимумаб_ VH_CK(S176E).001	1722	1724	1726
376983	090_3B3v2_IgG.002_3.2_VH_CL(S1 76E).001	1728	1730	1732
376990	091_9C8_IgG.002_Адалимумаб_VH _CK(S176E).001	1734	1736	1738
376995	092_9C8_IgG.002_3.2_VH_CL(S176 E).001	1740	1742	1744
377000	093_23B3_VH4_IgG.002_Адалимум аб_VH_CK(S176E).001	1746	1748	1750
377005	094_23B3_VH4_IgG.002_3.2_VH_C L(S176E).001	1752	1754	1756
377010	095_Адалимумаб_CK(S176K)_Fc.00 1_3B3v2_VH_CK(S176E).001	1758	1760	1762
377015	096_Адалимумаб_CK(S176K)_Fc.00 1_9C8_VH_CK(S176E).001	1764	1766	1768
377020	097_Адалимумаб_CK(S176K)_Fc.00 1_23B3_VH4_VH_CK(S176E).001	1770	1772	1774
377025	098_3.2_CL(S176K)_Fc.001_3B3v2_ VH_CK(S176E).001	1776	1778	1780
377030	099_3.2_CL(S176K)_Fc.001_9C8_V H_CK(S176E).001	1782	1784	1786
377035	100_3.2_CL(S176K)_Fc.001_23B3_ VH4_VH_CK(S176E).001	1788	1790	1792

## 048161

377040	101_3B3v2_CK(S176K)_Fc.001_Адалимумаб_VH_CK(S176E).001	1794	1796	1798
377045	102_3B3v2_CK(S176K)_Fc.001_3.2_VH_CL(S176E).001	1800	1802	1804
377050	103_9C8_CK(S176K)_Fc.001_Адалимумаб_VH_CK(S176E).001	1806	1808	1810
377055	104_9C8_CK(S176K)_Fc.001_3.2_VH_CL(S176E).001	1812	1814	1816
377060	105_23B3_VH4_CK(S176K)_Fc.001_Адалимумаб_VH_CK(S176E).001	1818	1820	1822
377064	106_23B3_VH4_CK(S176K)_Fc.001_3.2_VH_CL(S176E).001	1824	1826	1828
377068	117_Адалимумаб_IgG.003_3B3v2_VH_CH1(S183E).002	1830	1832	1834
377072	118_Адалимумаб_IgG.003_9C8_VH_CH1(S183E).002	1836	1838	1840
377077	119_Адалимумаб_IgG.003_23B3_VH4_VH_CH1(S183E).002	1842	1844	1846
377082	120_3.2_IgG.003_3B3v2_VH_CH1(S183E).002	1848	1850	1852
377087	121_3.2_IgG.003_9C8_VH_CH1(S183E).002	1854	1856	1858
377092	122_3.2_IgG.003_23B3_VH4_VH_CH1(S183E).002	1860	1862	1864
377097	123_3B3v2_IgG.003_Адалимумаб_VH_CH1(S183E).002	1866	1868	1870
377102	124_3B3v2_IgG.003_3.2_VH_CH1(S183E).002	1872	1874	1876
377107	125_9C8_IgG.003_Адалимумаб_VH_CH1(S183E).002	1878	1880	1882
3771112	126_9C8_IgG.003_3.2_VH_CH1(S183E).002	1884	1886	1888
377116	127_23B3_VH4_IgG.003_Адалимумаб_VH_CH1(S183E).002	1890	1892	1894
377121	128_23B3_VH4_IgG.003_3.2_VH_CH1(S183E).002	1896	1898	1900
377126	129_Адалимумаб_CK(S176K)_Fc.002_3B3v2_VH_CH1(S183E).002	1902	1904	1906
377133	130_Адалимумаб_CK(S176K)_Fc.002_9C8_VH_CH1(S183E).002	1908	1910	1912
377138	131_Адалимумаб_CK(S176K)_Fc.002_23B3_VH4_VH_CH1(S183E).002	1914	1916	1918
377142	132_3.2_CL(S176K)_Fc.002_3B3v2_VH_CH1(S183E).002	1920	1922	1924

## 048161

377148	133_3.2_CL(S176K)_Fc.002_9C8_VH_CH1(S183E).002	1926	1928	1930
377152	134_3.2_CL(S176K)_Fc.002_23B3_VH4_VH_CH1(S183E).002	1932	1934	1936
377156	135_3B3v2_CK(S176K)_Fc.002_Адалимумаб_VH_CH1(S183E).002	1938	1940	1942
377162	136_3B3v2_CK(S176K)_Fc.002_3.2_VH_CH1(S183E).002	1944	1946	1948
377166	137_9C8_CK(S176K)_Fc.002_Адалимумаб_VH_CH1(S183E).002	1950	1952	1954
377172	138_9C8_CK(S176K)_Fc.002_3.2_VH_CH1(S183E).002	1956	1958	1960
377176	139_23B3_VH4_CK(S176K)_Fc.002_Адалимумаб_VH_CH1(S183E).002	1962	1964	1966
377182	140_23B3_VH4_CK(S176K)_Fc.002_3.2_VH_CH1(S183E).002	1968	1970	1972
377186	141_Адалимумаб_IgG.003_3B3v2_VH_CK(S176E).002	1974	1976	1978
377193	142_Адалимумаб_IgG.003_9C8_VH_CK(S176E).002	1980	1982	1984
377200	143_Адалимумаб_IgG.003_23B3_VH4_VH_CK(S176E).002	1986	1988	1990
377207	144_3.2_IgG.003_3B3v2_VH_CK(S176E).002	1992	1994	1996
377212	145_3.2_IgG.003_9C8_VH_CK(S176E).002	1998	2000	2002
377217	146_3.2_IgG.003_23B3_VH4_VH_CK(S176E).002	2004	2006	2008
377222	147_3B3v2_IgG.003_Адалимумаб_VH_CK(S176E).002	2010	2012	2014
377229	148_3B3v2_IgG.003_3.2_VH_CL(S176E).002	2016	2018	2020
377236	149_9C8_IgG.003_Адалимумаб_VH_CK(S176E).002	2022	2024	2026
377241	150_9C8_IgG.003_3.2_VH_CL(S176E).002	2028	2030	2032
377246	151_23B3_VH4_IgG.003_Адалимумаб_VH_CK(S176E).002	2034	2036	2038
377251	152_23B3_VH4_IgG.003_3.2_VH_CL(S176E).002	2040	2042	2044
377256	153_Адалимумаб_CK(S176K)_Fc.002_3B3v2_VH_CK(S176E).002	2046	2048	2050
377261	154_Адалимумаб_CK(S176K)_Fc.002_9C8_VH_CK(S176E).002	2052	2054	2056

377266	155_Адалимумаб_СК(S176K)_Fc.002_23B3_VH4_VH_СК(S176E).002	2058	2060	2062
377271	156_3.2_CL(S176K)_Fc.002_3B3v2_VH_СК(S176E).002	2064	2066	2068
377276	157_3.2_CL(S176K)_Fc.002_9C8_VH_СК(S176E).002	2070	2072	2074
377281	158_3.2_CL(S176K)_Fc.002_23B3_VH4_VH_СК(S176E).002	2076	2078	2080
377286	159_3B3v2_СК(S176K)_Fc.002_Адалимумаб_VH_СК(S176E).002	2082	2084	2086
377290	160_3B3v2_СК(S176K)_Fc.002_3.2_VH_CL(S176E).002	2088	2090	2092
377295	161_9C8_СК(S176K)_Fc.002_Адалимумаб_VH_СК(S176E).002	2094	2096	2098
377300	162_9C8_СК(S176K)_Fc.002_3.2_VH_CL(S176E).002	2100	2102	2104
377305	163_23B3_VH4_СК(S176K)_Fc.002_Адалимумаб_VH_СК(S176E).002	2106	2108	2110
377310	164_23B3_VH4_СК(S176K)_Fc.002_3.2_VH_CL(S176E).002	2112	2114	2116

Вышеупомянутые аминокислотные последовательности кодируются последовательностями нуклеиновой кислоты, непосредственно предшествующими им в перечне последовательностей.

Последовательности CDR доменов VL и VH вышеперечисленного приведены в табл. 21.2А и 21.2В ниже.

Таблица 21.2А

Последовательности CDR VL анти-TL1А/анти-TNF- $\alpha$  IgG-Fab

Ab	Тип	CDRL1	CDRL2	CDRL3
Анти-TNF-альфа (Адалимумаб)	HK	CGCGCGTCCCAGGGAA TCCGGAATTACCTCGC A	GCCGCCTCGACTC TTCAGAGT	CAGAGATACA ACCGAGCGCC TTACACA
		SEQ ID NO: 957	SEQ ID NO: 959	SEQ ID NO: 960
	AK	RASQGIRNYLA SEQ ID NO: 92	AASTLQS SEQ ID NO: 242	QRYNRAPYT SEQ ID NO: 96
		ACTGGGAGCAGTTCCA ACATCGGGCAGGTTA TGATGTACAC	GGTAACAGCAAT CGGCCCTCA	CAGTCCTATGA CAGCAGCCTG AGTGGTTCGGT G
HK	SEQ ID NO: 962	SEQ ID NO: 965	SEQ ID NO: 1189	
	AK	TGSSSNIGAGYDVH SEQ ID NO: 146	GNSNRPS SEQ ID NO: 148	QSYDSSLGSGV SEQ ID NO: 150

<b>Анти- TL1A (3B3v2)</b>	HK	AGGGCCAGTCAGAGTG TTAGAAGCAGTTACTT AGCC	GGTGCATCCAGC AGGGCCACT	CAGCAGTATG GTAGCTCACCT ACC
		SEQ ID NO: 94	SEQ ID NO: 467	SEQ ID NO: 104
	AK	RASQSVRSSYLA	GASSRAT	QQYGSSPT
		SEQ ID NO: 122	SEQ ID NO: 124	SEQ ID NO: 126
<b>Анти- TL1A (9C8)</b>	HK	CGGGCAAGTCAGAGCA TTAACAAC TATTTAAAT	GCTGCATCCAGTT TGCAAAGT	CAACAGAGTT ACAGTACCCCT CGGACG
		SEQ ID NO: 263	SEQ ID NO: 2117	SEQ ID NO: 2118
	AK	RASQSINNYLN	AASSLQS	QQSYSTPRT
		SEQ ID NO: 110	SEQ ID NO: 112	SEQ ID NO: 108
<b>Анти- TL1A (23B3)</b>	HK	AGGTCCAGCCAGAGTG TGTTATACAGCTCCAAC AATAAGA A C T A C T T A G T T	TGGGCATCTACCC GGGAATCC	CAGCAATATTA TAAGACTCCTC TCACT
		SEQ ID NO: 2119	SEQ ID NO: 2120	SEQ ID NO: 2121
	AK	RSSQSVLYSSNNKNYLV	WASTRES	QQYKTPLT
		SEQ ID NO: 128	SEQ ID NO: 118	SEQ ID NO: 120

Таблица 21.2B

Последовательности CDR VH анти-TL1A/анти-TNF- $\alpha$  IgG-Fab

Ab	Тип	CDRH1	CDRH2	CDRH3
<b>Анти- TNF- альфа (Адали- мумаб)</b>	HK	GATTATGCGAT GCAT	GCCATTACGTGGAATA GCGGACACATCGATTA TGCAGACAGTGTGGAG GGC	GTCTCCTACTTGTC TACAGCTTCGTCG CTCGACTAT
		SEQ ID NO: 2122	SEQ ID NO: 2123	SEQ ID NO: 2124
	AK	DYAMH	AITWNSGHIDYADSVEG	VSYLSTASSLDY
		SEQ ID NO: 158	SEQ ID NO: 160	SEQ ID NO: 162
<b>Анти- TNF- альфа (3.2)</b>	HK	AGCTACTGGAT CGGC	ATCATCTATCTTGGTGA CTCAGATACCAGATAC AGCCCGTCCTTCCAAG GC	AGTAACTGGGGTCT TTGACTAC
		SEQ ID NO: 2125	SEQ ID NO: 2126	SEQ ID NO: 2127
	AK	SYWIG	IYLGDS DTRYSPSFQG	SNWGLDY
		SEQ ID NO: 212	SEQ ID NO: 214	SEQ ID NO: 216
<b>Анти- TL1A (3B3v2)</b>	HK	GGTACTACTG GAAC	GAAATCAATCATGCTG GAAACACCAACTACAA CCCGTCCCTCAAGAGT	GGATATTGTAGAA GTACCACCTGCTA CTTTGACTAC
		SEQ ID NO: 2128	SEQ ID NO: 2129	SEQ ID NO: 2130
	AK	GYYWN	EINHAGNTNYPNLSLKS	GYCRSTTCYFDY
		SEQ ID NO: 188	SEQ ID NO: 190	SEQ ID NO: 192
<b>Анти- TL1A (9C8)</b>	HK	AGTTACTTCTG GAGC	TATATCTATTACAGTGG GCAGACCAATAACAAC CCCTCCCTCAAGAGT	GAAACTGGGAGCT ACTACGGCTTTGA CTAC
		SEQ ID NO: 2131	SEQ ID NO: 2132	SEQ ID NO: 2133
	AK	SYFWS	YIYYSGQTKYNPNSLKS	ETGSYYGFDY
		SEQ ID NO: 170	SEQ ID NO: 633	SEQ ID NO: 180
<b>Анти- TL1A (23B3)</b>	HK	ACCAACAGTGT TGCTTGGAAC	AGGACATACTACAGGT CCAAGTGGTATAATGA TTATGCAGTTTCTCTGA AAAGT	GAGGATGGGGATA GCTACTACCGCTA CGGTATGGACGTC
		SEQ ID NO: 2134	SEQ ID NO: 2135	SEQ ID NO: 2136
	AK	TNSVAWN	RTYYRSKWyNDYAVSL KS	EDGDSYYRYGMDV KS
		SEQ ID NO: 182	SEQ ID NO: 196	SEQ ID NO: 186

Титр, выход и активность IgG-Fab

iPS №	IgG	Fab	Обмен CL/СН1	МЗ П	Титр (мг/ л)	Выход (мг/л)	hu TL1 А (пМ)	hu TL1А крат- ность измене- ния	hu TNF а (пМ)	hu TNF а крат- ност- ь изме- не- ния
376 597	TNFa (ада)	TL1A (3B3v2 )	Без обмен а	v1	63,5	56,266 98	197,3	3,65370 4	87,5	0,60 3448
376 601	TNFa (ада)	TL1A (9C8)	Без обмен а	v1	49,4	44,464 69	136,5	0,90397 4	96,5	0,66 5517
376 605	TNFa (ада)	TL1A (23B3)	Без обмен а	v1	46	37,356 32	689,6	5,56129	941, 7	6,49 4483
376 609	TNFa (3.2)	TL1A (3B3v2 )	Без обмен а	v1	28,9	37,882 88	4408	81,6296 3	94,2	1,34 5714
376 613	TNFa (3.2)	TL1A (9C8)	Без обмен а	v1	34,5	41,145 99	260,3	1,72384 1	75,3	1,07 5714
376 617	TNFa (3.2)	TL1A (23B3)	Без обмен а	v1	30,3	37,135 29	1025	8,26612 9	79,6	1,13 7143
376 621	TL1A (3B3v 2)	TNFa (ада)	Без обмен а	v1	53,1	55,231 71	66,3	1,22777 8	33,3	0,22 9655
376 625	TL1A (3B3v 2)	TNFa (3.2)	Без обмен а	v1	51,2	62,135 92	63,8	1,18148 1	37,3	0,53 2857
376 629	TL1A (9C8)	TNFa (ада)	Без обмен а	v1	46,1	43,107 06	142,1	0,94106	22,4	0,15 4483
376 633	TL1A (9C8)	TNFa (3.2)	Без обмен а	v1	44,3	53,376 93	215,7	1,42847 7	44,6	0,63 7143

376 637	TL1A (23B3)	TNFa (ада)	Без обмен а	v1	45,9	43,744 83	348,8	2,81290 3	27,5	0,18 9655
376 641	TL1A (23B3)	TNFa (3.2)	Без обмен а	v1	49,7	56,93	208,8	1,68387 1	43,9	0,62 7143
376 645	TNFa (ада)	TL1A (3B3v2 )	N- конце вой обмен	v1	5,82	4,9598 68	139,1	2,57592 6	131	0,90 3448
376 651	TNFa (ада)	TL1A (9C8)	N- конце вой обмен	v1	5,73	7,3360 2	337,8	2,23708 6	157, 5	1,08 6207
376 655	TNFa (ада)	TL1A (23B3)	N- конце вой обмен	v1	6,54	6,9457 86	200,2	1,61451 6	198, 5	1,36 8966
376 659	TNFa (3.2)	TL1A (3B3v2 )	N- конце вой обмен	v1	7,33	7,5766 92	73,6	1,36296 3	92,4	1,32
376 665	TNFa (3.2)	TL1A (9C8)	N- конце вой обмен	v1	18,3	20,861 74	91	0,60264 9	41,7	0,59 5714
376 669	TNFa (3.2)	TL1A (23B3)	N- конце вой обмен	v1	21,8	21,927 93	77,6	0,62580 6	73,5	1,05
376 673	TL1A (3B3v 2)	TNFa (ада)	N- конце вой обмен	v1	27,3	27,465 76	4825	89,3518 5	41,7	0,28 7586
376 679	TL1A (3B3v 2)	TNFa (3.2)	N- конце вой обмен	v1	28,8	40,933 07	6250	115,740 7	39,6	0,56 5714
376 683	TL1A (9C8)	TNFa (ада)	N- конце вой обмен	v1	33,4	28,837 16	414	2,74172 2	35,2	0,24 2759
376 689	TL1A (9C8)	TNFa (3.2)	N- конце вой обмен	v1	32,4	39,776 15	787,1	5,21258 3	45	0,64 2857
376 693	TL1A (23B3)	TNFa (ада)	N- конце вой обмен	v1	25,4	19,953 22			29,5	0,20 3448
376 699	TL1A (23B3)	TNFa (3.2)	N- конце	v1	22,9	25,850 43			40,7	0,58 1429

			вой обмен							
376 703	TNFa (ада)	TL1A (3B3v2 )	С- конце вой обмен	v1	39,2	30,581 53	150,4	2,78518 5	78,6	0,54 2069
376 709	TNFa (ада)	TL1A (9C8)	С- конце вой обмен	v1	50	41,996 33	199,5	1,32119 2	80,4	0,55 4483
376 715	TNFa (ада)	TL1A (23B3)	С- конце вой обмен	v1	40,7	29,975 69	640,4	5,16451 6	64,2	0,44 2759
376 721	TNFa (3.2)	TL1A (3B3v2 )	С- конце вой обмен	v1	23,2	24,910 97	213,2	3,94814 8	92,8	1,32 5714
376 725	TNFa (3.2)	TL1A (9C8)	С- конце вой обмен	v1	26,2	31,244 15	185,8	1,23046 4	48,3	0,69
376 729	TNFa (3.2)	TL1A (23B3)	С- конце вой обмен	v1	31,7	28,694 98	330,8	2,66774 2	79	1,12 8571
376 733	TL1A (3B3v 2)	TNFa (ада)	С- конце вой обмен	v1	36,9	31,955 48	66,1	1,22407 4	263	1,81 3793
376 739	TL1A (3B3v 2)	TNFa (3.2)	С- конце вой обмен	v1	2,95	1,9219 46				
376 745	TL1A (9C8)	TNFa (ада)	С- конце вой обмен	v1	24,9	22,183 9	108,7	0,71986 8	135, 3	0,93 3103
376 750	TL1A (9C8)	TNFa (3.2)	С- конце вой обмен	v1	7,71	8,2236 97	223	1,47682 1	71,4	1,02
376 755	TL1A (23B3)	TNFa (ада)	С- конце вой обмен	v1	9,11	7,3612 22	271,5	2,18951 6	433, 3	2,98 8276
376 760	TL1A (23B3)	TNFa (3.2)	С- конце вой обмен	v1	7,17	5,9607 17	305,6	2,46451 6	129, 8	1,85 4286

376 765	TNFa (ада)	TL1A (3B3v2 )	Оба помен яны	v1	3,66	4,3049 58	343,6	6,36296 3	182	1,25 5172
376 770	TNFa (ада)	TL1A (9C8)	Оба помен яны	v1	2,68	1,7125 81				0
376 775	TNFa (ада)	TL1A (23B3)	Оба помен яны	v1	4,99	2,9671 15	389,7	3,14274 2	90,4	0,62 3448
376 779	TNFa (3.2)	TL1A (3B3v2 )	Оба помен яны	v1	4,92	3,7170 88	707,1	13,0944 4	226, 8	3,24
376 785	TNFa (3.2)	TL1A (9C8)	Оба помен яны	v1	9,36	9,5463 85	149,5	0,99006 6	42	0,6
376 789	TNFa (3.2)	TL1A (23B3)	Оба помен яны	v1	12,2	11,323 45	554,2	4,46935 5	74	1,05 7143
376 793	TL1A (3B3v 2)	TNFa (ада)	Оба помен яны	v1	19,3	15,350 21	1937, 5	35,8796 3	347, 9	2,39 931
376 797	TL1A (3B3v 2)	TNFa (3.2)	Оба помен яны	v1	1	0				
376 801	TL1A (9C8)	TNFa (ада)	Оба помен яны	v1	13,6	11,142 13	286,8	1,89933 8	310	2,13 7931
376 806	TL1A (9C8)	TNFa (3.2)	Оба помен яны	v1	1	0,9618 22				
376 811	TL1A (23B3)	TNFa (ада)	Оба помен яны	v1	3,22	1,6715 24				
376 817	TL1A (23B3)	TNFa (3.2)	Оба помен яны	v1	1	0				
376 822	TNFa (ада)	TL1A (3B3v2 )	Без обмен а	v2	53,6	43,058 22	128,5	2,37963	84,7	0,58 4138
376 826	TNFa (ада)	TL1A (9C8)	Без обмен а	v2	27,4	22,923 98	106	0,70198 7	80,8	0,55 7241
376 830	TNFa (ада)	TL1A (23B3)	Без обмен а	v2	34,2	25,041 5	262	2,11290 3	73,3	0,50 5517
376 834	TNFa (3.2)	TL1A (3B3v2 )	Без обмен а	v2	18	17,627 24	246,8	4,57037	97	1,38 5714
376 838	TNFa (3.2)	TL1A (9C8)	Без обмен а	v2	17,3	17,067 75	548,8	3,63443 7	31,6	0,45 1429

376 842	TNFa (3.2)	TL1A (23B3)	Без обмен а	v2	14,9	12,785 92	469,8 5	3,78911 3	82,9	1,18 4286
376 846	TL1A (3B3v 2)	TNFa (ада)	Без обмен а	v2	46,7	45,573 82	71,8	1,32963	31,5	0,21 7241
376 850	TL1A (3B3v 2)	TNFa (3.2)	Без обмен а	v2	24,4	25,470 09	83,3	1,54259 3	84,8	1,21 1429
376 854	TL1A (9C8)	TNFa (ада)	Без обмен а	v2	39,5	36,018 55	229,3	1,51854 3	30,8	0,21 2414
376 858	TL1A (9C8)	TNFa (3.2)	Без обмен а	v2	17,5	17,370 68	190,8	1,26357 6	35	0,5
376 862	TL1A (23B3)	TNFa (ада)	Без обмен а	v2	23,5	19,867 08	436,3	3,51854 8	34,4	0,23 7241
376 867	TL1A (23B3)	TNFa (3.2)	Без обмен а	v2	11,3	10,117 78	109	0,87903 2	29	0,41 4286
376 872	TNFa (ада)	TL1A (3B3v2 )	N- конце вой обмен	v2	5,26	5,3628 55	27,72 5	0,51342 6	519, 5	3,58 2759
376 879	TNFa (ада)	TL1A (9C8)	N- конце вой обмен	v2	4,24	2,8129 33	253,2	1,67682 1	173, 2	1,19 4483
376 885	TNFa (ада)	TL1A (23B3)	N- конце вой обмен	v2	3,01	2,5922 65	310,3	2,50241 9	940, 8	6,48 8276
376 889	TNFa (3.2)	TL1A (3B3v2 )	N- конце вой обмен	v2	1	0,8171 01				
376 897	TNFa (3.2)	TL1A (9C8)	N- конце вой обмен	v2	2,76	5,4946 26	760	5,03311 3	472, 9	6,75 5714
376 902	TNFa (3.2)	TL1A (23B3)	N- конце вой обмен	v2	1	0,9854 58				
376 907	TL1A (3B3v 2)	TNFa (ада)	N- конце вой обмен	v2	36,7	29,312 27	3213	59,5	35,8	0,24 6897
376 913	TL1A (3B3v 2)	TNFa (3.2)	N- конце	v2	19,4	25,224 26	813	15,0555 6	52,5 5	0,75 0714

			вой обмен							
376 918	TL1A (9C8)	TNFa (ада)	N- конце вой обмен	v2	39,6	31,184 41	203,6	1,34834 4	17,8 55	0,12 3138
376 925	TL1A (9C8)	TNFa (3.2)	N- конце вой обмен	v2	22,4	27,258 54	189,6 5	1,25596	29,3 5	0,41 9286
376 931	TL1A (23B3)	TNFa (ада)	N- конце вой обмен	v2	22,9	20,437 29	7195	58,0241 9	26,7 7	0,18 4621
376 937	TL1A (23B3)	TNFa (3.2)	N- конце вой обмен	v2	12,2	9,7225 44			176, 95	2,52 7857
376 941	TNFa (ада)	TL1A (3B3v2 )	C- конце вой обмен	v2	40,6	31,798 66	22,73	0,42092 6	50,4	0,34 7586
376 949	TNFa (ада)	TL1A (9C8)	C- конце вой обмен	v2	38,7	35,043	48,16 5	0,31897 4	49,0 95	0,33 8586
376 955	TNFa (ада)	TL1A (23B3)	C- конце вой обмен	v2	30	24,124 4	333,9 5	2,69314 5	57,1 5	0,39 4138
376 962	TNFa (3.2)	TL1A (3B3v2 )	C- конце вой обмен	v2	9,96	13,792 68	540	10	1957	27,9 5714
376 967	TNFa (3.2)	TL1A (9C8)	C- конце вой обмен	v2	8,73	12,017 96				
376 972	TNFa (3.2)	TL1A (23B3)	C- конце вой обмен	v2	2,58	4,4191 75	12490	100,725 8	7870	112, 4286
376 976	TL1A (3B3v 2)	TNFa (ада)	C- конце вой обмен	v2	26,3	16,320 49	31,31	0,57981 5	172, 2	1,18 7586
376 983	TL1A (3B3v 2)	TNFa (3.2)	C- конце вой обмен	v2	1	0,9934 37				
376 991	TL1A (9C8)	TNFa (ада)	C- конце	v2	40,5	38,428 49	59,9	0,39668 9	148	1,02 069

			вой обмен							
376 995	TL1A (9C8)	TNFa (3.2)	С- конце вой обмен	v2	1	0,3394 88				
377 001	TL1A (23B3)	TNFa (ада)	С- конце вой обмен	v2	25,8	25,490 58	41,67 5	0,33608 9	158, 45	1,09 2759
377 006	TL1A (23B3)	TNFa (3.2)	С- конце вой обмен	v2	1	0,1241 47				
377 011	TNFa (ада)	TL1A (3B3v2 )	Оба помен яны	v2	1	3,5867 28	2702	50,0370 4	3065 ,5	21,1 4138
377 015	TNFa (ада)	TL1A (9C8)	Оба помен яны	v2	3,2	3,3124 42			1410 50	972, 7586
377 020	TNFa (ада)	TL1A (23B3)	Оба помен яны	v2	1	1,1513 7				
377 025	TNFa (3.2)	TL1A (3B3v2 )	Оба помен яны	v2	1	0,7780 64				
377 031	TNFa (3.2)	TL1A (9C8)	Оба помен яны	v2	1	2,9402 39	17640	116,821 2	1296 5	185, 2143
377 036	TNFa (3.2)	TL1A (23B3)	Оба помен яны	v2	1	0,5956 15				
377 041	TL1A (3B3v 2)	TNFa (ада)	Оба помен яны	v2	10,8	10,829 89	1689, 5	31,2870 4	2014 ,5	13,8 931
377 045	TL1A (3B3v 2)	TNFa (3.2)	Оба помен яны	v2	1	0				
377 050	TL1A (9C8)	TNFa (ада)	Оба помен яны	v2	22,1	16,880 03	269,0 5	1,78178 8	67,2	0,46 3448
377 056	TL1A (9C8)	TNFa (3.2)	Оба помен яны	v2	1	0				
377 060	TL1A (23B3)	TNFa (ада)	Оба помен яны	v2	1	3,7830 6	2371	19,1209 7	171, 5	1,18 2759
377 064	TL1A (23B3)	TNFa (3.2)	Оба помен яны	v2	1	0				

377 068	TNFa (ада)	TL1A (3B3v2 )	Без обмен а	v3	69,2	61,354 14	23,5	0,43518 5	56,1	0,38 6897
377 073	TNFa (ада)	TL1A (9C8)	Без обмен а	v3	64,9	57,530 99	47,08	0,31178 8	36,7 95	0,25 3759
377 077	TNFa (ада)	TL1A (23B3)	Без обмен а	v3	60	50,445 68	67,9	0,54758 1	49,6 6	0,34 2483
377 082	TNFa (3.2)	TL1A (3B3v2 )	Без обмен а	v3	35,6	50,012 75	194,9	3,60925 9	1213 ,5	17,3 3571
377 087	TNFa (3.2)	TL1A (9C8)	Без обмен а	v3	44,7	33,189 84	148,8	0,98543	41,5 55	0,59 3643
377 092	TNFa (3.2)	TL1A (23B3)	Без обмен а	v3	35	43,588 61	598,5	4,82661 3	38,8 45	0,55 4929
377 097	TL1A (3B3v 2)	TNFa (ада)	Без обмен а	v3	70,5	74,253 03	37,29	0,69055 6	20,8 5	0,14 3793
377 102	TL1A (3B3v 2)	TNFa (3.2)	Без обмен а	v3	68,1	84,238 72	31,56 5	0,58453 7	29,9 8	0,42 8286
377 107	TL1A (9C8)	TNFa (ада)	Без обмен а	v3	57	55,225 68	78,35	0,51887 4	16,7 75	0,11 569
377 112	TL1A (9C8)	TNFa (3.2)	Без обмен а	v3	37,9	45,766 92	53,5	0,35430 5	26,3 15	0,37 5929
377 116	TL1A (23B3)	TNFa (ада)	Без обмен а	v3	44,3	44,024 05	73,9	0,59596 8	15,2 3	0,10 5034
377 121	TL1A (23B3)	TNFa (3.2)	Без обмен а	v3	40,7	28,598 12	62,55	0,50443 5	22,8 5	0,32 6429
377 126	TNFa (ада)	TL1A (3B3v2 )	N- конце вой обмен	v3	1	1,9818 45				
377 133	TNFa (ада)	TL1A (9C8)	N- конце вой обмен	v3	2,65	2,9484 34	806,5	5,34106	552	3,80 6897
377 138	TNFa (ада)	TL1A (23B3)	N- конце вой обмен	v3	1	1,3394 2				
377 142	TNFa (3.2)	TL1A (3B3v2 )	N- конце вой обмен	v3	10,2	11,759 34	32,78	0,60703 7	45,3 4	0,64 7714

377 148	TNFa (3.2)	TL1A (9C8)	N- конце вой обмен	v3	11,1	13,076 35	99,65	0,65993 4	48,4 95	0,69 2786
377 152	TNFa (3.2)	TL1A (23B3)	N- конце вой обмен	v3	13	12,697 25	46,51	0,37508 1	39,7 4	0,56 7714
377 156	TL1A (3B3v 2)	TNFa (ада)	N- конце вой обмен	v3	30,8	34,834 78	1584, 5	29,3425 9	19,9	0,13 7241
377 162	TL1A (3B3v 2)	TNFa (3.2)	N- конце вой обмен	v3	26,2	34,405 56	2504	46,3703 7	24,8 75	0,35 5357
377 166	TL1A (9C8)	TNFa (ада)	N- конце вой обмен	v3	31,9	26,769 67	83	0,54966 9	16,9 55	0,11 6931
377 172	TL1A (9C8)	TNFa (3.2)	N- конце вой обмен	v3	31,3	38,704 41	81,5	0,53973 5	27,2 6	0,38 9429
377 176	TL1A (23B3)	TNFa (ада)	N- конце вой обмен	v3	11,3	11,486 23	5305	42,7822 6	28,7 3	0,19 8138
377 182	TL1A (23B3)	TNFa (3.2)	N- конце вой обмен	v3	14	15,541 8	28185	227,298 4	48,1 7	0,68 8143
377 186	TNFa (ада)	TL1A (3B3v2 )	C- конце вой обмен	v3	46,4	36,675 3	37,57	0,69574 1	35,7 5	0,24 6552
377 193	TNFa (ада)	TL1A (9C8)	C- конце вой обмен	v3	32	28,525 27	128,0 5	0,84801 3	30,9 3	0,21 331
377 200	TNFa (ада)	TL1A (23B3)	C- конце вой обмен	v3	56,6	43,602 9	217,3 5	1,75282 3	38,4 25	0,26 5
377 208	TNFa (3.2)	TL1A (3B3v2 )	C- конце вой обмен	v3	22,1	26,104 32	212,3 5	3,93240 7	170, 15	2,43 0714
377 212	TNFa (3.2)	TL1A (9C8)	C- конце вой обмен	v3	17,6	18,673 36	874	5,78807 9	306, 8	4,38 2857

377 217	TNFa (3.2)	TL1A (23B3)	С- конце вой обмен	v3	27,4	25,632 19	271,4	2,18871	114, 8	1,64
377 223	TL1A (3B3v 2)	TNFa (ада)	С- конце вой обмен	v3	40,5	36,071 82	30,17 5	0,55879 6	167	1,15 1724
377 229	TL1A (3B3v 2)	TNFa (3.2)	С- конце вой обмен	v3	3,05	3,0310 93	79,5	1,47222 2	1711 ,5	24,4 5
377 236	TL1A (9C8)	TNFa (ада)	С- конце вой обмен	v3	48,3	43,315	54,25	0,35927 2	61,7	0,42 5517
377 241	TL1A (9C8)	TNFa (3.2)	С- конце вой обмен	v3	8,95	8,4908 45	606	4,01324 5	268, 4	3,83 4286
377 246	TL1A (23B3)	TNFa (ада)	С- конце вой обмен	v3	22,4	20,524 45	68,7	0,55403 2	118, 5	0,81 7241
377 252	TL1A (23B3)	TNFa (3.2)	С- конце вой обмен	v3	5,05	5,6902 46	219,8	1,77258 1	1381	19,7 2857
377 256	TNFa (ада)	TL1A (3B3v2 )	Оба помен яны	v3	1	3,2030 42				
377 261	TNFa (ада)	TL1A (9C8)	Оба помен яны	v3	1	3,0323 22				
377 266	TNFa (ада)	TL1A (23B3)	Оба помен яны	v3	2,57	3,3957 99				
377 272	TNFa (3.2)	TL1A (3B3v2 )	Оба помен яны	v3	1	3,0716 47	13300	246,296 3		
377 276	TNFa (3.2)	TL1A (9C8)	Оба помен яны	v3	14	16,058 46	1237, 5	8,19536 4	362, 4	5,17 7143
377 281	TNFa (3.2)	TL1A (23B3)	Оба помен яны	v3	12,6	13,705 76	1937, 5	15,625	282, 35	4,03 3571
377 286	TL1A (3B3v 2)	TNFa (ада)	Оба помен яны	v3	25,5	29,409 29	486,7	9,01296 3	521, 5	3,59 6552
377 290	TL1A (3B3v 2)	TNFa (3.2)	Оба помен яны	v3	1	0,3040 74				

377 295	TL1A (9C8)	TNFa (ада)	Оба помен яны	v3	26,3	29,747 24	177,5 5	1,17582 8	132, 35	0,91 2759
377 300	TL1A (9C8)	TNFa (3.2)	Оба помен яны	v3	3,58	4,3559 68	17575	116,390 7	6975 0	996, 4286
377 305	TL1A (23B3)	TNFa (ада)	Оба помен яны	v3	11	13,602 09			595, 5	4,10 6897
377 310	TL1A (23B3)	TNFa (3.2)	Оба помен яны	v3	1	0,6426 7				

Таблица 21.4

## Чистота анти-TL1A/анти-TNF-α IgG-Fab

iPS №	ЭХ-ВЭЖХ			Caliper									
	пре- MP BM	MP	пост- MP	Невосстановленные				Восстановленные					
				MP 1	MP 2	MP 3	HM	HC 1	HC 2	HC 3	LC 1	R LC 2	
37659 7	3,832	96		1			0	1				0,2068 97	0,7931 03
37660 1	2,894	97		1			0	1				0,3531 6	0,6468 4
37660 5	3,362	96,63 4		1			0	1				1	
37660 9	1,241	99		1			0	0,1538 46	0,8461 54			1	
37661 3	1,838	98		1			0	1				0,2986 58	0,7013 42
37661 7	1,162	99		1			0	1				1	
37662 1	1,827	98,17 2		1			0	1				0	1
37662 5	2,552	97		1			0	0,1365 03	0,8634 97			0,5114 94	0,4885 06
37662 9	1,868	98		1			0	1				0,5214 29	0,4785 71
37663 3	5,854	94		1			0	1				0,4542 25	0,5457 75
37663 7	1,099	98,90 1		1			0	1				0,6833 33	0,3166 67
37664 1	3,255	96,74 5		1			0	1				0,4489 8	0,5510 2
37664 5	8,844	63,75 4		1			0	1				0,3360 66	0,6639 34
37665 1	39,874	60		0,46	0,54		0	1				0,3649 29	0,6350 71
37665 5	8,191	91,80 9						1				0,3350 52	0,6649 48

## 048161

37665		96,48					0,0743	0,9256		0,5145	0,4854
9	3,515	5		0,91			0,09	8	2	99	01
37666										0,4981	0,5018
5	2,981	97		1			0	1		68	32
37666		97,78									
9	2,213	7		1			0	1		1	
37667		60,84						0,1101	0,8898		
3	4,635	2		0,95			0,05	15	85	1	
37667		98,22						0,1234	0,2030	0,6734	
9	1,774	6		0,7			0,3	94	08	99	1
37668										0,3301	0,6698
3	5,787	94		0,53	0,22		0,25	1		89	11
37668		96,10								0,2093	0,7906
9	3,896	4		0,7			0,3	1		86	14
37669		96,13									
3	2,32	1	1,548	0,8			0,1	1		1	
37669											
9	1,27	99		0,715			0,285	1		1	
37670								0,1647	0,8352		
3	7,46	93		1			0	56	44	0,4370	0,5629
37670										0,4398	0,5601
9	8,439	92		1			0	1		5	5
37671										0,2851	0,7148
5	2,451	98		0,4	0,6		0	1		24	76
37672		94,45						0,1975	0,8024		
1	5,544	6		0,85			0,15	95	05	0,3277	0,6722
37672		71,44								0,4133	0,5866
5	7,766	5		1			0	1		33	67
37672										0,4143	0,5856
9	4,728	95		1			0	1		43	57
37673										0,4743	0,5256
3	9,277	91		1			0	1		59	41
37673		70,08								0,7194	0,2805
9	11,358	3						1		81	19
37674										0,4796	0,5203
5	18,482	82		1			0	1		75	25
37675								0,1535	0,8464		
0	5,36	94,64		1			0	09	91	1	
37675										0,5092	0,4907
5	4,451	96		1			0	1		25	75
37676		93,39									
0	6,609	1		1			0	1		1	
37676		57,86								0,3051	0,6948
5	4,751	8		1			0	1		36	64
37677											
0	7,176	50,33						1		1	
37677		63,70								0,5270	0,4729
5	36	5						1		27	73
37677										0,4161	0,5838
9	5,25	94,75		1			0	1		07	93

## 048161

37678		80,87									0,4433	0,5566
5	19,124	6		1			0	1			33	67
37678											0,3852	0,6147
9	2,556	97		1			0	1			94	06
37679		79,13						0,1201	0,8798			
3	9,161	5		1			0	12	88		1	
37679												
7												
37680		83,96										
1	16,037	3		1			0	1			1	
37680												
6	3,911	96										
37681		41,52										
1	35,57	2						1			1	
37681												
7												
37682											0,3046	0,6953
2	3,67	96		1			0	1			88	13
37682		98,47						0,0977	0,9022		0,4877	0,5122
6	1,521	9		1			0	92	08		38	62
37683		14,01										
0	3,377	5		1			0	1			1	
37683		96,61						0,4956	0,5043		0,2298	0,7701
4	3,397	3		1			0	67	33		58	42
37683		97,35									0,2546	0,7453
8	2,644	6		1			0	1			3	7
37684											0,1498	0,8501
2	2,839	97		1			0	1			77	23
37684												
6	2,28	97,72		1			0	1			1	
37685								0,3321	0,6678		0,7355	0,2644
0	2,28	97,72		1			0	92	08		77	23
37685		99,03									0,5339	0,4660
4	0,963	7		1			0	1			51	49
37685		97,09									0,5138	0,4861
8	2,903	7		1			0	1			89	11
37686		97,43									0,6666	0,3333
2	2,567	3		1			0	1			67	33
37686		97,93									0,4957	0,5042
7	2,062	8		1			0	1			02	98
37687											0,1712	0,8287
2	50,192	50						1			54	46
37687		65,81									0,3032	0,6967
9	10,705	2						1			07	93
37688		77,07									0,2326	0,7673
5	1,202	2						1			28	72
37688		83,98									0,546	0,454
9	9,579	2										
37689		93,80									0,5401	0,4598
7	6,197	3						1			46	54

## 048161

37690		92,12										
2	7,841	59						1			1	
37690		97,49						0,2139	0,7860		0,1761	0,8238
7	2,508	2		0,81			0,19	46	54		52	48
37691				0,6376				0,5890	0,4109		0,1425	0,8574
3	1,59	98,41		3			0,3621	91	09		39	61
37691				0,607				0,393	1		0,3100	0,6899
8	2,689	97									78	22
37692		97,47									0,2452	0,7547
5	2,701	9					1	1			83	17
37693												
1	3,825	17	23,971	0,845			0,15	1			1	
37693												
7	6,425	73	6,777	1			0	1			1	
37694								0,1044	0,8955		0,4567	0,5432
1	6,09	93,91		0,995			0	52	48		31	69
37694		95,08									0,4321	0,5678
9	4,915	5		0,136	0,805		0,059	1			61	39
37695		96,41									0,2228	0,7771
5	3,589	1		0,197	0,287	0,51	0	1			41	59
37696				0,6360	0,6360		0,3639				0,3216	0,6783
2	5,594	86,48	7,926	74	74		26	1			78	22
37696		93,45									0,4868	0,5131
7	6,547	3		1			0	1			69	31
37697		96,96									0,4254	0,5745
2	3,031	9						1			9	1
37697		96,61									0,4879	0,5120
6	3,387	3		1			0	1			65	35
37698												
3	34,082	66										
37699		90,53									0,5012	0,4987
1	9,467	3		1			0	1			19	81
37699												
5	0											
37700		97,45									0,5192	0,4807
1	2,545	5		1			0	1			88	12
37700		66,13										
6	0	6	33,864									
37701								0,5449	0,4550		0,2473	0,7526
1	2,172	79					44	56			12	88
37701												
5	9,233	57					1				1	0
37702												
0	7,127	85	51,551									
37702												
5	8,132	85	15,948									
37703								0,4731	0,5268		0,5774	0,4225
1	3,924	91					49	51			19	81
37703												
6	3,788	96										

## 048161

37704	16,236	83,98					0,3158	0,6841			
1	1	2		1			71	29		1	
37704											
5											
37705											
0	11,164	77	10,496	1			0	1		1	
37705											
6											
37706											
0	7,075	77	33,064					1		1	
37706											
4											
37706										0,2991	0,7008
8	3,292	97		1			0	1		45	55
37707										0,3769	0,6230
3	1,927	98,07						1		47	53
37707										0,1107	0,8892
7	2,583	97						1		49	51
37708										0,0714	0,9285
2	1,135	99		1			0	0,2250	0,7749	29	71
37708										0,2749	0,7250
7	2,006	97,92		1			0	1		33	67
37709										0,0943	0,9056
2	1,994	98,006		1			0	1		95	05
37709											
7	1,261	98,739		1			0	1		1	
37710										0,5013	0,4986
2	2,11	97,767		1			0	0,1642	0,8357	19	81
37710										0,4858	0,5141
7	1,501	98		1			0	1		93	07
37711										0,4686	0,5313
2	3,322	97		1			0	1		57	43
37711										0,5570	0,4429
6	2,65	97		1			0	1		03	97
37712										0,4597	0,5402
1	3,284	97		1			0	1		01	99
37712	12,40										
6	4	66						1		1	
37713										0,4365	0,5634
3	6,553	57						1		08	92
37713										0,4009	0,5990
8	3,988	73						1		32	68
37714										0,5286	0,4713
2	2,077	98		1			0	1		1	9
37714										0,5297	0,4702
8	3,772	96		1			0	1		45	55
37715										0,5028	0,4971
2	1,436	99		1			0	1		9	1
37715											
6	2,614	77		1			0	0,1187	0,8865	34	44

## 048161

37716								0,0654	0,1456		0,1722	0,8277
2	1,394	98,536		0,64			0,33	66	63	0,485	37	63
37716											0,3591	0,6408
6	5,575	94	2,313	0,295	0,45		0,254	1			16	84
37717											0,3493	0,6506
2	3,898	96		0,261	0,325		0,414	1			33	67
37717	19,39											
6	9	77		1			0	1			1	
37718	32,58											
2	8	50					1	1			1	
37718								0,1719	0,8280		0,4540	0,5459
6	6,813	93		1			0	75	25		54	46
37719											0,4461	0,5538
3	1,394	98,605		1			0	1			08	92
37720						0,68					0,3344	0,6655
0	5,103	95		0,15	0,165	8	0	1			48	52
37720								0,2297	0,7702		0,3389	0,6610
8	3,092	97		0,84			0,16	87	13		83	17
37721	20,00										0,4128	0,5871
2	5	80		0,867			0,133	1			88	12
37721											0,4470	0,5529
7	5,089	95		1			0	1			9	1
37722								0,0655	0,9344		0,4974	0,5025
3	7,45	93		1			0	74	26		23	77
37722	20,13											
9	8	62						1			1	
37723											0,4884	0,5115
6	18,44	82		1			0	1			39	61
37724	10,02											
1	2	90						1			1	
37724											0,5198	0,4801
6	7	92,694		1			0	1			78	22
37725												
2	16	83,804	6,111					1			1	
37725												
6	0	100									1	
37726												
1	0	100		1			0				1	
37726												
6	0	100						1			1	
37727											0,3878	0,6121
2	8,675	84						1			41	59
37727	11,00										0,4864	0,5135
6	6	88,626		1			0	1			86	14
37728											0,4854	0,5145
1	4,722	95,279		1			0	1			88	12
37728								0,1343	0,8656			
6	5,497	64		1			0	28	72		1	
37729												
0	0	100										
37729	13,80											
5	7	10,899		1			0	1			1	
37730											0,5665	0,4334
0	6,932	87						1			53	47
37730	11,80							0,3314	0,6685			
5	8	83		1			0	18	82		0,8125	0,1875
37731												
0	0	100										

Все публикации, патенты и патентные заявки, обсуждаемые и цитируемые в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Необходимо понимать, что раскрытое изобретение не ограничивается конкретной описанной методологией, протоколами и материалами, поскольку они могут варьироваться. Кроме того, необходимо понимать, что используемая в данном документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов реализации изобретения и не предназначена для ограничения объема прилагаемой формулы изобретения.

Специалисты в данной области техники смогут определить или установить, используя не более чем шаблонные эксперименты, многие эквиваленты конкретных вариантов реализации изобретения, описанных в данном документе. Такие эквиваленты охватываются последующей формулой изобретения.

#### Сокращения

Сокращенные термины, используемые повсюду в данном документе, определяются следующим образом:

ак АК - аминокислота(-ный);  
 ДЭА - дисбаланс экспрессии аллелей;  
 ANOVA - дисперсионный анализ;  
 БСА - бычий сывороточный альбумин;  
 CDR - участки, определяющие комплементарность;  
 СНО - клетки яичника китайского хомяка;  
 МЗП - мутация зарядовой пары;  
 МДСИ - модифицированная Дульбекко среда Игла;  
 ДМСО - диметилсульфоксид;  
 ИФА - иммуноферментный анализ;  
 эЛКП - экспрессия локуса количественного признака;  
 ИЭР-ВП - ионизация электрораспылением, времяпролетная;  
 ИСН - истощенный супернатант;  
 FACS - проточная цитометрия;  
 СТЭ - сыворотка телячьего эмбриона;  
 ЖЭХБ - жидкостная экспресс-хроматография белков;  
 FVB - линия мышей, инбредных по аллели вируса лейкоза Френда 1b (Fv1b);  
 Г&Э - гематоксилин и эозин;  
 ГК - гипоксантин;  
 ХГВ - хроматография с гидрофобным взаимодействием;  
 ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография;  
 ПХ - пероксидаза хрена;  
 HUVES - эпителиальная клетка пупочной вены человека;  
 ВЗК - воспалительное заболевание кишечника;  
 МИСД МДСИ - без глутамин;  
 IFN - интерферон;  
 IL - интерлейкин;  
 ХБМ - хемотаксический белок моноцитов;  
 БДМС - база данных макромолекулярной структуры;  
 НК - нуклеиновая кислота;  
 МГЖ - моноядерные клетки периферической крови;  
 ФСБ - фосфатно-солевой буфер;  
 ПЦР - полимеразная цепная реакция;  
 ПЭГ - полиэтиленгликоль;  
 ПЭТ - полиэтиленимин;  
 ЛКП - locus количественного признака;  
 RPMI - среда, разработанная в Мемориальном Институте Розуэлла Парка;  
 КТ-ПЦР - полимеразная цепная реакция при комнатной температуре;  
 ОНП - одонуклеотидный полиморфизм;  
 ТФУ - трифторуксусная кислота;  
 TL1A - TNF-подобный лиганд 1A (TNFSF15);  
 ТМБ - тетраметилбензол;  
 TNF - фактор некроза опухоли-а.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, специфичное для TL1A, причем:

- а) антитело имеет один или два переменных домена легкой цепи и один или два переменных домена тяжелой цепи;
- б) переменный домен легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3;

с) вариабельный домен тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3;

d) антитело имеет комбинацию последовательностей LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 и HCDR3, выбранную из:

LCDR1 имеет последовательность RASQSINNYLN (SEQ ID NO: 110), LCDR2 имеет последовательность ATSSLQS (SEQ ID NO: 106); LCDR3 имеет последовательность QQSYSTPRT (SEQ ID NO: 108); HCDR1 имеет последовательность SYFWS (SEQ ID NO: 170), HCDR2 имеет последовательность YIYYSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 172); и HCDR3 имеет последовательность EIGSYYGFDY (SEQ ID NO: 174); и

LCDR1 имеет последовательность RASQSINN (SEQ ID NO: 110), LCDR2 имеет последовательность AASSLQS (SEQ ID NO: 112); LCDR3 имеет последовательность QQSYSTPRT (SEQ ID NO: 108); HCDR1 имеет последовательность SYFWS (SEQ ID NO: 170), HCDR2 имеет последовательность YIYYSGNTKYNPNSLKS (SEQ ID NO: 178); и HCDR3 имеет последовательность ETGSYYGFDY (SEQ ID NO: 180).

2. Антитело по п.1, отличающееся тем, что вариабельный домен тяжелой цепи содержит последовательность по меньшей мере на около 90%, идентичную последовательности вариабельного домена тяжелой цепи, выбранной из SEQ ID NO: 12 и 16.

3. Антитело по п.1, отличающееся тем, что вариабельный домен тяжелой цепи содержит последовательность вариабельного домена тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 12, 16 и 294.

4. Антитело по п.1, отличающееся тем, что вариабельный домен легкой цепи содержит последовательность по меньшей мере на около 90%, идентичную последовательности вариабельного домена легкой цепи, выбранной из SEQ ID NO: 10 и 14.

5. Антитело по п.1, отличающееся тем, что вариабельный домен легкой цепи содержит последовательность вариабельного домена легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 10 и 14.

6. Антитело по п.1, отличающееся тем, что белок содержит тяжелую цепь, имеющую последовательность тяжелой цепи по меньшей мере на около 90%, идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 56 и 60.

7. Антитело по п.1, отличающееся тем, что белок содержит тяжелую цепь, имеющую последовательность тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 56 и 60.

8. Антитело по п.1, отличающееся тем, что белок содержит легкую цепь, имеющую последовательность легкой цепи по меньшей мере на около 90%, идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 54 и 58.

9. Антитело по п.1, отличающееся тем, что белок содержит легкую цепь, имеющую последовательность легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 54 и 58.

10. Антитело по п.1, отличающееся тем, что белок содержит последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 56 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 54.

11. Антитело по п.1, отличающееся тем, что белок содержит последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 60 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 58.

12. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по любому из пп.1-11.

13. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п.12.

14. Клетка-хозяин, содержащая один или большее количество векторов экспрессии по п.13.

15. Способ получения антитела, включающий в себя:

a) культивирование клетки-хозяина по п.14 в условиях, которые позволяют экспрессию антитела; и

b) выделение антитела из культуры.

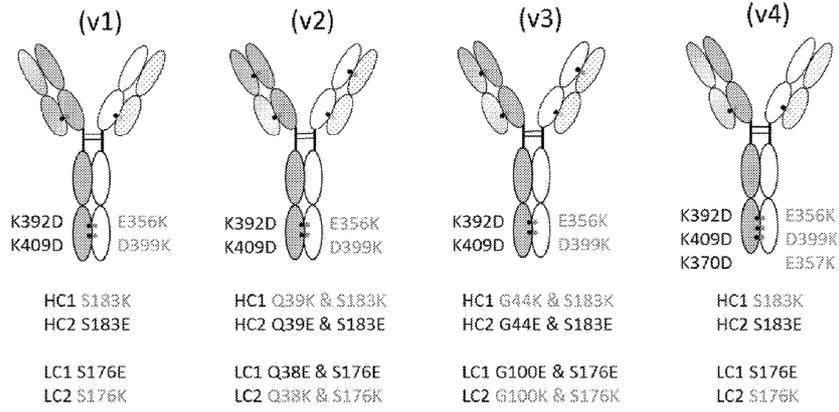
16. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп.1-11 и фармацевтически приемлемый разбавитель, вспомогательное вещество или носитель.

17. Способ лечения состояния, связанного с TL1A, у пациента, нуждающегося в этом, который включает в себя введение пациенту эффективного количества антитела по любому из пп.1-11.

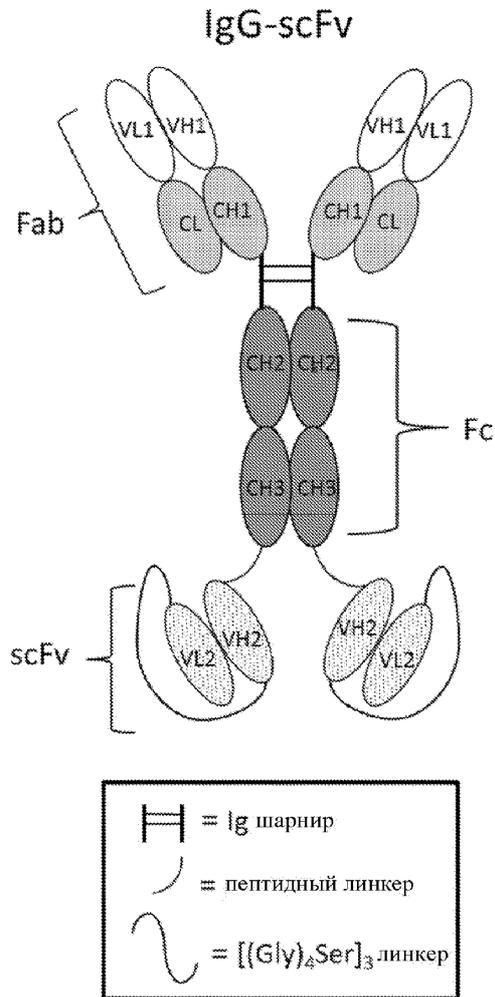
18. Способ по п.17, отличающийся тем, что состояние является воспалительным заболеванием кишечника, болезнью Крона или язвенным колитом.

19. Применение антитела по любому из пп.1-11 для изготовления лекарственного средства для лечения состояния, связанного с TL1A, у пациента, нуждающегося в этом.

20. Применение по п.19, где состояние является воспалительным заболеванием кишечника, болезнью Крона или язвенным колитом.

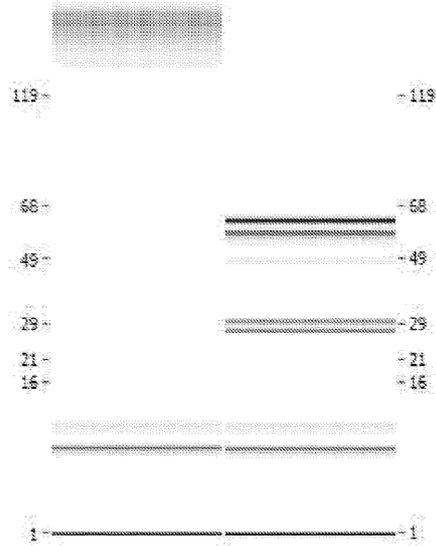
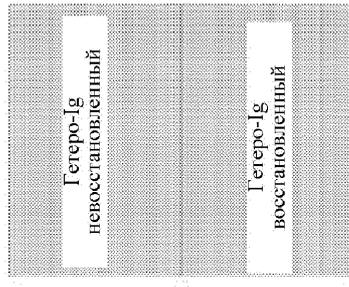


Фиг. 1

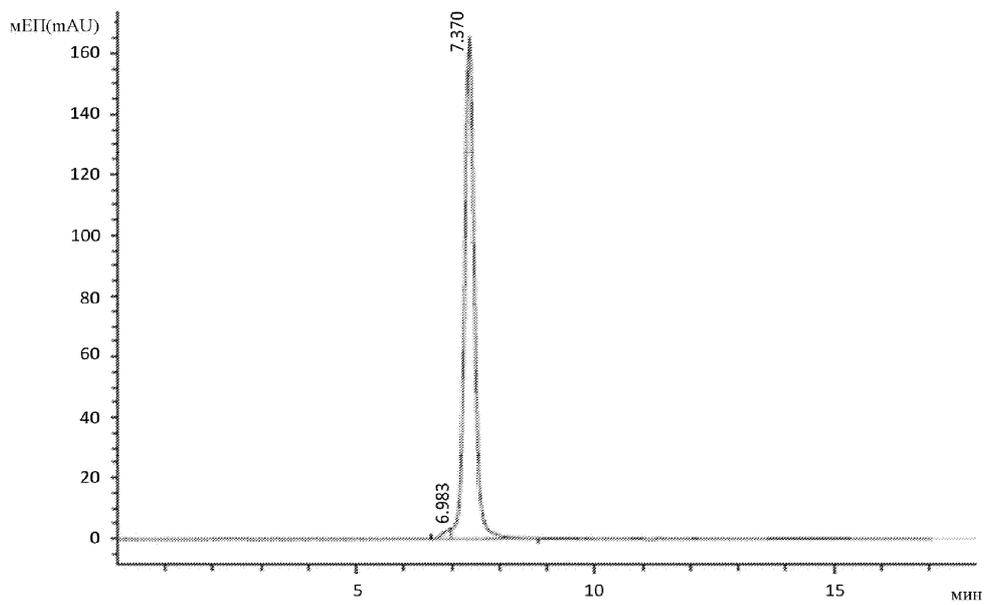


Фиг. 2

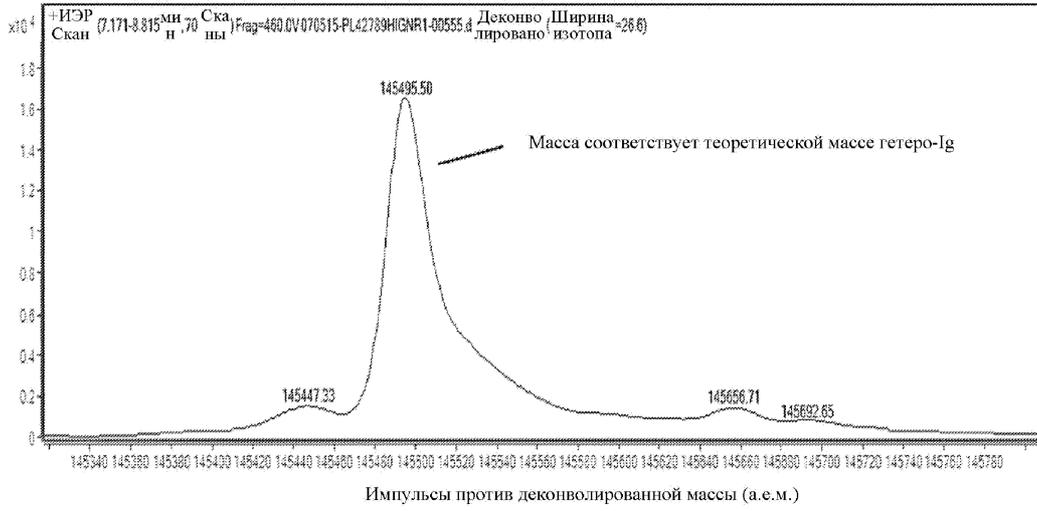




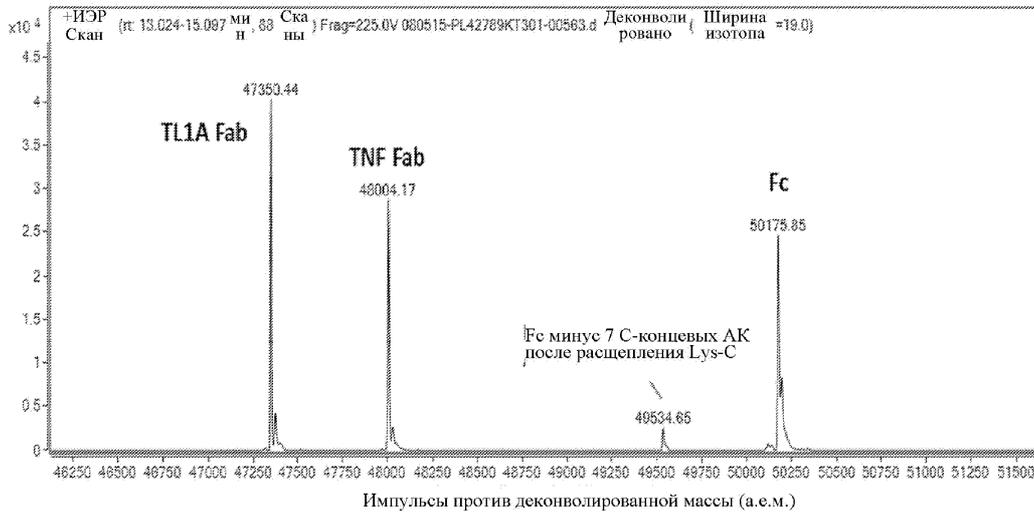
Фиг. 6



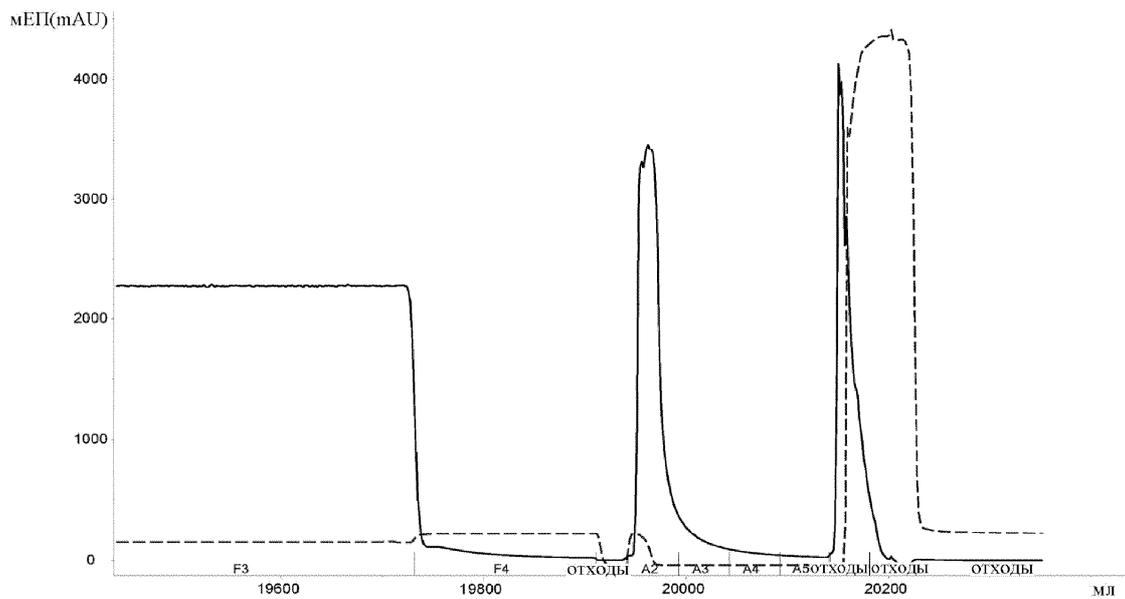
Фиг. 7



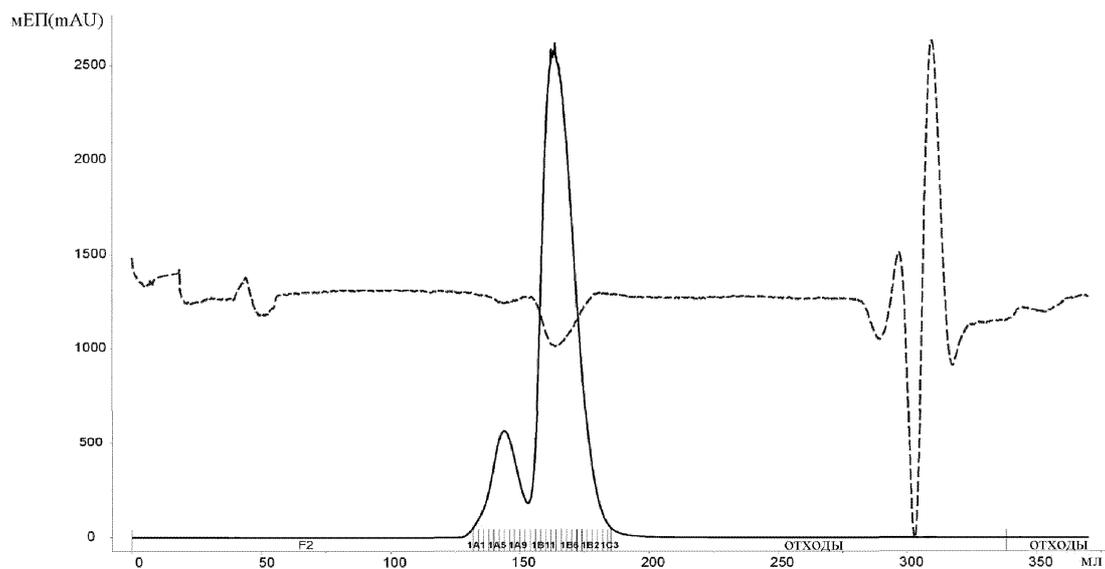
Фиг. 8



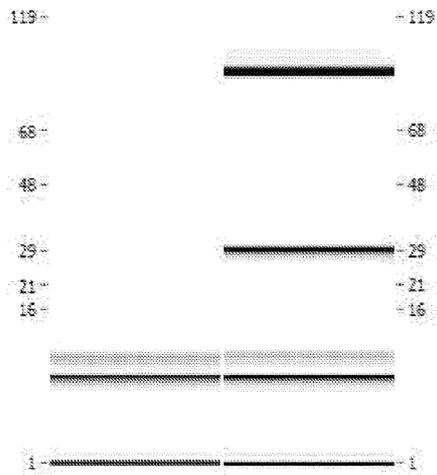
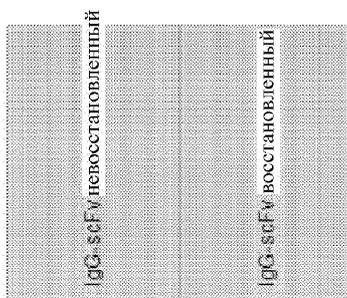
Фиг. 9



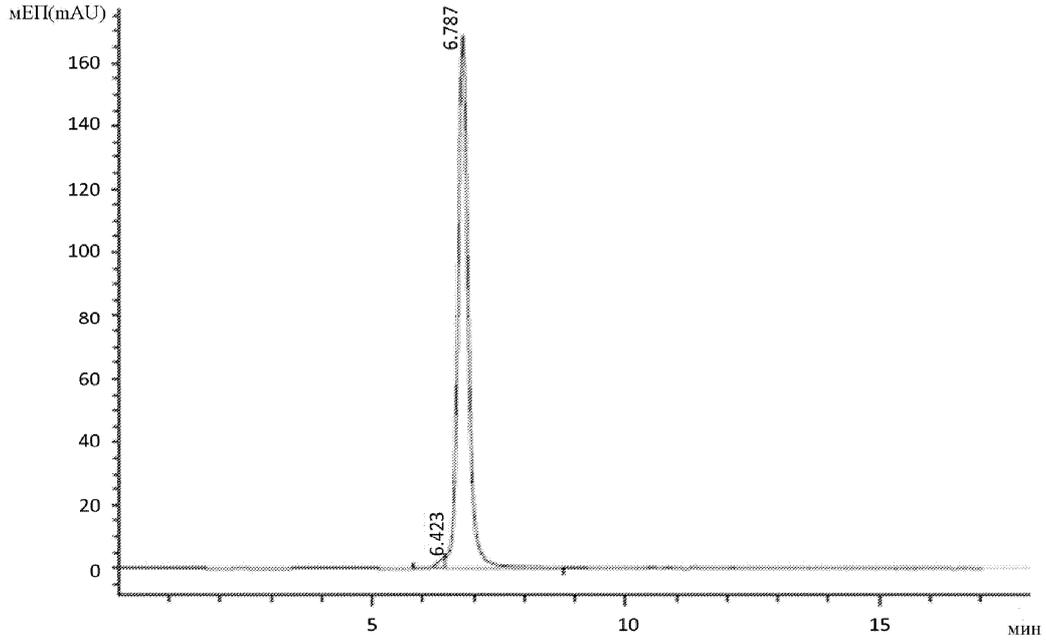
048161



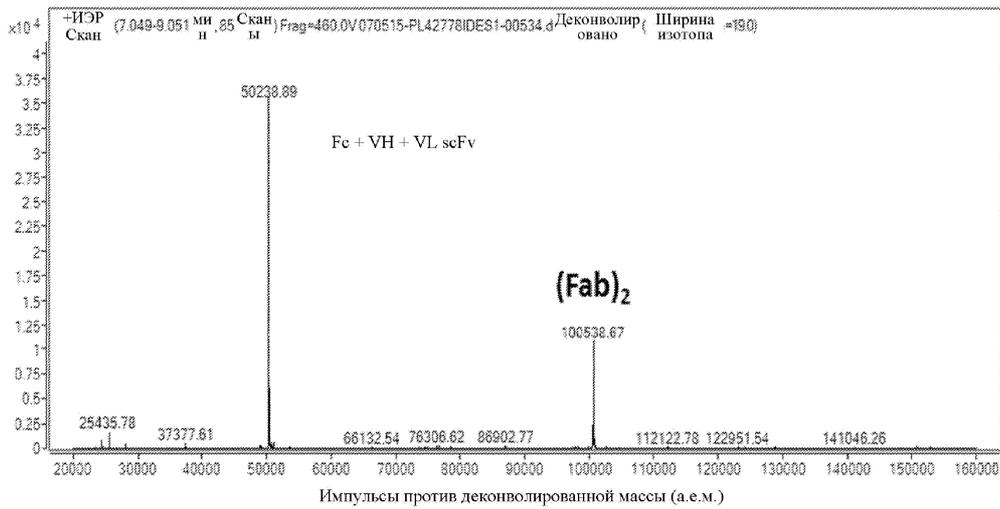
Фиг. 11



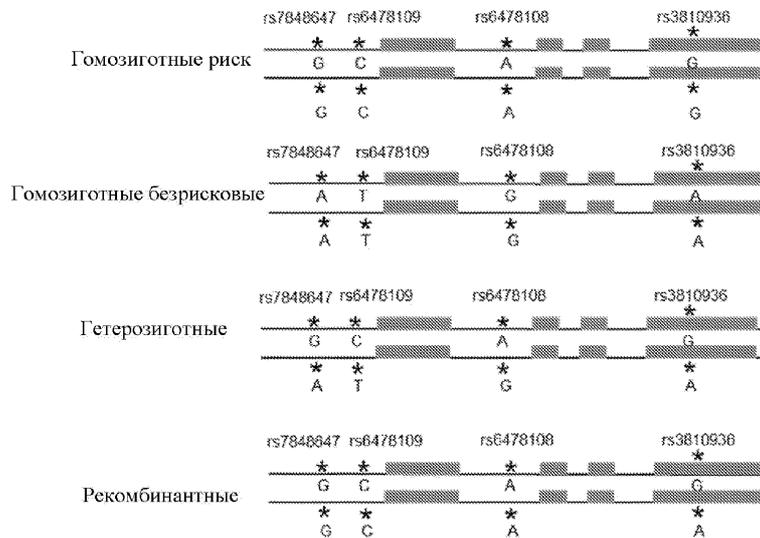
Фиг. 12



Фиг. 13



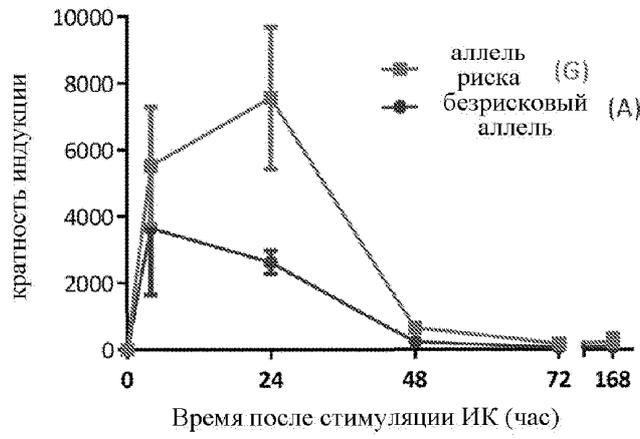
Фиг. 14



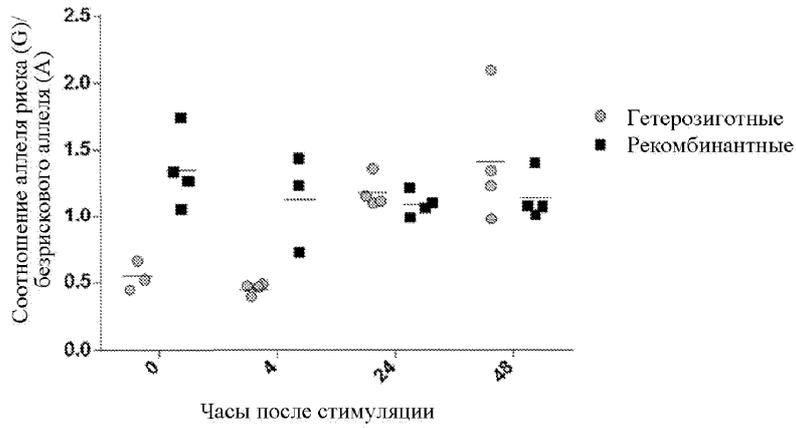
Фиг. 15



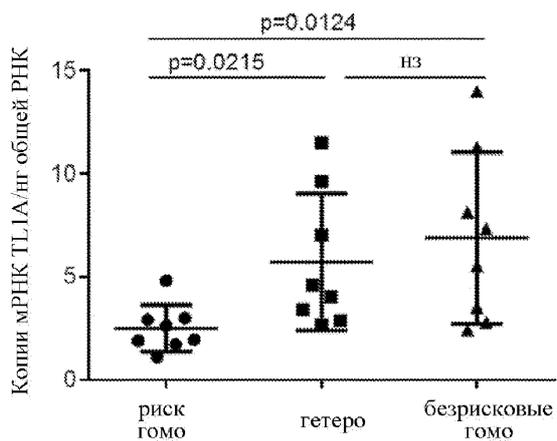
Фиг. 16А



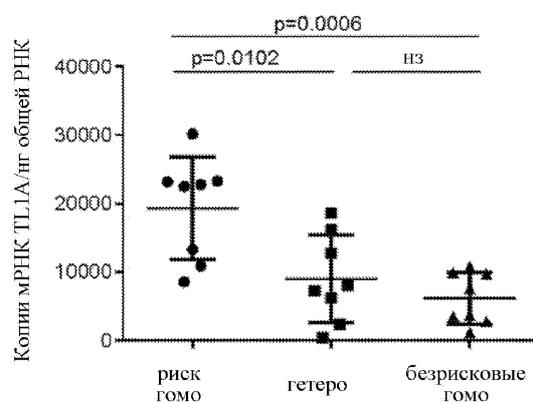
Фиг. 16В



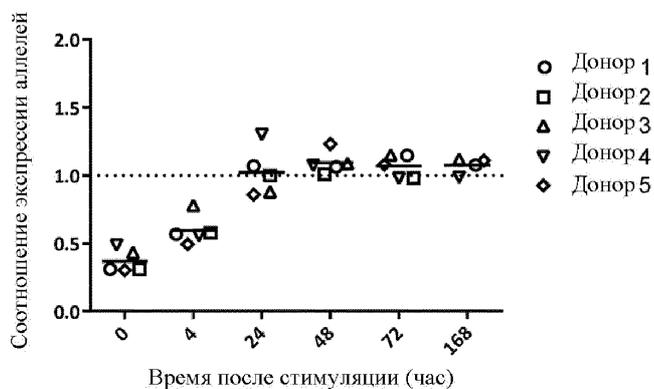
Фиг. 17



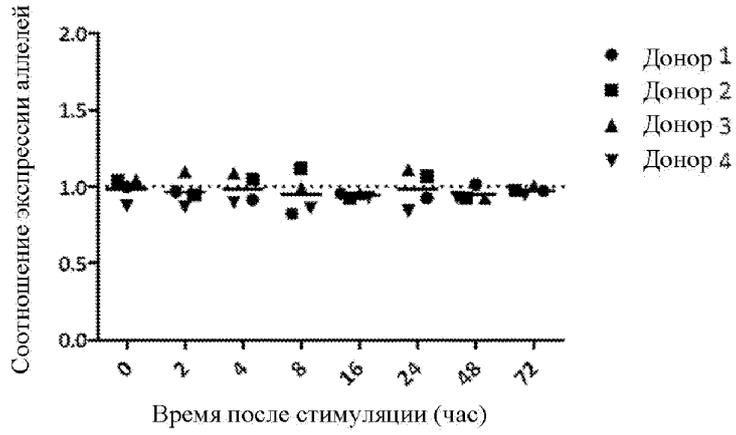
Фиг. 18А



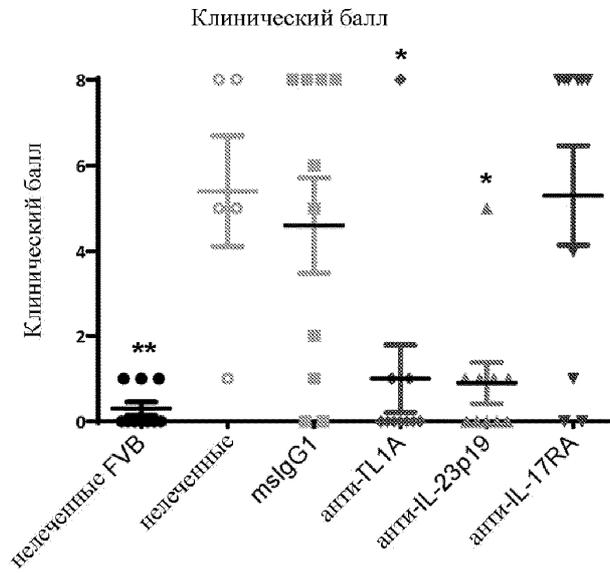
Фиг. 18В



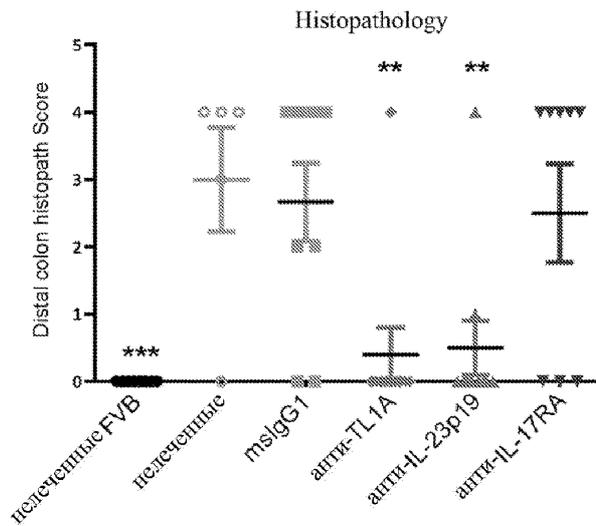
Фиг. 19А



Фиг. 19В

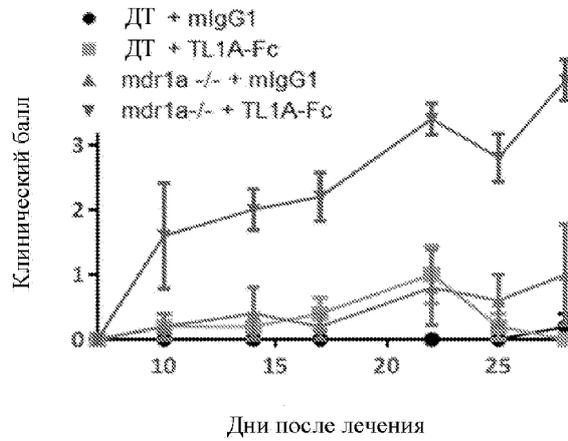


Фиг. 20А



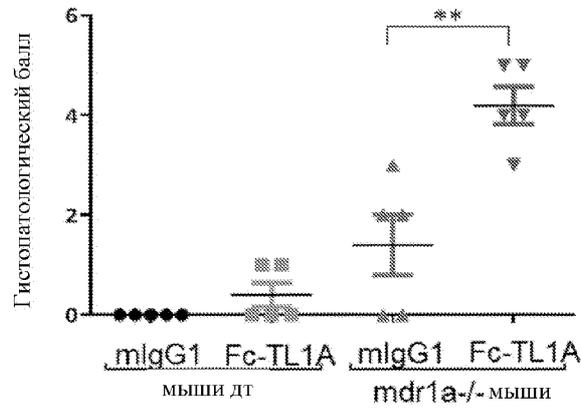
Фиг. 20В

Клинический балл

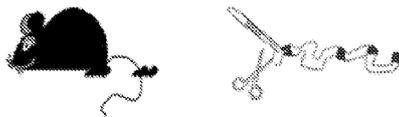


Фиг. 21А

Гистопатология

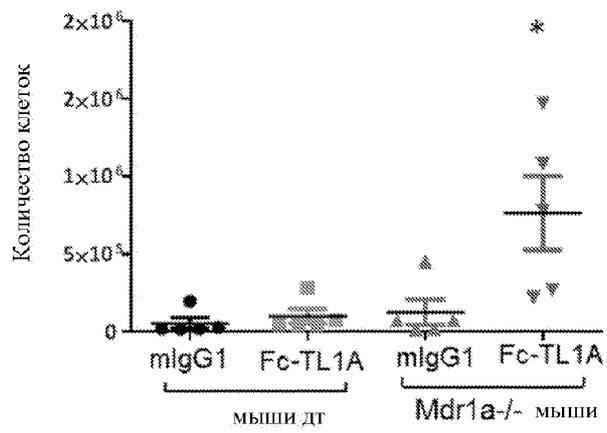


Фиг. 21В



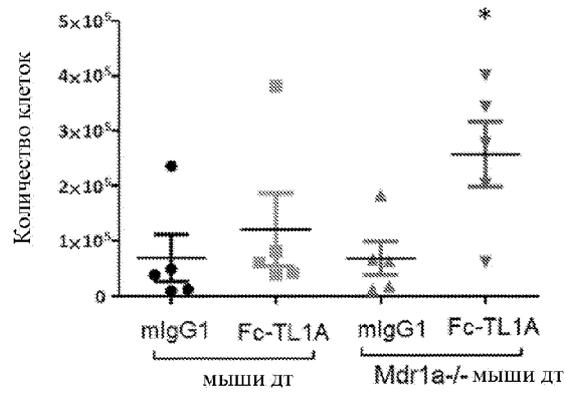
Фиг. 22А

Т-клетки



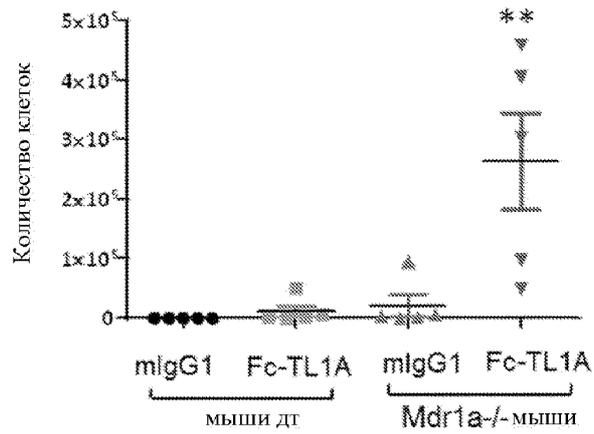
Фиг. 22В

В-клетка

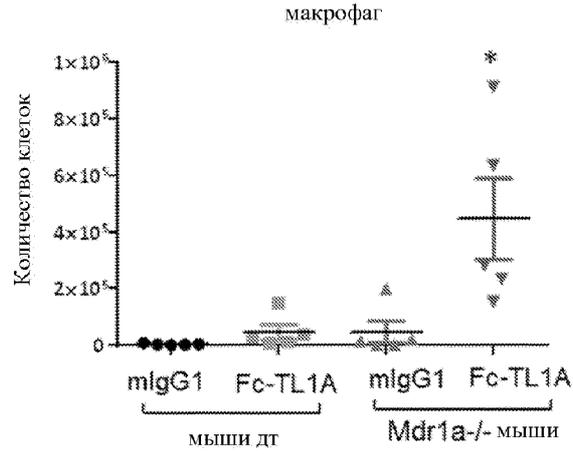


Фиг. 22С

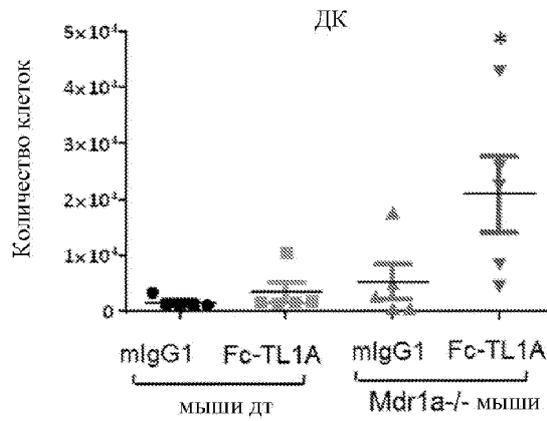
нейтрофил



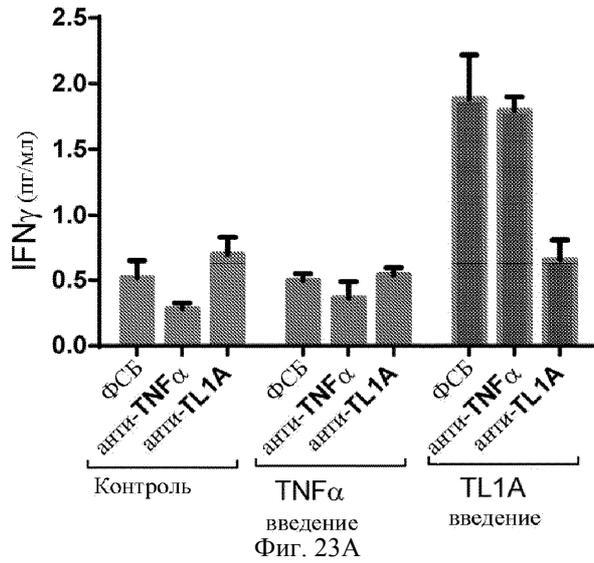
Фиг. 22D



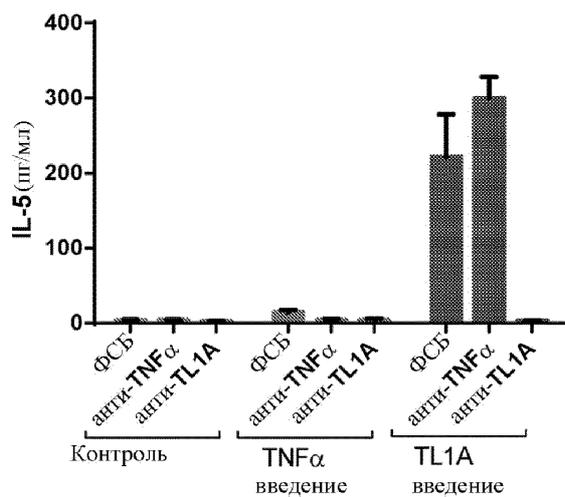
Фиг. 22Е



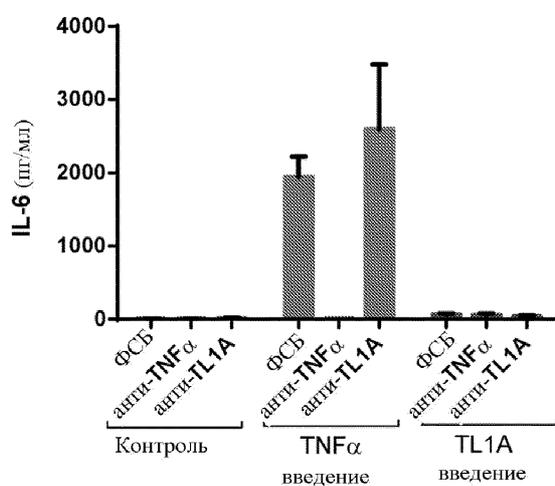
Фиг. 22F



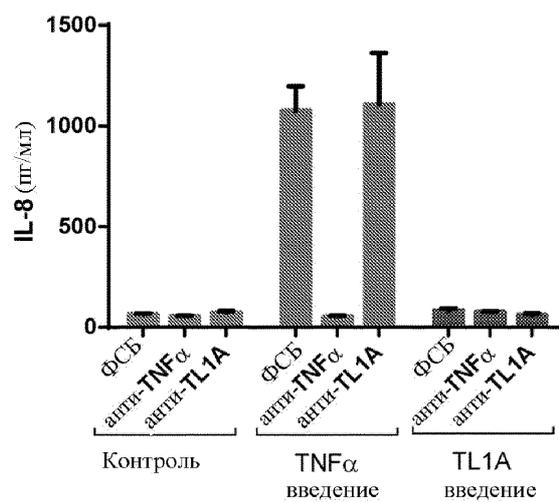
Фиг. 23А



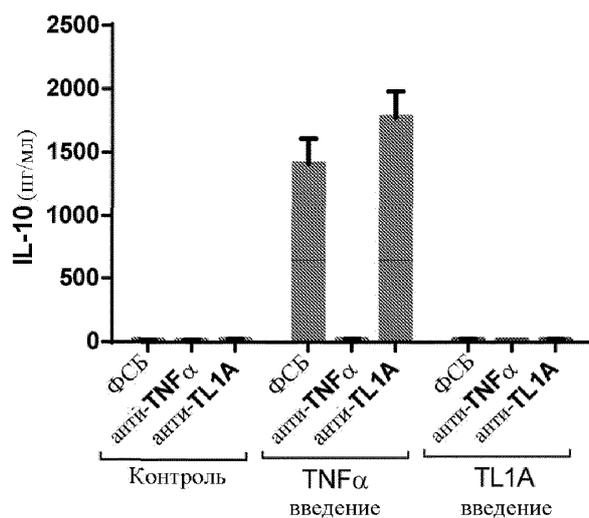
Фиг. 23B



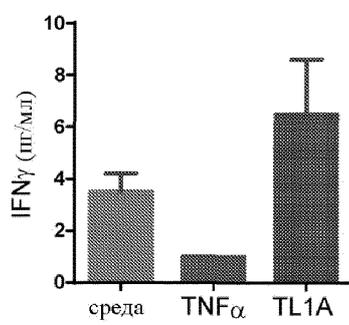
Фиг. 23C



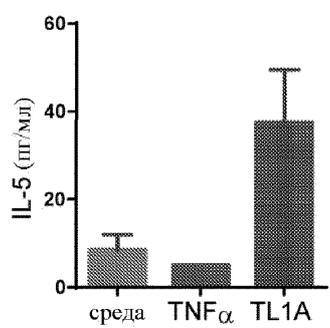
Фиг. 23D



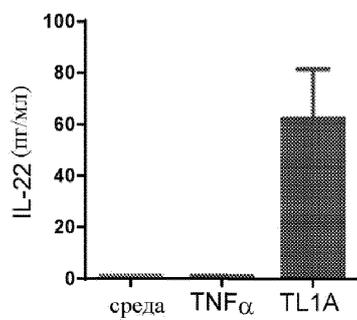
Фиг. 23Е



Фиг. 24А

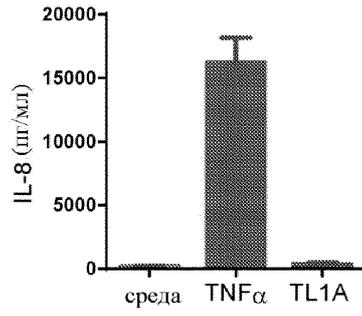


Фиг. 24В

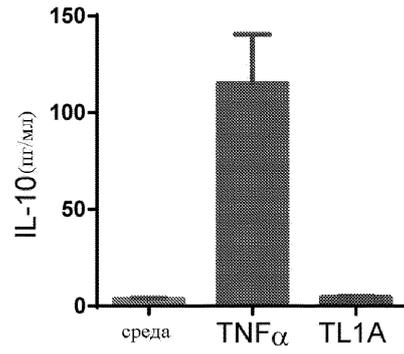


Фиг. 24С

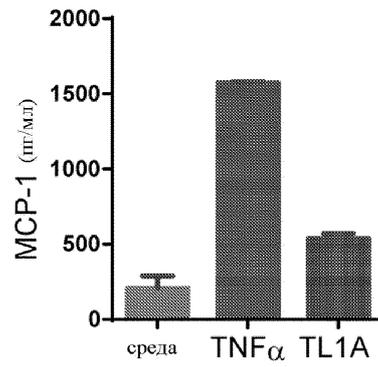
048161



Фиг. 24D

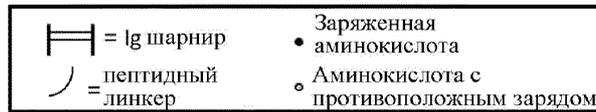
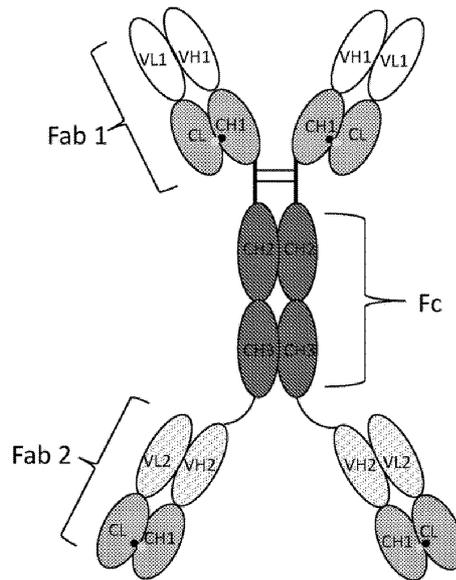


Фиг. 24E



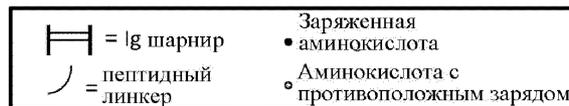
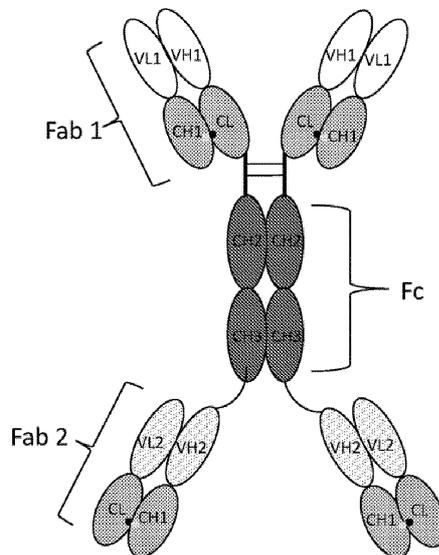
Фиг. 24F

Биспецифический IgG-Fab



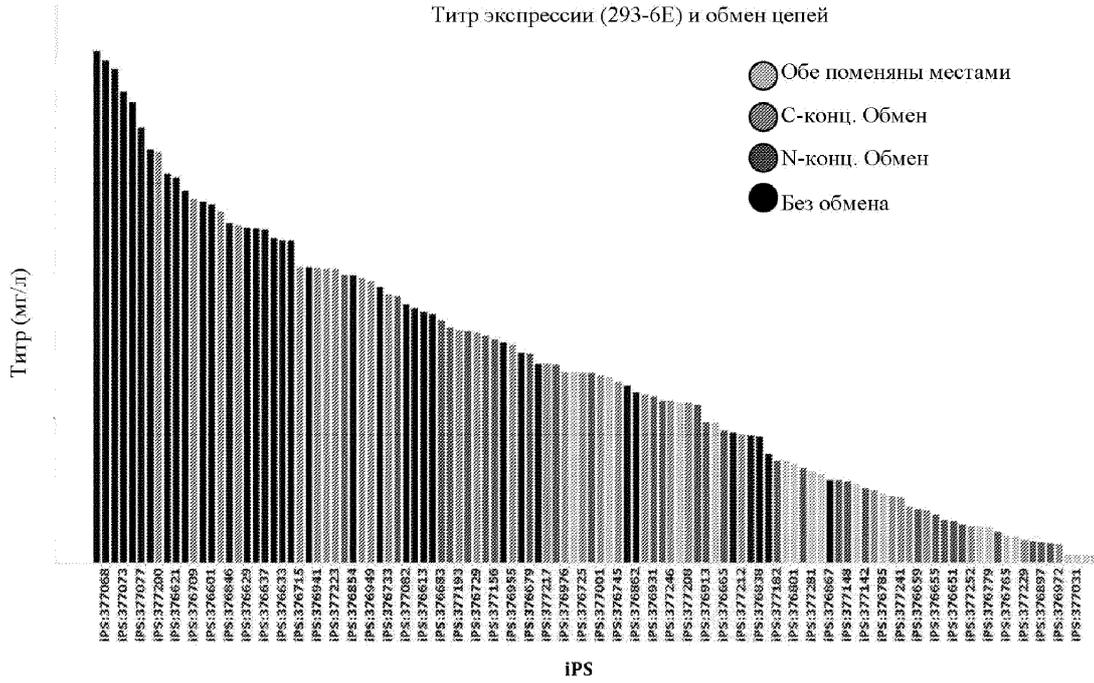
Фиг. 25

Биспецифический IgG-Fab, CH1/CL обмен

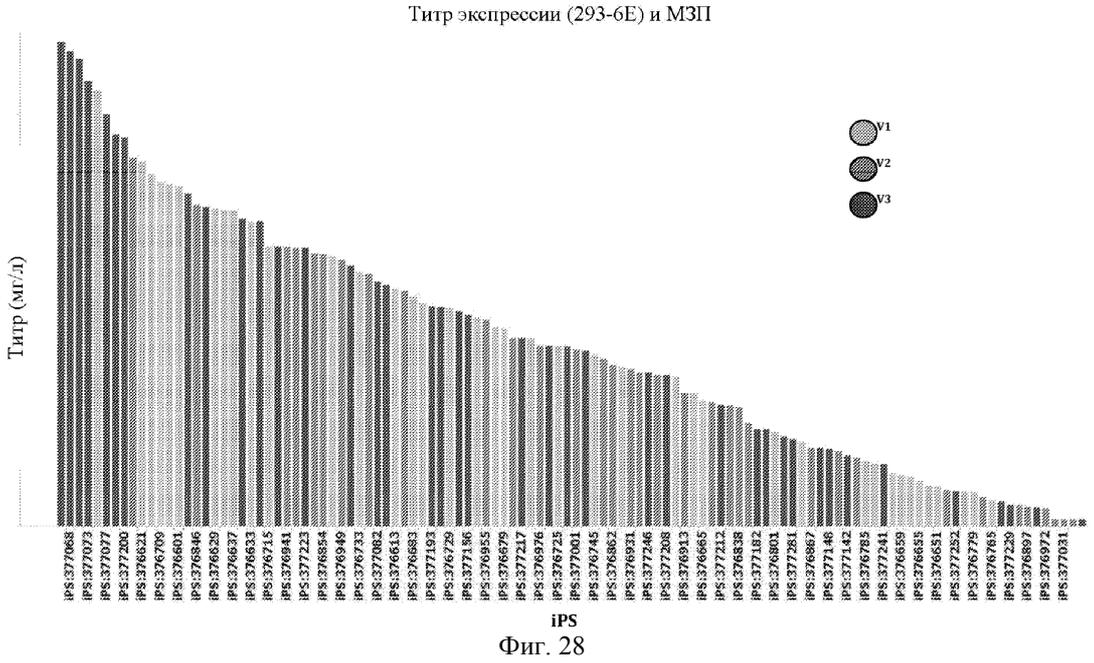


Фиг. 26

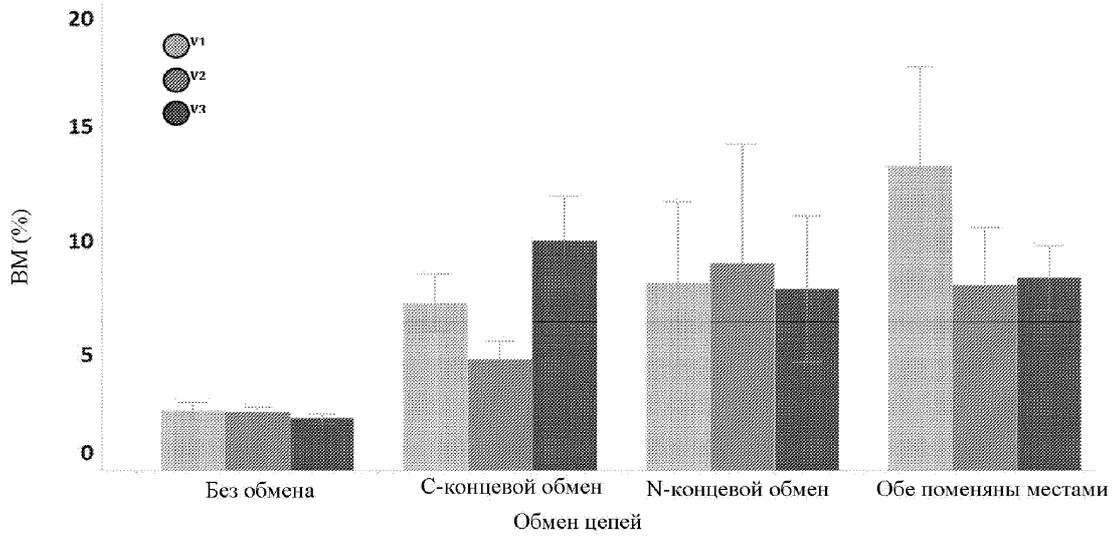
Титр IgG-Fab: обмен цепей



Титр IgG-Fab: мутации зарядовых пар

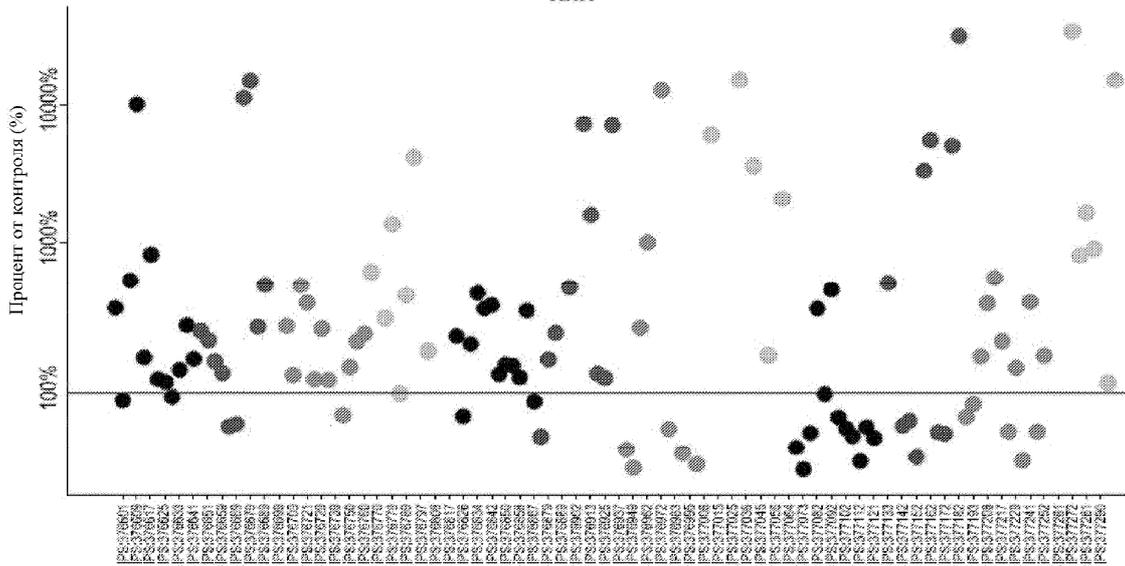


Чистота IgG-Fab: обмен цепей и влияние обмена цепей и МЗП на ВМ



Фиг. 29

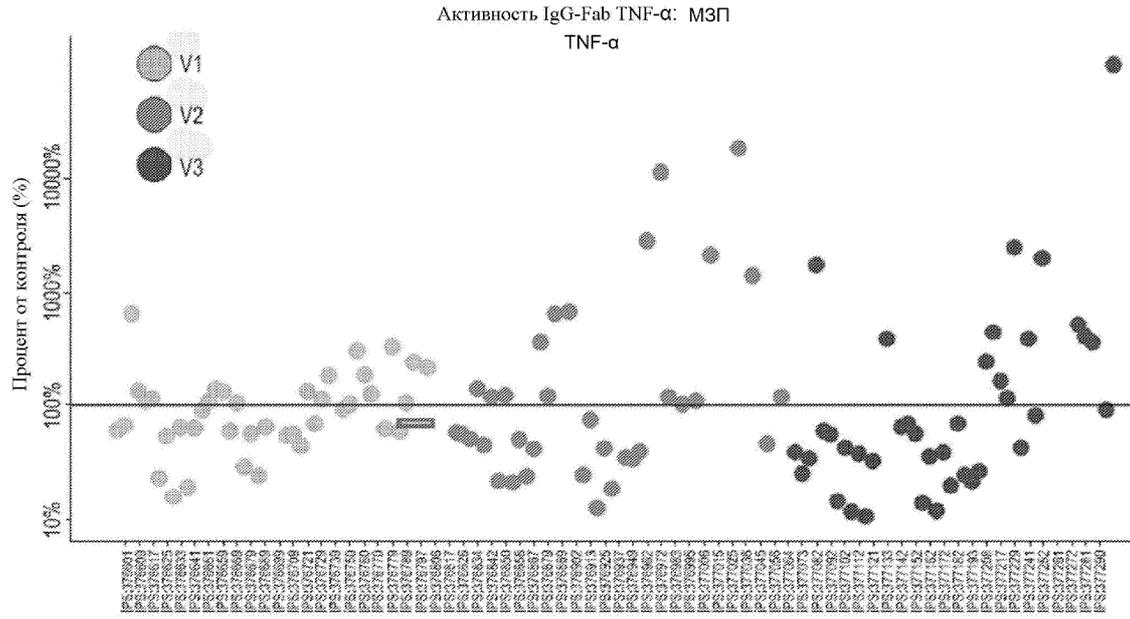
Активность IgG-Fab TL1A: обмен цепей TL1A



iPS

Фиг. 30





IPS  
Фиг. 33

