

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202393112** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
2024.03.14

(22) Дата подачи заявки  
2022.05.12

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
*A61K 45/00* (2006.01)

---

(54) **АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩАЯ МОЛЕКУЛА, СПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАЮЩАЯСЯ С RANKL И NGF, И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ В МЕДИЦИНЕ**

---

(31) 202110515444.9

(32) 2021.05.12

(33) CN

(86) PCT/CN2022/092333

(87) WO 2022/237856 2022.11.17

(71) Заявитель:

**ЦЗЯНСУ ХЭНЖУЙ  
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ КО.,  
ЛТД.; ШАНХАЙ ХЭНЖУЙ  
ФАРМАСЬЮТИКАЛ КО., ЛТД. (CN)**

(72) Изобретатель:

**Ин Хуа, Мао Ланюн, Гу Сяолин, Тао  
Вэйкан (CN)**

(74) Представитель:

**Хмара М.В. (RU)**

---

(57) Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающей молекуле, специфически связывающейся с RANKL и NGF, и ее медицинскому применению. В частности, предложены новое антитело к RANKL, биспецифическое антитело, нацеленное на RANKL и NGF, способ получения антитела и его применение в лечении или профилактике заболеваний.

**202393112**

**A1**

**A1**

**202393112**

## АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩАЯ МОЛЕКУЛА, СПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАЮЩАЯСЯ С RANKL И NGF, И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ В МЕДИЦИНЕ

Настоящая заявка испрашивает приоритет Китайской патентной заявки (заявка № 202110515444.9), поданной 12 мая 2021 г.

### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к области биофармацевтики. Более конкретно, настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим молекулам, которые специфически связываются с RANKL и NGF, и их применению.

### ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Формулировки, изложенные в настоящем документе, дают общую информацию, относящуюся к настоящему изобретению, и не обязательно могут представлять собой уровень техники.

Метастазы в костях являются частым сопутствующим симптомом на поздних стадиях многих видов рака. Патогенез костного метастазирования: первичные опухолевые клетки отделяются и попадают в систему кровообращения, образуя циркулирующие опухолевые клетки, и эти циркулирующие опухолевые клетки переносятся в костную часть, образуют трансмиссивные опухолевые клетки и находятся в состоянии покоя в костном микроокружении. Этот процесс может длиться годами до тех пор, пока выжившие опухолевые клетки постепенно не адаптируются к костному микроокружению. Опухолевые клетки активируются, переходя из состояния покоя в пролиферативное состояние (Mantyh, P.W., Curr Opin Support Palliat Care, 2014. 8(2):стр. 83-90). Пролиферация опухолевых клеток влияет на костное микроокружение и способствует образованию остеокластов, что приводит к ускоренной резорбции костей и высвобождению различных цитокинов, что дополнительно способствует пролиферации опухолевых клеток. Таким образом, образуется порочный круг (Quayle, L., Curr Cancer Drug Targets, 2015. 15(6): стр. 469-480). Постоянная пролиферация опухолевых клеток приводит к образованию множественных метастатических участков, что приводит к различным проблемам, таким как повреждение костей и боль у пациентов (Gartland, A., J Bone Oncol, 2016. 5(3): стр. 100-103).

Согласно статистике, к распространенным видам рака, сопровождающимся метастазами в кости, относятся миелома, рак почки, меланома, рак мочевого пузыря, рак щитовидной железы, рак легкого, рак молочной железы и рак предстательной железы (Cleazardin, P., Joint Bone Spine, 2017. 84(6): p. 677-684. Fidler, M.M., Scand J Public Health, 2018. 46(1):p. 27-36).

В нормальной костной ткани остеобласты и остеокласты находятся в относительно сбалансированном состоянии, что позволяет поддерживать нормальный рост и развитие костей. Однако присутствие раковых клеток нарушает данный баланс. Раковые клетки в костном микроокружении высвобождают ряд цитокинов для стимуляции секреции большого количества RANKL (лиганд рецептора-активатора ядерного фактора каппа В) из остеобластов и остеоцитов. Взаимодействие RANKL с рецептором RANK способствует образованию остеокластов, что приводит к усилению резорбции костной ткани. Остеолиз, вызванный резорбцией костной ткани, вызывает высвобождение других факторов роста, способствующих пролиферации раковых клеток. Таким образом, формируется цикл, благоприятствующий метастазированию раковых клеток (Body, J.J., Expert Rev Anticancer Ther, 2012. 12(3): стр. 307-322).

NGF представляет собой фактор роста нервов. Сигнальный путь NGF опосредует рост и развитие нервной системы и передачу болевых сигналов. В настоящее время известны два рецептора NGF на клеточной поверхности: высокоаффинный рецептор TrkA и низкоаффинный рецептор p75NTR. Взаимодействие NGF с TrkA одновременно активирует пути Ras и PI3K, способствуя выживанию клеток и росту нервов. Взаимодействие NGF с p75NTR стимулирует апоптоз. Более того, путь PI3K также активирует фосфорилирование TRPV1, вызывая активацию ионных каналов для генерации потенциалов действия и передачи сигналов от болевых нейронов (Kumar, V. and B.A.J Pain Res, 2012. 5: стр. 279-287).

Было показано, что моноклональные антитела, нацеленные на NGF и RANKL, оказывают определенное терапевтическое воздействие на костное повреждение и боль в костях, вызванные метастазами в кости (Body JJ. Expert Rev Anticancer Ther. 2012. 12(3): p.307-322. Sopata M, et al. 2015. 156(9): стр. 1703-1713).

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В соответствии с настоящим изобретением предложено биспецифическое антитело, которое одновременно блокирует RANKL и NGF и, следовательно, два критически важных сигнальных пути, связанных с потерей костной массы и болью; кроме того, биспецифическое антитело обладает хорошим анальгезирующим действием и защитным действием на костную ткань *in vivo*, а также и характеризуется хорошей безопасностью.

В одном аспекте настоящего изобретения предложена антигенсвязывающая молекула, содержащая по меньшей мере один первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с RANKL, и по меньшей мере один второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с NGF.

В некоторых вариантах осуществления в вышеописанной антигенсвязывающей молекуле первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с

RANKL, содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, причем:

i) переменная область тяжелой цепи содержит: HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; и

переменная область легкой цепи содержит: LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; или

ii) переменная область тяжелой цепи содержит: HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; и

переменная область легкой цепи содержит: LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; или

iii) переменная область тяжелой цепи содержит: HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и

переменная область легкой цепи содержит: LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления в вышеописанной антигенсвязывающей молекуле первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с RANKL, содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где:

i) переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 14, соответственно; и

переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно; или

ii) переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 15, соответственно; и

переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно; или

iii) переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, описанные в SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 3 соответственно; и

переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, описанные в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления в вышеупомянутой антигенсвязывающей молекуле первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с RANKL, содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где:

переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 36, 37 или 38; и/или

переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 40.

В некоторых вариантах осуществления в вышеупомянутой антигенсвязывающей молекуле первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с RANKL, содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где указанная переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 37; и/или

переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 40.

В некоторых вариантах осуществления в вышеупомянутой антигенсвязывающей молекуле первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с RANKL, содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, 37 или 38; и/или переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.

В некоторых вариантах осуществления в вышеупомянутой антигенсвязывающей молекуле первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с RANKL, содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом последовательность переменной области тяжелой цепи описана в SEQ ID NO: 36, 37 или 38; и/или последовательность переменной области легкой цепи описана в SEQ ID NO: 40.

В некоторых вариантах осуществления в вышеупомянутой антигенсвязывающей молекуле первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с RANKL, содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой

цепи, при этом переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и/или переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.

В некоторых вариантах осуществления в вышеупомянутой антигенсвязывающей молекуле первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с RANKL, содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36; и/или переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.

В некоторых вариантах осуществления в вышеупомянутой антигенсвязывающей молекуле первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с RANKL, содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38; и/или переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.

В некоторых вариантах осуществления в вышеупомянутой антигенсвязывающей молекуле первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с RANKL, содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом последовательность переменной области тяжелой цепи изложена в SEQ ID NO: 37; и/или последовательность переменной области легкой цепи изложена в SEQ ID NO: 40.

В некоторых вариантах осуществления в вышеупомянутой антигенсвязывающей молекуле второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с NGF, содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, в которой:

переменная область тяжелой цепи содержит: HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59; и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60; и

переменная область легкой цепи содержит: LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63.

В некоторых вариантах осуществления в вышеупомянутой антигенсвязывающей молекуле второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с NGF, содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, в где:

вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59 и SEQ ID NO: 60 соответственно; и

вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62 и SEQ ID NO: 63 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления в вышеупомянутой антигенсвязывающей молекуле второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с NGF, содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где:

вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 64; и/или вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 65.

В некоторых вариантах осуществления в вышеупомянутой антигенсвязывающей молекуле второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с NGF, содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64; и/или вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65.

В некоторых вариантах осуществления в вышеупомянутой антигенсвязывающей молекуле второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с NGF, содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, при этом последовательность вариабельной области тяжелой цепи изложена в SEQ ID NO: 64; и/или последовательность вариабельной области легкой цепи изложена в SEQ ID NO: 65.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая антигенсвязывающая молекула содержит Fc- область, содержащую две субъединицы, способные к ассоциации (димеризации).

В некоторых вариантах осуществления в вышеупомянутой антигенсвязывающей молекуле Fc-область представляет собой Fc-область IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> или IgG<sub>4</sub>; предпочтительно, Fc-область представляет собой Fc-область IgG<sub>4</sub>.

В некоторых вариантах осуществления в вышеупомянутой антигенсвязывающей молекуле Fc-область содержит одну или несколько аминокислотных замен.

В некоторых вариантах осуществления в вышеупомянутой антигенсвязывающей молекуле Fc-область представляет собой Fc-область человеческого IgG<sub>4</sub>, а аминокислотный остаток в положении 228 представляет собой P, в соответствии с нумерацией по EU-индексу.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая антигенсвязывающая молекула содержит первую цепь со структурой, имеющей формулу (I) и вторую цепь со структурой, имеющей формулу (II),

формула (I): VHa-линкер 1-VHb-CH1-одна субъединица Fc-области;

формула (II): VLa-линкер 2-VLb-CL;

при этом: VHa и VHb представляют собой переменные области тяжелой цепи, а VLa и VLb – переменные области легкой цепи; и

VHa и VLa могут образовывать первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с RANKL, а VHb и VLb могут образовывать второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с NGF; или

VHa и VLa могут образовывать второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с NGF, а VHb и VLb могут образовывать первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с RANKL; и

Линкер 1 и линкер 2 являются пептидными линкерами, идентичными или разными по последовательности.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая антигенсвязывающая молекула содержит две первые цепи со структурой, имеющей формулу (I) и две вторые цепи со структурой, имеющей формулу (II),

формула (I): VHa-линкер 1-VHb-CH1-одна субъединица Fc-области;

формула (II): VLa-линкер 2-VLb-CL;

при этом: VHa и VHb являются переменными областями тяжелой цепи, а VLa и VLb - переменными областями легкой цепи; и

VHa и VLa могут образовывать первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с RANKL, а VHb и VLb могут образовывать второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с NGF; или

VHa и VLa могут образовывать второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с NGF, а VHb и VLb могут образовывать первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с RANKL; и

Линкер 1 и линкер 2 являются пептидными линкерами, идентичными или разными по последовательности.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая антигенсвязывающая молекула содержит первую цепь со структурой, имеющей формулу (I) и вторую цепь со структурой, имеющей формулу (II),

формула (I): VHa-линкер 1-VHb-CH1-одна субъединица Fc-области;

формула (II): VLa-линкер 2-VLb-CL;

при этом: VHa и VHb представляют собой переменные области тяжелой цепи, а VLa и VLb – переменные области легкой цепи; и



VHa и VLа могут образовывать первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с RANKL, а VHb и VLb могут образовывать второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с NGF; линкер 1 и линкер 2 являются пептидными линкерами, идентичными или разными по последовательности;

где

i) VHa содержит: HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; и

VLа содержит: LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6;

или

ii) VHa содержит: HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; и

VLа содержит: LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; или

iii) VHa содержит: HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и

VLа содержит: LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; и

VHb содержит: HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59; и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60; и

VLb содержит: LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая антигенсвязывающая молекула содержит первую цепь со структурой, имеющей формулу (I) и вторую цепь со структурой, имеющей формулу (II),

формула (I): VHa-линкер 1-VHb-CH1-одна субъединица Fc-области;

формула (II): VLа-линкер 2-VLb-CL;

где: VHa и VHb представляют собой переменные области тяжелой цепи, а VLа и VLb - переменные области легкой цепи; и

VHa и VLа могут образовывать первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с RANKL, а VHb и VLb могут образовывать второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с NGF; линкер 1 и линкер 2 являются пептидными линкерами, идентичными или разными по последовательности; при этом,

VHa содержит: HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; и

VLа содержит LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6;

и

VHb содержит: HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59; и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60; и

VLb содержит: LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая антигенсвязывающая молекула содержит первую цепь со структурой, имеющей формулу (I) и вторую цепь со структурой, имеющей формулу (II),

формула (I): VHa-линкер 1-VHb-CH1-одна субъединица Fc-области;

формула (II): VLа-линкер 2-VLb-CL;

где: линкер 1 и линкер 2 являются пептидными линкерами, идентичными или разными по последовательности;

VHa содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, 37 или 38, а VLа содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; и

VHb содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, а VLb содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая антигенсвязывающая молекула содержит первую цепь со структурой, имеющей формулу (I) и вторую цепь со структурой, имеющей формулу (II),

формула (I): VHa-линкер 1-VHb-CH1-одна субъединица Fc-области;

формула (II): VLа-линкер 2-VLb-CL;

где: линкер 1 и линкер 2 являются пептидными линкерами, идентичными или разными по последовательности;

VHa содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, а VLа содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; и

VHb содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, а VLb содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65.

В некоторых вариантах осуществления в вышеупомянутой антигенсвязывающей молекуле линкер 1 или линкер 2 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в любой из SEQ ID NO: 70-97.

В некоторых вариантах осуществления в вышеупомянутой антигенсвязывающей молекуле линкер 1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70 и/или линкер 2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85.

В некоторых вариантах осуществления в вышеупомянутой антигенсвязывающей молекуле область CH1-Fc содержит последовательность SEQ ID NO: 51 или 66.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая антигенсвязывающая молекула содержит:

первую цепь, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98 % или 99% идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 98, 100 или 101; и/или

вторую цепь, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98 % или 99% идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 99.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая антигенсвязывающая молекула содержит по меньшей мере две цепи:

первую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98, 100 или 101; и вторую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая антигенсвязывающая молекула содержит по меньшей мере две цепи:

первую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98; и вторую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая антигенсвязывающая молекула содержит две первые цепи, идентичные по последовательности, и две вторые цепи, идентичные по последовательности.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая антигенсвязывающая молекула содержит две первые цепи, идентичные по последовательности, и две вторые цепи, идентичные по последовательности, при этом:

первые цепи содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98; а вторые цепи содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая антигенсвязывающая молекула имеет структуру DVD-IgG, содержащую первую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 98, и вторую цепь, изложенную в SEQ ID NO: 99.

В одном аспекте настоящего изобретения также предложена антигенсвязывающая молекула, содержащая первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с RANKL, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с NGF, при этом указанная антигенсвязывающая молекула конкурирует с антигенсвязывающей молекулой в соответствии с любым из вышеописанного за связывание с RANKL человека и/или NGF человека.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая антигенсвязывающая молекула обладает по меньшей мере одним из следующих свойств:

i) аффинность, с которой первый антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с RANKL, связывается с RANKL, выше, чем аффинность, с которой второй антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с NGF, связывается с NGF;

ii) значение EC<sub>50</sub>, с которым первый антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с RANKL, связывается с RANKL человека, меньше, чем значение EC<sub>50</sub>, с которым второй антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с NGF, связывается с NGF человека; и

iii) значение IC<sub>50</sub>, при котором первый антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с RANKL, блокирует связывание RANKL с RANK, меньше значения IC<sub>50</sub>, при котором второй антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с NGF, блокирует связывание NGF с TrKA.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая антигенсвязывающая молекула обладает, по меньшей мере, одним из следующих свойств:

i) аффинность, с которой первый антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с RANKL, связывается с RANKL, выше, чем аффинность, с которой второй антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с NGF, связывается с NGF, как определено Biacore;

ii) значение EC<sub>50</sub>, с которым первый антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с RANKL, связывается с RANKL человека, меньше, чем значение EC<sub>50</sub>, с которым второй антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с NGF, связывается с NGF человека, как определено методом ИФА; и

iii) значение IC<sub>50</sub>, при котором первый антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с RANKL, блокирует связывание RANKL с RANK, меньше, чем значение IC<sub>50</sub>, при котором второй антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с NGF, блокирует связывание NGF с TrKA, как определено методом ИФА.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая антигенсвязывающая молекула обладает по меньшей мере одним из следующих свойств:

i) аффинность, с которой первый антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с RANKL, связывается с RANKL, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей

мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза или по меньшей мере в 5 раз больше, чем аффинность, с которой второй антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с NGF, связывается с NGF, как определено Biacore;

ii) значение EC50, с которым первый антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с RANKL, связывается с RANKL человека, по меньшей мере в 25 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 15 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 9 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 4 раза или по меньшей мере в 2 раза меньше значения EC50, с которым второй антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с NGF, связывается с NGF человека, как определено посредством ИФА; и

iii) значение IC50, при котором первый антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с RANKL, блокирует связывание RANKL с RANK, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 15 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 4 раза, или по меньшей мере в 2 раза меньше значения IC50, при котором второй антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с NGF, блокирует связывание NGF с TrKA, как определено посредством ИФА.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая антигенсвязывающая молекула обладает по меньшей мере одним из следующих свойств:

i) первый антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с RANKL, связывается с RANKL со значением KD менее 5 наномоль (нМ), менее 4 нМ, менее 3 нМ или менее 2 нМ; и

второй антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с NGF, связывается с NGF со значением KD более 10 нМ;

ii) первый антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с RANKL, связывается с RANKL человека с EC50 менее 0,13 нМ, и

второй антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с NGF, связывается с NGF человека с EC50 более 3 нМ; и

iii) первый антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с RANKL, блокирует связывание RANKL с RANK с IC50 менее 0,5 нМ; и

второй антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с NGF, блокирует связывание NGF с TrKA с IC50 более 4 нМ.

В одном из аспектов настоящего изобретения предложено антитело к RANKL с относительно высокой аффинностью.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутое антитело к RANKL содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где:

i) вариабельная область тяжелой цепи содержит: HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; HCDR2, содержащую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; и

вариабельная область легкой цепи содержит: LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; или

ii) вариабельная область тяжелой цепи содержит: HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; и

вариабельная область легкой цепи содержит: LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; или

iii) вариабельная область тяжелой цепи содержит: HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и

вариабельная область легкой цепи содержит: LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутое антитело к RANKL содержит вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, где:

i) вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 14 соответственно; и

вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно; или

ii) вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 15 соответственно; и

вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно; или

iii) вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 3 соответственно; и

вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, изложенные в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутое антитело к RANKL содержит вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, где

указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 36, 37 или 38; и/или

вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 40.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутое антитело к RANKL содержит вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, где указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 37; и/или

вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 40.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутое антитело к RANKL содержит вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, где указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, 37 или 38; и/или вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутое антитело к RANKL содержит вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, где последовательность вариабельной области тяжелой цепи изложена в SEQ ID NO: 36, 37 или 38; и/или последовательность вариабельной области легкой цепи изложена в SEQ ID NO: 40.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутое антитело к RANKL содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и/или вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутое антитело к RANKL содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36; и/или вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутое антитело к RANKL содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 38; и/или переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутое антитело к RANKL содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где последовательность переменной области тяжелой цепи изложена в SEQ ID NO: 37; и/или последовательность переменной области легкой цепи изложена в SEQ ID NO: 40.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутое антитело к RANKL содержит константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутое антитело к RANKL содержит константную область тяжелой цепи IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 и константную область легкой цепи  $\lambda$  или легкой цепи  $\kappa$ .

В некоторых вариантах осуществления в вышеупомянутом антителе к RANKL константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51 и/или константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутое антитело к RANKL содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где:

тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 53, 55 или 56; и/или легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 54.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутое антитело к RANKL содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где:

тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 53; и/или легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 54.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутое антитело к RANKL содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где:

тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 55; и/или легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 86%,



87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 54.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутое антитело к RANKL содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где:

тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 56; и/или легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 54.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутое антитело к RANKL содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом:

тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53 и/или легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54; или

тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55 и/или легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54; или

тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56 и/или легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутое антитело к RANKL содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом:

последовательность тяжелой цепи изложена в SEQ ID NO: 53 и/или последовательность легкой цепи изложена в SEQ ID NO: 54; или

последовательность тяжелой цепи изложена в SEQ ID NO: 55 и/или последовательность легкой цепи изложена в SEQ ID NO: 54; или

последовательность тяжелой цепи изложена в SEQ ID NO: 56 и/или последовательность легкой цепи изложена в SEQ ID NO: 54.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутое антитело к RANKL представляет собой фрагмент антитела; предпочтительно фрагмент антитела выбран из группы, состоящей из Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv, scFv, dsFv и dAb.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутое антитело к RANKL обладает следующими свойствами:

антитело связывается с RANKL человека со значением KD менее 5 нМ; и/или

антитело блокирует связывание RANKL с RANK со значением IC<sub>50</sub> менее 0,5 нМ.

В одном из аспектов настоящего изобретения также предложено биспецифическое антитело, содержащее антитело к RANKL в соответствии с любым из вышеописанного.

В одном из аспектов настоящего изобретения предложена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующую антигенсвязывающую молекулу согласно любому из

вышеописанного, или антитело к RANKL согласно любому из вышеописанного, или биспецифическое антитело в соответствии с вышеизложенным.

В одном из аспектов настоящего изобретения также предложен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту согласно вышеизложенному.

В одном из аспектов настоящего изобретения также предложена клетка-хозяин, содержащая вектор согласно вышеизложенному.

Клетка-хозяин по настоящему изобретению не может развиваться в полноценное животное или растение.

В одном из аспектов настоящего изобретения предложен способ получения антигенсвязывающей молекулы или антитела к RANKL или биспецифического антитела, включающий культивирование клетки-хозяина согласно вышеизложенному в условиях, подходящих для экспрессии антигенсвязывающей молекулы или антитела к RANKL или биспецифического антитела.

В одном из аспектов настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая:

профилактически или терапевтически эффективное количество антигенсвязывающей молекулы согласно любому из вышеописанного, или антитела к RANKL согласно любому из вышеописанного, или биспецифического антитела согласно вышеописанному, и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей, буферов или вспомогательных веществ.

В одном из аспектов настоящего изобретения предложен способ лечения или предупреждения родственного заболевания, включающий введение субъекту профилактически или терапевтически эффективного количества антигенсвязывающей молекулы согласно вышеизложенному или антитела к RANKL согласно любому из вышеизложенного, или биспецифического антитела согласно вышеизложенному, или фармацевтической композиции согласно вышеизложенному.

В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой боль, тугоподвижность суставов или потерю костной массы.

В некоторых вариантах осуществления боль выбрана из группы, состоящей из костно-суставной боли, боли при ревматоидном артрите, подагры, боли при раке кости, послеоперационной боли, синдрома болезненного мочевого пузыря, хронического простатита, хронической тазовой боли, боли в пояснице, боли, ассоциированной с заболеванием костей и боли, ассоциированной с периферическими нервами.

В некоторых вариантах осуществления потеря костной массы ассоциирована по меньшей мере с одним состоянием, выбранным из группы, состоящей из остеопороза, болезни Педжета, остеомиелита, гиперкальциемии, остеопении, остеонекроза, воспаления, аутоиммунного заболевания, ревматоидного артрита, резорбции пародонтальной кости, остеолитических метастазов и рака. В некоторых вариантах

осуществления рак выбран из группы, состоящей из рака молочной железы, рака предстательной железы, рака щитовидной железы, рака почки, рака легкого, рака пищевода, рака прямой кишки, рака мочевого пузыря, рака шейки матки, рака яичников, рака печени, рака желудочно-кишечного тракта, меланомы, множественной миеломы, остеосаркомы, лимфомы, немелкоклеточного рака легкого, опухоли кости и болезни Ходжкина.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутое заболевание представляет собой заболевание, ассоциированное с NGF или RANKL.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутое заболевание представляет собой заболевание, при котором экспрессируется NGF или RANKL.

В одном из аспектов настоящего изобретения предложен способ лечения или предупреждения заболевания, ассоциированного с NGF или RANKL, причем способ включает введение субъекту профилактически или терапевтически эффективного количества антигенсвязывающей молекулы в соответствии с любым из вышеописанного, или антитела к RANKL согласно любому из вышеописанного, или биспецифического антитела согласно вышеописанному, или фармацевтической композиции согласно вышеописанному.

В некоторых вариантах осуществления заболевание, ассоциированное с NGF или RANKL, представляет собой боль, тугоподвижность суставов или потерю костной массы.

В одном из аспектов настоящего изобретения также предложено применение антигенсвязывающей молекулы согласно любому из вышеописанного, или антитела к RANKL согласно любому из вышеописанного, или биспецифического антитела согласно любому из вышеописанного, или фармацевтической композиции согласно вышеописанному, для получения лекарственного средства для предупреждения или лечения заболевания или расстройства. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой боль, тугоподвижность суставов или потерю костной массы.

В некоторых вариантах осуществления боль выбрана из группы, состоящей из костно-суставной боли, боли при ревматоидном артрите, подагры, боли при раке кости, послеоперационной боли, синдрома болезненного мочевого пузыря, хронического простатита, хронической тазовой боли, боли в пояснице, боли, ассоциированной с заболеванием костей и боли, ассоциированной с периферическими нервами. В некоторых вариантах осуществления потеря костной массы ассоциирована по меньшей мере с одним состоянием, выбранным из группы, состоящей из остеопороза, болезни Педжета, остеомиелита, гиперкальциемии, остеопении, остеонекроза, воспаления, аутоиммунного заболевания, ревматоидного артрита, резорбции пародонтальной кости, остеолитических метастазов и рака. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из рака молочной железы, рака предстательной железы, рака щитовидной

железы, рака почки, рака легкого, рака пищевода, рака прямой кишки, рака мочевого пузыря, рака шейки матки, рака яичников, рака печени, рака желудочно-кишечного тракта, меланомы, множественной миеломы, остеосаркомы, лимфомы, немелкоклеточного рака легкого, опухоли кости и болезни Ходжкина.

В одном из аспектов настоящего изобретения антигенсвязывающая молекула согласно любому из вышеописанного, или антитело к RANKL согласно любому из вышеописанного, или биспецифическое антитело согласно вышеописанному, или фармацевтическая композиция согласно вышеописанному могут использоваться в качестве лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления предложено применение в качестве лекарственного средства для лечения боли, тугоподвижности суставов или потери костной массы. В некоторых вариантах осуществления предложено применение в качестве лекарственного средства для лечения костно-суставной боли, боли при ревматоидном артрите, подагры, боли при раке кости, послеоперационной боли, синдрома болезненного мочевого пузыря, хронического простатита, хронической тазовой боли, боли в пояснице, боли, ассоциированной с заболеванием костей и боли, ассоциированной с периферическими нервами. В некоторых вариантах осуществления предложено применение в качестве лекарственного средства для лечения потери костной массы, вызванной остеопорозом, болезнью Педжета, остеомиелитом, гиперкальциемией, остеопенией, остеонекрозом, воспалением, аутоиммунным заболеванием, ревматоидным артритом, резорбцией периодонтальной кости, остеолитическими метастазами и раком.

В одном из аспектов настоящего изобретения предложено применение антигенсвязывающей молекулы согласно любому из вышеперечисленного или антитела к RANKL согласно любому из вышеперечисленного, или биспецифического антитела согласно любому из вышеперечисленного, или фармацевтической композиции согласно вышеизложенному, для получения лекарственного средства для предупреждения или лечения заболевания, ассоциированного с NGF или RANKL. В некоторых вариантах осуществления заболевание, ассоциированное с NGF- или RANKL, представляет собой боль, тугоподвижность суставов или потерю костной массы.

В одном из аспектов антигенсвязывающая молекула согласно любому из вышеперечисленного или антитело к RANKL согласно любому из вышеперечисленного, или биспецифическое антитело согласно вышеописанному, или фармацевтическая композиция согласно вышеописанному, предложенные в настоящем изобретении, может применяться в качестве лекарственного средства для предупреждения или лечения заболевания, ассоциированного с NGF или RANKL. В некоторых вариантах осуществления заболевание, ассоциированное с NGF- или RANKL, представляет собой боль, тугоподвижность суставов или потерю костной массы.

В одном из аспектов настоящего изобретения предложен способ предупреждения или лечения боли или ингибирования потери костной массы, причем указанный способ

включает введение индивидууму эффективного количества антагониста NGF и антагониста RANKL; причем антагонист NGF и антагонист RANKL вводят одновременно или последовательно.

В одном из аспектов настоящего изобретения предложено применение антагониста NGF и антагониста RANKL для получения лекарственного средства для предупреждения или лечения боли или ингибирования потери костной массы.

В одном из аспектов настоящего изобретения предложено применение антагониста NGF в комбинации с антагонистом RANKL для лечения боли или ингибирования потери костной массы; причем антагонист NGF и антагонист RANKL вводят одновременно или последовательно.

В некоторых вариантах осуществления антагонист NGF и антагонист RANKL находятся в одном и том же контейнере или в разных контейнерах.

В одном из аспектов настоящего изобретения предложен антагонист NGF для применения в предупреждении или лечении боли или ингибировании потери костной массы, причем антагонист NGF используется в комбинации с антагонистом RANKL, и антагонист NGF и антагонист RANKL не находятся в одном контейнере.

В одном из аспектов настоящего изобретения предложен антагонист RANKL для применения в предотвращении или лечении боли или ингибировании потери костной массы, при этом антагонист RANKL используется в комбинации с антагонистом NGF, и антагонист NGF и антагонист RANKL не находятся в одном контейнере.

В одном из аспектов настоящего изобретения предложена композиция, содержащая антагонист NGF и антагонист RANKL, для применения в предупреждении или лечении боли или ингибировании потери костной массы.

В некоторых вариантах осуществления антагонист NGF представляет собой антитело к NGF.

В некоторых вариантах осуществления антагонист RANKL представляет собой антитело к RANKL.

В некоторых вариантах осуществления антагонист NGF и антагонист RANKL приготовлены в виде смеси.

В некоторых других вариантах осуществления антагонист NGF и антагонист RANKL не находятся в форме смеси, а антагонист NGF и антагонист RANKL содержатся в разных контейнерах или упакованы в разные наборы.

Следует понимать, что для практического клинического применения антагонист NGF и антагонист RANKL можно получать по отдельности, но клинически их применяют в комбинации. В инструкции по применению антагониста NGF/антагониста RANKL, если указано, что антагонист NGF вводят в комбинации с антагонистом RANKL, это подпадает под «применение антагониста NGF и антагониста RANKL для получения лекарственного средства для предупреждения или лечения заболевания».

В некоторых вариантах осуществления антагонист NGF и антагонист RANKL вводят одновременно или последовательно. Следует понимать, что «одновременно» не следует понимать как один и тот же момент времени. Если антагонист NGF и антагонист RANKL вводятся с интервалом не более 30 мин (включительно), это можно считать «одновременным введением». Если оба препарата вводятся с интервалом более 30 минут, это можно считать «последовательным введением». Верхний предел интервала между их введениями определяется как момент времени, в котором они еще могут оказывать синергетический эффект.

В некоторых вариантах осуществления антитело к NGF представляет собой танезумаб и/или антитело к RANKL представляет собой AMR2.

В некоторых вариантах осуществления антитело к NGF представляет собой танезумаб и/или антитело к RANKL представляет собой деносумаб.

Антигенсвязывающая молекула, предложенная в настоящем изобретении, имеет следующие характеристики: хорошую терапевтическую активность, безопасность, фармакокинетические свойства и пригодность для разработки лекарств (например, стабильность).

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

ФИГ. 1: диаграмма структуры DVD-IgG.

ФИГ. 2A-2D: На фиг. 2A представлены статистические результаты болевого поведения у мышей на 14-е сутки комбинированной терапии; на фиг. 2B представлены статистические результаты болевого поведения у мышей на 21-е сутки комбинированной терапии; на ФИГ. 2C представлена шкала повреждения костей у мышей на 14-е сутки комбинированной терапии; на ФИГ. 2D представлена шкала повреждения костей у мышей на 21-е сутки комбинированной терапии; где в сравнении с носителем; \*\*\*\* обозначает в сравнении с носителем,  $P < 0.0001$ ; \*\*\* обозначает в сравнении с носителем,  $P < 0.001$ ; \* обозначает в сравнении с носителем,  $P < 0.05$ . холостой контроль; плацебо.

ФИГ. 3A-Фиг. 3B: на фиг. 3A представлены статистические результаты болевого поведения у мышей на 14-е сутки применения биспецифического антитела 1; на ФИГ. 3B представлены статистические результаты болевого поведения у мышей на 21-е сутки применения биспецифического антитела 1; где в сравнении с носителем \*\*\*\* обозначает в сравнении с носителем,  $P < 0.0001$ ; \*\*\* обозначает в сравнении с носителем,  $P < 0.001$ ; \* обозначает в сравнении с носителем,  $P < 0.05$ .

ФИГ. 4A-4D: на Фиг. 4A представлены статистические результаты болевого поведения у мышей на 15-е сутки применения биспецифического антитела 1; на ФИГ. 4B представлены статистические результаты болевого поведения у мышей на 21-е сутки применения биспецифического антитела 1; на ФИГ. 4C представлена шкала повреждения костей у мышей на 15-е сутки применения биспецифического антитела 1; на ФИГ. 4D

представлена шкала повреждения костей у мышей на 21-е сутки применения биспецифического антитела 1; где в равнении с носителем \*\*\*\* обозначает в сравнении с носителем,  $P < 0.0001$ ; \*\*\* обозначает в сравнении с носителем,  $P < 0.001$ ; \* обозначает в сравнении с носителем,  $P < 0.05$ . плацебо, носитель.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

### Терминология

Терминология, используемая в настоящем документе, предназначена исключительно для описания вариантов осуществления и не является ограничивающей. Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в той области техники, к которой относится настоящее раскрытие.

В том виде, в каком они используются в описании и формуле изобретения, формы единственного числа («a», «an» и «the») включают множественное число, если контекст явным образом не диктует иное.

Если не указано иное, во всем описании и формуле изобретения слова «содержать», «иметь», «включать» и т.п. должны толковаться в инклюзивном смысле, а не в исключительном или исчерпывающем смысле; то есть в смысле «включая, но не ограничиваясь». Если не указано иное, слово «содержать» включает в себя «состоять из».

Трехбуквенные и однобуквенные коды, используемые в настоящем раскрытии для аминокислот, описаны в *J. biol. chem*, 243, p3558 (1968).

Термин «и/или», например, «X и/или Y», следует понимать как «X и Y» или «X или Y» и должен использоваться для обеспечения явного выраженного подтверждения обоих значений или любого из значений.

Термин «антигенсвязывающая молекула» используется в самом широком смысле и охватывает множество молекул, которые специфически связываются с антигеном или его эпитопом, включая, среди прочего, антитела, другие полипептиды, обладающие антигенсвязывающей активностью, и слитые белки антител, в которых слиты два антитела. В качестве иллюстрации, антигенсвязывающие молекулы в данном документе представляют собой биспецифические антигенсвязывающие молекулы (например, биспецифические антитела), которые могут содержать две идентичные (или разные) первые цепи и две идентичные (или разные) вторые цепи; или первую цепь, вторую цепь, третью цепь и четвертую цепь, которые отличаются друг от друга. В качестве иллюстрации, цепи представляют собой полипептидные цепи. В качестве иллюстрации первая полипептидная цепь или третья полипептидная цепь могут представлять собой тяжелую цепь антитела или полипептид, содержащий Fc-область, а вторая полипептидная цепь или четвертая полипептидная цепь могут представлять собой легкую

цепь антитела или легкую цепь сконструированного антитела. Термин «биспецифическая антигенсвязывающая молекула» относится к антигенсвязывающей молекуле, способной специфически связываться с двумя разными антигенами или по меньшей мере с двумя разными эпитопами одного и того же антигена.

Термин «антагонист RANK» относится к агенту, который представляет собой связующее RANKL, которое статистически значимо нейтрализует RANKL и/или снижает или ингибирует связывание RANKL с его рецептором RANK, тем самым противодействуя взаимодействию RANK-RANKL и нисходящей передаче сигналов.

Антагонистическая функция антагониста RANK, в частности, характеризуется уменьшением, ингибированием или предотвращением ответа на рецептор (RANK), активируемый агонистом (RANKL). Антагонисты, в частности конкурентные антагонисты, могут обратимо связываться с RANKL на одном и том же сайте связывания или, как эндогенный рецептор, препятствовать сайту связывания (активный сайт) без необходимости активации рецептора.

Агент может представлять собой любое подходящее связующее или лиганд, например, выбранные из группы, состоящей из малых органических или неорганических молекул, углеводов, биологических макромолекул, пептидов, белков (именуемых также полипептидами в настоящем документе), аналогов пептидов, пептидомиметиков, антител (включая антигенсвязывающие фрагменты антител), нуклеиновые кислоты, аналоги нуклеиновых кислот и комбинации любого из вышеперечисленного. В некоторых вариантах осуществления антагонист RANKL представляет собой иммунотерапевтический агент. Конкретный пример агента выбран из группы, состоящей из антитела, рецептора или остеопротегерина (который является неактивным или становится неактивным во избежание связывания агониста RANKL с его рецептором RANK), рецептор-слитого белка, например, слитый белок RANK-Fc, пептид, аптамер или малую молекулу. Типичные антагонисты RANKL включают деносумаб, рекомбинантный RANK-Fc (Schmiedel et al. 2013, Cancer Res. 73(2):683-94), RANKL-нанотела (WO2008142164A2) или RANKL-связывающие пептиды (WO2012163887A1).

Под «статистически значимо снижает или ингибирует» взаимодействие RANK-RANKL и нисходящую передачу сигналов подразумевается, что антагонист проявляет любое действие из группы, состоящей из следующего, или их комбинации:

(i) антагонист ингибирует связывание RANKL с RANK более чем на 50%, предпочтительно более чем на 60%, 70%, 80%, 90% или 95%, или полностью ингибирует такое связывание;

(ii) антагонист функционально ингибирует пути, индуцируемые RANKL, в частности, передачу сигналов после стимуляции RANK, например, активность MAPK (митоген-активируемой протеинкиназы) или SRC киназ, или N-кВ сигналы, участвующие в образовании метастазов; или



(iii) на определенных значимых уровнях (например, без ограничений,  $p$  установлен равным 0,5, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005, 0,0001, 0,0005, 0,0001 или даже ниже), существует значительная разница в уровне взаимодействия RANK-RANKL (или уровень активности члена его нижестоящего сигнального пути) между группой, в которой присутствует антагонист, и группой, в которой антагонист отсутствует.

Такое функциональное ингибирование представляет собой, например, ингибирование образования метастазов до уровня, превышающего примерно 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%, или полное ингибирование.

Термин «деносумаб» включает биологические аналоги деносумаба. В настоящем документе термин «биологический аналог» (одобренного эталонного продукта/биологического лекарственного средства, такого как белковый терапевтический агент или антитело) относится к биологическому продукту, который схож с эталонным продуктом на основании данных, полученных в результате: (a) аналитических исследований, которые показывают, что биологический продукт очень похож на эталонный продукт, но имеются незначительные различия по клинически неактивным компонентам; (b) исследований на животных (включая оценку токсичности); и/или (c) одного или нескольких клинических исследований (включая оценку иммуногенности и фармакокинетики или фармакодинамики), достаточных для демонстрации безопасности, чистоты и эффективности в одном или нескольких подходящих условиях применения, для которых эталонный продукт лицензирован и предназначен для применения и для которых запрашивается лицензия на биологический продукт.

«Антитело к RANKL» относится к антителу, которое способно связываться с RANKL или его эпитопом и ингибировать биологическую активность RANKL и/или ингибировать нисходящие сигнальные пути RANKL.

Термин «NGF» или фактор роста нервов относится к фактору роста нервов и его вариантам, которые сохраняют по меньшей мере часть биологической активности NGF. В настоящем документе NGF включает в себя NGF с последовательностью дикого типа или его встречающиеся в природе варианты всех видов млекопитающих, включая человека, собаку, кошачьих, лошадей или крупный рогатый скот.

«Рецептор NGF» относится к полипептиду, который связывается с NGF или активируется NGF. Рецепторы NGF включают рецептор TrkA и рецептор p75 любых видов млекопитающих, включая, среди прочего, человека, собаку, кошку, лошадь, примата или крупный рогатый скот.

«Антагонист NGF» относится к любому соединению, которое нейтрализует сигнальную и биологическую активность NGF. Например, антагонист NGF может ингибировать связывание NGF со своим лигандом, таким как рецептор TrkA или p75, который связывается с клеточной мембраной.

В некоторых вариантах осуществления антагонист NGF включает антитела к NGF, фрагменты антител к NGF, или NGF-связывающие белки, или NGF-связывающие полипептиды. В некоторых вариантах осуществления антагонист NGF предназначен для конкретного вида, подлежащего лечению. Например, когда вид представляет собой человека, то используется человеческий или гуманизированный антагонист NGF, такой как RN624 (танезумаб), JNJ-42160443, REGN475, PG110, альфа-D11, AMG-403 (см., например, Mantyh et al., *Anaesthesiology* 115:189-204 (2011)), антитело 911, описанное в Hongo et al., *Hybdoma*: 19:215-27 (2000), или антитело D11, описанное в Ruberti et al., *Cell. Molec. Neurobiol.* 13:559-68 (1993), или любой из тех, которые описаны в WO 2012153121, WO 2012153122, WO 2012153123 и WO 2012153126.

В некоторых вариантах осуществления антагонист NGF представляет собой NGF-связывающий белок или полипептид, например, полипептид, включающий TrkA или p75, или фрагмент TrkA или p75, который может связываться с NGF. В конкретном варианте осуществления антагонистом NGF является NGF-связывающий полипептид, включающий TrkA или p75 (или его NGF-связывающий фрагмент) и Fc иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления антагонистом NGF является слитый белок TrkA-IgG, который может связываться с NGF, например, те, которые описаны в Shelton et al., *J. Neurosci.* 15:477-91 (1995). В некоторых вариантах осуществления антагонистом NGF является слитый белок p75, который связывается с NGF, такой как p75-Fc, разработанный компанией Levicept (Кент, Англия) для лечения хронической боли. В некоторых вариантах осуществления антагонист NGF представляет собой низкомолекулярное соединение, которое может препятствовать связыванию NGF с TrkA, например, ALE0540 и PD90780, см. Hefti et al., *TRENDS in Pharmacol. Sci.* 27:85-91 (2006); или MNAC13, см. Mantyh et al., *Anaesthesiology* 115:189-204 (2011). В некоторых вариантах осуществления антагонист NGF представляет собой низкомолекулярное соединение, ингибирующее TrkA.

«Биологическая активность» NGF, как правило, относится к способности связываться с рецепторами NGF и/или активировать сигнальные пути рецепторов NGF. Биологическая активность включает, среди прочего, одно или более из следующего: способность связываться с рецептором NGF (таким как p75 и/или trkA); способность стимулировать димеризацию и/или аутофосфорилирование рецептора TrkA; способность активировать сигнальный путь рецепторов NGF; способность стимулировать дифференцировку, пролиферацию, выживание, рост клеток и другие изменения в клеточной физиологии, включая изменение морфологии нейронов (включая периферические и центральные нейроны), синаптогенеза, синаптической функции, высвобождения нейротрансмиттеров и/или нейропептидов и регенерации после повреждения; способность стимулировать выживание нейронов тройничного нерва; и способность модулировать боль, в том числе послеоперационную.

«Антитело к NGF» относятся к антителам, которые способны связываться с NGF и ингибировать биологическую активность NGF и/или нисходящих сигнальных путей, модулируемых сигнализацией NGF. Антитела к NGF включают антитела, которые блокируют, антагонизируют, подавляют или снижают биологическую активность NGF, включая нисходящие сигнальные пути, модулируемые сигнализацией NGF, такие как связывание с рецептором и/или элиситация ответа на NGF. В некоторых конкретных вариантах осуществления антитело к NGF связывается с NGF и предотвращает димеризацию NGF и/или связывание с рецепторами NGF (например, p75 и/или TrkA). В других конкретных вариантах осуществления антитело к NGF связывается с NGF и предотвращает димеризацию рецептора TrkA и/или аутофосфорилирование TrkA.

Термин «танезумаб» включает в себя биологические аналоги танезумаба.

Термин «аминокислота» относится к природным и синтетическим аминокислотам, а также к аналогам аминокислот или аминокислотам, которые функционируют по аналогии с природными аминокислотами. Природные аминокислоты представляют собой аминокислоты, кодируемые генетическими кодами, и те аминокислоты, которые позднее были подвергнуты модификации, например, гидроксипролин,  $\gamma$ -карбоксихлутаминовая кислота и O-фосфосерин. Аналоги аминокислот относятся к соединениям, которые имеют по существу одинаковую химическую структуру (т. е.  $\alpha$  углерод, который связывается с водородом, карбоксилем, аминогруппой и R-группой) с природными аминокислотами, например, гомосерин, норлейцин, сульфоксид метионина и метионинметилсульфоний. Такие аналоги имеют модифицированную R-группу (например, норлейцин) или модифицированный пептидный скелет, но сохраняют по существу одинаковую химическую структуру с природными аминокислотами. Аминокислотные имитаторы относятся к химическим соединениям, которые имеют структуру, отличную от общей химической структуры аминокислот, но функционируют по аналогии с природными аминокислотами.

Термин «аминокислотная мутация» включает в себя аминокислотные замены, делеции, вставки и модификации. Любая комбинация замен, делеций, вставок и модификаций может быть произведена для получения конечной конструкции, при условии, что конечная конструкция обладает требуемыми свойствами, такими как уменьшенное связывание с Fc-рецептором. Делеции и вставки в аминокислотных последовательностях включают делеции и вставки на аминоконце и/или карбоксильном конце полипептидной цепи. Конкретные аминокислотные мутации могут представлять собой аминокислотные замены. В одном из вариантов осуществления аминокислотная мутация представляет собой неконсервативную аминокислотную замену, т.е. замену одной аминокислоты другой аминокислотой, обладающей отличными структурными и/или химическими свойствами. Аминокислотные замены включают замену не природными аминокислотами или производными 20 нативных аминокислот (например, 4-

гидроксипролином, 3-метилгистидином, орнитинном, гомосерином и 5-гидроксилизином). Аминокислотные мутации могут быть получены с помощью генетических или химических способов, хорошо известных в данной области техники. Генетические способы могут включать сайт-направленный мутагенез, ПЦР, синтез генов и тому подобное. Предполагается, что также могут использоваться способы изменения групп боковых цепей аминокислот, отличные от геновой инженерии, такие как химическая модификация. В данном документе могут использоваться различные наименования для обозначения одной и той же аминокислотной мутации. В контексте данного документа выражение «положение + аминокислотный остаток» может быть использовано для обозначения аминокислотного остатка в конкретном положении. Например, 366W указывает на то, что аминокислотный остаток в положении 366 представляет собой W. T366W указывает на то, что аминокислотный остаток в положении 366 был подвергнут мутации из исходного T в W.

Термин «антитело» используется в самом широком смысле и охватывает различные структуры антител, включая, среди прочего, моноклональные антитела, поликлональные антитела; моноспецифические антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и полноразмерные антитела, а также фрагменты антител (или антигенсвязывающие фрагменты, или антигенсвязывающие группировки), при условии, что они демонстрируют требуемую антигенсвязывающую активность. «Нативное антитело» относится к молекуле иммуноглобулина природного происхождения. Например, нативное антитело IgG представляет собой гетеротетрамерный гликопротеин массой примерно 150 000 дальтон, состоящий из двух легких и двух тяжелых цепей, соединенных дисульфидной связью. От N-конца до C-конца каждая тяжелая цепь имеет одну переменную область (VH, также известную как переменный домен тяжелой цепи или переменная область тяжелой цепи), за которой следуют три константных домена (CH1, CH2 и CH3). Аналогичным образом, от N-конца до C-конца каждая легкая цепь имеет одну переменную область (VL, также известную как переменный домен легкой цепи или переменная область легкой цепи), за которой следует один константный домен легкой цепи (константная область легкой цепи, CL). Термины «полноразмерное антитело», «интактное антитело» и «цельное антитело» используются в настоящем документе как взаимозаменяемые и относятся к антителу, имеющему структуру, по существу схожую со структурой нативного антитела, или имеющему тяжелые цепи, содержащие Fc-область, как определено в настоящем документе.

Термин «биспецифическое антитело» относится к антителу (включая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, например, одноцепочечное антитело), способному специфически связываться с двумя разными антигенами или по меньшей мере с двумя разными эпитопами одного и того же антигена. Биспецифические антитела различной

структуры были раскрыты в предшествующем уровне техники; биспецифические антитела могут классифицироваться на IgG-подобные биспецифические антитела и биспецифические антитела типа фрагмента антитела в соответствии с целостностью молекул IgG; биспецифические антитела могут быть классифицированы на бивалентные, трехвалентные, четырехвалентные или биспецифические антитела с большей валентностью в зависимости от числа антигенсвязывающих областей; биспецифические антитела могут быть классифицированы на симметричные биспецифические антитела и асимметричные биспецифические антитела по наличию горизонтальной симметрии в их структурах. Среди них биспецифические антитела на основе фрагментов антител, таких как Fab-фрагменты, не содержащие Fc-фрагментов, образованные связыванием 2 или более Fab-фрагментов в одной молекуле, обладают низкой иммуногенностью, малой молекулярной массой и высокой проницаемостью опухолевой ткани, а типичные структуры антител этого типа включают биспецифические антитела, такие как F(ab)<sub>2</sub>, scFv-Fab и (scFv)<sub>2</sub>-Fab; IgG-подобные биспецифические антитела (например, содержащие Fc-фрагменты) имеют относительно большую молекулярную массу, при этом Fc-фрагменты облегчают последующую очистку антитела и повышают их растворимость и стабильность, а Fc-фрагменты могут в дальнейшем связываться с рецептором FcRn и увеличивать время полураспада антитела в сыворотке крови, а типичные структурные модели биспецифических антител включают биспецифические антитела, такие как KiH, CrossMAb, Триомаб квадрома, FcΔAdp, ART-Ig, BiMAb, Biclomics, BEAT, DuoBody, Azymetric, XmAb, 2:1 TCBs, 1Fab-IgG TDB, FynomAb, two-in-one/DAF, scFv-Fab-IgG, DART-Fc, LP-DART, CODV-Fab-TL, HLE-BiTE, F(ab)<sub>2</sub>-CrossMAb, IgG-(scFv)<sub>2</sub>, Bs4Ab, DVD-Ig, тетравалент-DART-Fc, (scFv)<sub>4</sub>-Fc, CODV-Ig, mAb2 и F(ab)<sub>4</sub>-CrossMAb (см. Aran F. Labrijn et al., Nature Reviews Drug Discovery, том 18, стр. 585-608 (2019); Chen S1 et al., J Immunol Res., Feb. 11, 2019; 2019:4516041).

Термин «вариабельная область» или «вариабельный домен» относится к домену тяжелой цепи или легкой цепи, который участвует во взаимодействиях антитело-антиген. Вариабельная область тяжелой цепи может быть обозначаться как VH, а вариабельная область легкой цепи - VL. Каждая из VH и VL содержит четыре консервативных каркасных области (FR) и три области, определяющие комплементарность (CDR). Термин «область, определяющая комплементарность» или «CDR» относится к области в вариабельном домене, которая в первую очередь способствует связыванию антигена; «каркас» или «FR» относится к остаткам вариабельного домена, отличным от CDR остатков. VH содержит 3 CDR-области: HCDR1, HCDR2 и HCDR3; VL содержит 3 CDR-области: LCDR1, LCDR2 и LCDR3.

Каждая из VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и

FR4. Одной VH или VL может быть достаточно для обеспечения антигенсвязывающей специфичности.

Границы аминокислотных последовательностей CDR можно определить с помощью множества хорошо известных схем, например, схемы нумерации «Kabat» (см. Kabat et al. (1991), «Sequences of Proteins of Immunological Interest», 5-е изд. ., Служба общественного здравоохранения, Национальные институты здравоохранения, Бетесда, Мэриленд), схемы нумерации «Chothia», схемы нумерации «AbM», схемы «контактной» нумерации (см. Martin, ACR. Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains[J]. 2001) и схемы нумерации ImMunoGenTics (IMGT) (Lefranc, M.P. et al., Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003); Front Immunol. 2018, 16 октября; 9:2278 ), и тому подобное. Соответствующие соотношения между различными схемами нумерации хорошо известны специалистам в данной области техники и являются типовыми, как показано в Таблице 1 ниже.

Таблица 1. Взаимосвязь между схемами нумерации CDR

| CDR   | IMGT    | Kabat  | AbM    | Chothia | Контактная |
|-------|---------|--------|--------|---------|------------|
| HCDR1 | 27-38   | 31-35  | 26-35  | 26-32   | 30-35      |
| HCDR2 | 56-65   | 50-65  | 50-58  | 52-56   | 47-58      |
| HCDR3 | 105-117 | 95-102 | 95-102 | 95-102  | 93-101     |
| LCDR1 | 27-38   | 24-34  | 24-34  | 24-34   | 30-36      |
| LCDR2 | 56-65   | 50-56  | 50-56  | 50-56   | 46-55      |
| LCDR3 | 105-117 | 89-97  | 89-97  | 89-97   | 89-96      |

Если не указано иное, схема нумерации "Kabat" применяется к последовательностям переменных областей и CDR в вариантах осуществления настоящего изобретения.

Термин «фрагмент антитела» относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая включает в себя фрагмент интактного антитела, который связывается с антигеном, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антител включают, среди прочего, Fv, Fab', Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>, однодоменные антитела, одноцепочечные Fab (scFab), диатела, линейные антитела, одноцепочечные антитела (например, scFv) и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Термин «Fc-область» или «кристаллизующийся фрагмент иммуноглобулина» используется для определения C-концевой области тяжелой цепи антитела, включая нативные Fc-области и сконструированные Fc-области. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит две субъединицы, которые могут быть одинаковыми или разными. В некоторых вариантах осуществления Fc-область тяжелой цепи IgG

человека определяется как простирающаяся от аминокислотного остатка в положении Cys226 или от Pro230 до ее карбоксильного конца. Подходящие участки нативной последовательности Fc для описанных в данном документе антител включают человеческие IgG1, IgG2 (IgG2A, IgG2B), IgG3 и IgG4. Если не указано иное, схемой нумерации для Fc-области является EU индекс.

Термин «аффинность» относится к общей силе нековалентного взаимодействия между одним сайтом связывания молекулы (например, антитела) и ее связывающим лигандом (например, антигеном). Если не указано иное, используемый в данном документе термин «аффинность связывания» относится к внутренней аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами пары связывания (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X к ее лиганду Y обычно можно, как правило, обозначать константой диссоциации (KD). Аффинность можно определить общепринятыми способами, известными в данной области техники, включая описанные в данном документе. Термин «kassoc» или «ka» относится к скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген, тогда как термин «kdis» или «kd», используемый в настоящем документе, относится к скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Используемый в данном документе термин «KD» относится к константе диссоциации, которую получают из отношения kd к ka (т.е. kd/ka) и выражают в виде молярной концентрации (M). Значения KD антител можно определить способами, известными в данной области техники, например, способы определения KD антител включают измерение поверхностного плазмонного резонанса с использованием биосенсорной системы, такой как система, или измерение аффинности в растворе путем титрования при равновесии в растворе (SET).

Термин «моноклональное антитело» относится к популяции по существу однородных антител, то есть, аминокислотные последовательности молекул антител, входящих в популяцию, идентичны, за исключением небольшого числа естественных мутаций, которые могут существовать. Напротив, препараты поликлональных антител обычно содержат множество различных антител с различными аминокислотными последовательностями в своих переменных доменах, которые, как правило, специфичны в отношении разных эпитопов. «Моноклональный» относится к характеристикам антитела, полученного из популяции по существу однородных антител, и не должен толковаться как требующий получения антитела каким-либо конкретным способом. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное настоящим изобретением, является моноклональным антителом.

Термин «антиген» относится к молекуле, которая способна селективно связываться с антигенсвязывающим белком (например, антителом). Антиген может иметь один или несколько эпитопов, способных взаимодействовать с различными антигенсвязывающими белками (например, антителами).

Термин «эпитоп» относится к области или участку антигена, который способен специфически связываться с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. Эпитопы могут образовываться из смежных цепочек аминокислот (линейный эпитоп) или состоять из несмежных аминокислот (конформационный эпитоп), например, сближаясь в пространстве вследствие фолдинга антигена (т.е. третичного фолдинга белкового антигена). Разница между конформационным эпитопом и линейным эпитопом заключается в том, что в присутствии денатурирующих растворителей теряется связывание антитела с конформационным эпитопом. Эпитоп содержит по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Скрининг антител, которые связываются с определенными эпитопами (т.е. тех, которые связываются с идентичными эпитопами), может быть выполнен с использованием стандартных способов в данной области техники, таких как, помимо прочего, сканирование аланина, пептидный блоттинг (см. *Meth. Mol. Biol.* 248 (2004) 443-463), анализ расщепления пептидов, вырезание эпитопов, экстракция эпитопов, химическая модификация антигена (см. *Prot. Sci.* 9 (2000) 487-496) и перекрестное блокирование (см. "Antibodies", Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY)).

«Антитело, которое конкурирует за связывание» с эталонным антителом, относится к антителу, которое блокирует связывание эталонного антитела с антигеном на 50% или более, или антителу, связывание которого с антигеном блокируется эталонным антителом на 50% или более в конкурентном анализе.

Термин «способный специфически связываться», «специфически связывающий» или «связывающий» означает, что антигенсвязывающая молекула способна связываться с определенным антигеном или его эпитопом с более высокой аффинностью, чем с другими антигенами или эпитопами. Как правило, антитело связывается с антигеном или его эпитопом с равновесной константой диссоциации (KD), составляющей примерно  $1 \times 10^{-7}$  М или менее (например, примерно  $1 \times 10^{-8}$  М или менее). В некоторых вариантах осуществления KD связывания антитела с антигеном составляет 10% или менее (например, 1%) от KD связывания антитела с неспецифическим антигеном (например, BSA или казеином). KD может быть определена известными способами, например, методом поверхностно-плазмонного резонанса BIACORE®. Однако антитело, которое специфически связывается с антигеном или его эпитопом, может иметь перекрестную реактивность с другими родственными антигенами, например, с соответствующими антигенами других видов (гомологичными), такими как человек или обезьяны, например, *Macaca fascicularis* (яванский макак, суно), *Pan troglodytes* (шимпанзе, chimp) или *Callithrix jacchus* (обыкновенная мартышка, мартышка).

Термин «антитело к RANKL» или «антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с RANKL» относится к антителу или домену, способному



связываться с RANKL или его эпитопом с такой достаточной аффинностью, чтобы антитело к RANKL или антитело, содержащее домен, могло использоваться в качестве диагностического и/или терапевтического агента, нацеленного на RANKL. В некоторых вариантах осуществления антитело или домен, который связывается с RANKL, имеет константу диссоциации (KD) < примерно 1 мкМ, < примерно 100 нМ или < примерно 10 нМ, как определено посредством FACS. В некоторых вариантах осуществления антитело к RANKL или антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с RANKL, связывается с консервативным RANKL-эпитопом RANKL от разных видов.

Термин «антитело к NGF» или «антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с NGF» относится к антителу, способному связываться с NGF с такой достаточной аффинностью, чтобы антитело, содержащее домен, могло быть использовано в качестве диагностического и/или терапевтического агента, нацеленного на NGF. В некоторых вариантах осуществления антитело к NGF связывается с консервативным эпитопом NGF от разных видов.

Термин «линкер» относится к линкерному звену, которое связывает два полипептидных фрагмента. При этом линкеры, присутствующие в одной и той же молекуле, могут быть одинаковыми или разными. Линкеры могут представлять собой пептидные линкеры, содержащие одну или несколько аминокислот, как правило, примерно 1-30, 2-24 или 3-15 аминокислот. Когда в структурной формуле появляется «-», это означает, что звенья с обеих сторон напрямую связаны ковалентной связью. Когда в структурной единице появляется термин «связь», это означает, что в единице нет аминокислот и единицы по обе стороны блока напрямую связаны.

Термин «антителозависимая клеточная цитотоксичность», «антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность» или «ADCC» представляет собой механизм индуцирования клеточной гибели, который зависит от взаимодействия покрытых антителами клеток-мишеней с эффекторными клетками, обладающими литической активностью, такими как естественные клетки-киллеры (NK), моноциты, макрофаги и нейтрофилы, через Fc $\gamma$  рецептор (Fc $\gamma$ R), экспрессируемый на эффекторных клетках. Например, NK-клетки экспрессируют Fc $\gamma$ RIIIa, в то время как моноциты экспрессируют Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII и Fc $\gamma$ RIIIa. Активность ADCC антигенсвязывающих молекул, предложенных в настоящем документе, может быть оценена с помощью *in vitro* анализов, с использованием клеток, экспрессирующих антиген, в качестве клеток-мишеней и NK-клеток в качестве эффекторных клеток. Лизис клеток выявляют по высвобождению метки (например, радиоактивного субстрата, флуоресцентного красителя или естественного внутриклеточного белка) из лизированных клеток.

Термин «нуклеиновая кислота» используется в контексте данного документа как синоним термина «полинуклеотид» и относится к дезоксирибонуклеотиду или рибонуклеотиду и их полимеру в одноцепочечной или двухцепочечной форме. Этот

термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги нуклеотидов или модифицированные остатки основной цепи или связи, которые являются синтетическими, природными и не встречающимися в природе, обладают свойствами связывания, схожими с эталонной нуклеиновой кислотой и метаболизируются по аналогии с эталонным нуклеотидом. Примеры таких аналогов включают, помимо прочего, фосфоротиоат, фосфорамидат, метилфосфонат, хираль-метилфосфонат, 2-О-метилрибонуклеотид и пептид-нуклеиновая кислота (ПНК).

«Выделенная» нуклеиновая кислота относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая была отделена от компонентов своей естественной среды. Выделенная нуклеиновая кислота включает в себя молекулу нуклеиновой кислоты, содержащуюся в клетке, которая, как правило, содержит молекулу нуклеиновой кислоты, но данная молекула нуклеиновой кислоты присутствует вне хромосом или в хромосомном положении, отличном от ее природного хромосомного положения. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело к RANKL или антигенсвязывающую молекулу, относится к одной или нескольким молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим тяжелые и легкие цепи антител (или их фрагментов), включая такие молекулы нуклеиновых кислот в одном векторе или отдельных векторах, а также такие молекулы нуклеиновых кислот, присутствующие в одном или нескольких местах в клетке-хозяине. Если не указано иное, то подразумевается, что конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также включает в себя ее консервативно модифицированные варианты (например, замены вырожденных кодонов) и комплементарные последовательности, а также явно указанную последовательность. В частности, как подробно описано ниже, замены вырожденных кодонов могут быть получены путем генерации последовательностей, в которых третья позиция одного или нескольких выбранных (или всех) кодонов заменяется вырожденными основаниями и/или остатками дезоксиинозина.

Термины «полипептид» и «белок» используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к полимеру из аминокислотных остатков. Данные термины применяются к аминокислотным полимерам, в которых один или несколько аминокислотных остатков представляют собой синтезированные химические имитаторы соответствующих аминокислот природного происхождения, а также к природным аминокислотным полимерам и неприродным аминокислотным полимерам. Если не указано иное, то подразумевается, что конкретная полипептидная последовательность также включает в себя ее консервативно модифицированные варианты.

Термин «идентичность» последовательности относится к степени (процентной доле), в которой аминокислоты/нуклеиновые кислоты двух последовательностей идентичны в эквивалентных положениях, когда две последовательности оптимально выровнены, при этом в процессе оптимального выравнивания вносятся гэпы,

необходимые для достижения максимального процента идентичности последовательностей, при этом любая консервативная замена не рассматривается как часть идентичности последовательностей. Для определения процентной доли идентичности последовательностей выравнивание может быть выполнено с помощью методик, известных специалистам в данной области техники, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определить параметры, подходящие для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине выравниваемых последовательностей.

Термин «слияние» или «связывание» означает, что компоненты (например, антигенсвязывающий домен и Fc-домен) связаны ковалентной связью либо напрямую, либо через один или несколько линкеров. Когда линкер является пептидным линкером, ковалентная связь является пептидной связью или амидной связью.

Термин «вектор» означает молекулу полинуклеотида, способную доставлять связанный с ней другой полинуклеотид. Одним из типов векторов является «плаزمид», которая относится к кольцевой двухцепочечной петле ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, такой как аденоассоциированный вирусный вектор (AAV или AAV2), в котором дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Определенные векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую их вводят (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную точку начала репликации, и эписомальные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомальные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина и, таким образом, реплицируются вместе с геномом хозяина.

Термин «экспрессионный вектор» или «экспрессионная конструкция» относится к вектору, который применяется для трансформации клетки-хозяина и содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая направляет и/или контролирует экспрессию одной или нескольких гетерологичных кодирующих областей, функционально связанных с ним. Экспрессионные конструкции могут включать, помимо прочего, последовательности, которые влияют или контролируют транскрипцию и трансляцию, а также влияют на сплайсинг РНК кодирующей области, функционально связанной с ней, в присутствии интрона.

Термины «клетка-хозяин», «клеточная линия-хозяин» и «культура клетки-хозяина» используются взаимозаменяемо и относятся к клеткам, в которые были введены экзогенные нуклеиновые кислоты, включая потомство таких клеток. Клетки-хозяева включают в себя «трансформеры» и «трансформированные клетки», которые включают первичные трансформированные клетки и потомство, полученное от них, независимо от

количества пассажиров. Потомство может отличаться от родительских клеток по содержанию нуклеиновых кислот и может содержать мутации. Мутантное потомство, обладающее той же функцией или биологической активностью, что и клетки, подвергнутые скринингу или отобранные из группы, состоящей из исходно трансформированных клеток, включены в данный документ. Клетки-хозяева включают прокариотические и эукариотические клетки-хозяева, причем эукариотические клетки-хозяева включают, помимо прочего, клетки млекопитающих, насекомых, клетки растений и клетки грибов. Типичными клетками-хозяевами являются: клетки яичника китайского хомяка (CHO), NSO, SP2-клетки, клетки HeLa, клетки почек детеныша хомяка (BHK), клетки почек обезьяны (COS), клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (например, HepG2), клетки A549, клетки 3T3 и клетки HEK-293, *Pichiapastoris*, *Pichia finlandica*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* and *Trichoderma reesei*. В настоящей заявке термины "клетка", "клеточная линия" и "клеточная культура" используются как взаимозаменяемые, и все такие обозначения включают в себя потомство. Таким образом, слова «трансформант» и «трансформированная клетка» включают первичную клетку-субъект и культуры, полученные из нее, независимо от количества пассажиров. Также понятно, что не все потомство имеет точно идентичное содержание ДНК из-за преднамеренных или непреднамеренных мутаций. Включено вариантное потомство, которое обладает той же самой функцией или биологической активностью, что и исходная трансформированная клетка.

«Возможный» или «возможно» означает, что событие или обстоятельство, описанное впоследствии, может, но не обязательно, произойти, и что описание включает случаи, когда событие или обстоятельство происходит или не происходит.

Термин «фармацевтическая композиция» относится к смеси, содержащей одно или несколько антител или антигенсвязывающих молекул, описанных в настоящем документе, и другие химические компоненты, например, физиологически/фармацевтически приемлемые носители и вспомогательные вещества.

Термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к ингредиенту фармацевтической композиции, который отличается от активного ингредиента и не токсичен для субъекта. Фармацевтически приемлемые носители включают, помимо прочего, буферы, вспомогательные вещества, стабилизаторы или консерванты.

Термин «субъект» или «индивидуум» включает в себя как людей, так и животных. К животным относятся все позвоночные (например, млекопитающие и немлекопитающие), такие как приматы (например, яванские макаки), овцы, собаки, коровы, куры, земноводные и рептилии. Если не указано иное, термины «пациент» и «субъект» используются в настоящем документе как взаимозаменяемые. Используемый в данном документе термин «яванский макак (супо)» или «*супомолгус*» относится к *Macaca*

*fascicularis*. В некоторых вариантах осуществления индивидуум или субъект является человеком.

Термин «введение» или «осуществление введения» применительно к животным, людям, подопытным объектам, клеткам, тканям, органам или биологическим жидкостям относится к контакту экзогенного лекарственного средства, терапевтического агента, диагностического агента или композиции с животными, людьми, субъектами, клетками, тканями, органами или биологическими жидкостями.

Термин «образец» относится к совокупности схожих жидкостей, клеток или тканей, выделенных у субъекта, а также жидкостей, клеток или тканей, присутствующих в организме субъекта. Типичными образцами являются биологические жидкости, такие как кровь; сыворотка; серозные жидкости; плазма; лимфа; моча; слюна; кистозные жидкости; слезы; выделения; мокрота; слизистые выделения секреторных тканей и органов; вагинальные выделения; асцит; жидкости в полостях тела (таких как плевра, перикард, брюшина и брюшная полость); жидкости, собранные из бронхиального лаважа; синовиальные жидкости; жидкие растворы, контактирующие с субъектом или биологическим источником, например, среды для культивирования клеток и органов (включая среды, кондиционированные клетками или органами); лаважные жидкости; и т.п., образцы биопсии тканей, пункции тонкой иглой, ткани, иссеченные хирургическим путем, культуры органов или культуры клеток.

«Лечение» или «лечить» (и их грамматические вариации) относится к клиническому вмешательству в попытке изменить естественное течение пациента, получающего лечение, которое может быть выполнено либо в целях профилактики, либо в процессе клинической патологии. Желательные эффекты лечения включают, среди прочего, предупреждение возникновения или рецидива заболевания, облегчением симптомов, облегчение/уменьшение любых прямых или непрямых патологических последствий заболевания, предупреждение метастазирования, снижение скорости прогрессирования заболевания, улучшение или облегчение болезненного состояния, а также регрессию или улучшение прогноза. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула, используемая в настоящем раскрытии, используется для задержки развития или замедления прогрессирования заболевания.

«Эффективное количество», как правило, представляет собой количество, достаточное для уменьшения тяжести и/или частоты симптомов, устранения симптомов и/или первопричин, предупреждения появления симптомов и/или их первопричин и/или облегчения или улучшения вреда, вызванного или связанного с болезненным состоянием. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество является терапевтически эффективным или профилактически эффективным. «Терапевтически эффективное количество» - это количество, достаточное для лечения стадии заболевания или болезненного состояния, в частности, стадии заболевания или

болезненного состояния, связанного с болезненным состоянием, или для иного предотвращения, препятствования, задержки или регрессии болезненного состояния или любых других нежелательных симптомов, связанных с заболеванием каким-либо образом. «Профилактически эффективное количество» - это количество, которое при введении субъекту будет иметь заранее определенный профилактический эффект, например, предотвращение или задержка наступления (или рецидива) болезненного состояния или снижение вероятности возникновения (или рецидива) болезненного состояния или связанных с ним симптомов. Терапевтический или профилактический эффект не обязательно наступает после введения одной дозы и может возникнуть после введения серии доз. Таким образом, терапевтически или профилактически эффективное количество может быть введено в одной или нескольких дозах. «Терапевтически эффективное количество» и «профилактически эффективное количество» могут варьироваться в зависимости от множества факторов, таких как состояние заболевания, возраст, пол и масса тела человека, а также способность терапевтического агента или комбинации терапевтических агентов вызывать требуемую реакцию у человека. К типичным показателям эффективного терапевтического агента или комбинации терапевтических агентов относятся, например, улучшение состояния здоровья пациента.

В контексте настоящего документа термин «боль» относится к боли любой этиологии, включая острую и хроническую боль, а также любую боль с воспалительным компонентом. Примеры боли включают, помимо прочего, боль после хирургического вмешательства, послеоперационную боль (включая зубную боль), мигрень, головную боль и невралгию тройничного нерва, боль, ассоциированную с ожогом, раной или камнем в почках, боль, ассоциированную с травмой (включая травму головы), нейропатическую боль, боль, ассоциированную с расстройствами опорно-двигательного аппарата, такими как ревматоидный артрит, остеоартрит, анкилозирующий спондилит, серонегативные (неревматоидные) артропатии, внесуставной ревматизм и периартикулярные расстройства, и боль, ассоциированную с раком (включая «прорывную боль» и боль, ассоциированную с терминальным раком), периферической нейропатией и постгерпетической невралгией. Примеры боли с воспалительным компонентом (помимо описанных выше) включают ревматическую боль и боль, ассоциированную с мукозитом.

«Послеоперационная боль» (также называемая «постинцизионной» или «посттравматической болью») относится к боли, возникающей в результате травмы, такой как порез, прокол, разрез, разрыв или рана в отдельных тканях (включая боль, возникающую в результате всех хирургических процедур, инвазивных или неинвазивных). В настоящем документе термин «боль после хирургического вмешательства» не включает в себя боль, которая возникает (появляется или наступает) без внешней физической травмы. В некоторых конкретных вариантах осуществления послеоперационная боль является внутренней или внешней (включая периферическую) болью, и рана, порез,

травма, разрыв или разрез могут возникнуть случайно (при травме) или преднамеренно (при хирургическом разрезе). В настоящем документе термин «боль» включает в себя ноцицепцию и ощущение боли, при этом боль может быть оценена объективно и субъективно с помощью шкалы боли и методов, известных в данной области техники. Послеоперационная боль в контексте данного документа включает аллодинию (т.е. повышенную чувствительность на в норме неболевой раздражитель) и гипералгезию (т.е. повышенную чувствительность на обычно вредный или неприятный раздражитель), которые, в свою очередь, могут быть термическими или механическими (тактильными) по своей природе. В некоторых конкретных вариантах осуществления боль характеризуется тепловой чувствительностью, механической чувствительностью и/или болью в состоянии покоя. В некоторых конкретных вариантах осуществления послеоперационная боль включает в себя механически индуцированную боль или боль в состоянии покоя. В других конкретных вариантах осуществления послеоперационная боль включает в себя боль в состоянии покоя. Боль бывает первичной или вторичной, как известно в данной области техники.

#### **Антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению**

В настоящем изобретении предложены антигенсвязывающие молекулы, обладающие рядом преимуществ, таких как аффинность, специфичность к RANKL клеточной поверхности, терапевтическая активность, безопасность, фармакокинетические свойства и лекарственная способность (например, выход, чистота и стабильность).

#### **Примеры антигенсвязывающих молекул**

В одном из аспектов настоящего раскрытия предложена антигенсвязывающая молекула, содержащая по меньшей мере один первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с RANKL, и по меньшей мере один второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с NGF. В частности, антигенсвязывающая молекула, предложенная в настоящем изобретении, имеет:

i) первый антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с RANKL, который связывается с RANKL со значением KD менее 5 нМ, менее 4 нМ, менее 3 нМ или менее 2 нМ; и

второй антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с NGF, который связывается с NGF со значением KD более 10 нМ;

ii) первый антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с RANKL, который связывается с RANKL человека с EC<sub>50</sub> менее 0,13 нМ, и

второй антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с NGF, который связывается с NGF человека с EC<sub>50</sub> более 3 нМ; или

iii) первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с RANKL, блокирует связывание RANKL с RANK с IC<sub>50</sub> менее 0,5 нМ; и

второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с NGF, блокирует связывание NGF с TrKA с IC50 более 4 нМ.

В настоящем изобретении предложены двухвалентная антигенсвязывающая молекула, которая специфически связывается с RANKL, и двухвалентная антигенсвязывающая молекула, которая специфически связывается с NGF, которые имеют структуру DVD-IgG.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула содержит первую цепь со структурой, имеющей формулу (I) и вторую цепь со структурой, имеющей формулу (II),

(I) [RANKL-VH]-линкер 1-[NGF-VH]-CH1-одна субъединица Fc;

(II) [RANKL-VL]-линкер 2-[NGF-VL]-CL; где линкеры 1 и 2 являются пептидными линкерами, одинаковыми или разными по последовательности.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула содержит первую цепь со структурой, имеющей формулу (I) и вторую цепь со структурой, имеющей формулу (II),

(I) [NGF-VH]-линкер 1-[RANKL-VH]-CH1-одна субъединица Fc;

(II) [NGF-VL]-линкер 2-[RANKL-VL]-CL, где линкер 1 и линкер 2 являются пептидными линкерами, одинаковыми или разными по последовательности.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула содержит первую цепь со структурой, имеющей формулу (I) и вторую цепь со структурой, имеющей формулу (II),

(I) VHa-линкер 1-VHb-CH1 - одна субъединица Fc;

(II) VLа-линкер 2-VLb-CL;

где линкеры 1 и 2 являются пептидными линкерами, одинаковыми или разными по последовательности, и

VHa содержит последовательность SEQ ID NO: 36, 37 или 38, а VLа содержит последовательность SEQ ID NO: 40; и

VHb содержит последовательность SEQ ID NO: 64, а VLb содержит последовательность SEQ ID NO: 65.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула содержит: первую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 98, 100 или 101; и вторую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 99.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула содержит две первые цепи, одинаковые по последовательности, и две вторые цепи, одинаковые по последовательности.

#### **Варианты антигенсвязывающих молекул или антител к RANKL**

В некоторых вариантах осуществления включены варианты аминокислотных последовательностей антигенсвязывающих молекул, предложенных в настоящем



документе. Например, потребоваться улучшить аффинность связывания и/или другие биологические свойства антитела. Варианты аминокислотной последовательности антитела могут быть получены путем введения соответствующих модификаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, или путем пептидного синтеза. Такие модификации включают, например, делеции и/или вставки и/или замены остатков в аминокислотной последовательности антигенсвязывающей молекулы. Может быть использована любая комбинация делеции, вставки и замены для получения окончательной конструкции, при условии, что конечная конструкция обладает требуемыми характеристиками, например, связыванием с антигеном.

#### **Варианты, включающие замены, вставки и делеции**

В некоторых вариантах осуществления предложены варианты антигенсвязывающих молекул, имеющие одну или несколько аминокислотных замен. Целевые сайты включают CDR и FR. Консервативные замены показаны в таблице 2 под заголовком «предпочтительная замена». Более существенные изменения представлены в Таблице 2 под заголовком «типичная замена», и дополнительно описаны ниже со ссылкой на классы боковых цепей аминокислот. Аминокислотные замены могут быть введены в целевое антитело, и продукты подвергаются скринингу на требуемую активность, например, сохраненное/улучшенное связывание с антигеном, снижение иммуногенности или улучшенная ADCC или CDC.

Таблица 2. Аминокислотные замены

| Исходный остаток | Типичная замена                    | Предпочтительная замена |
|------------------|------------------------------------|-------------------------|
| Ala (A)          | Val; Leu; Ile                      | Val                     |
| Arg (R)          | Lys; Gln; Asn                      | Lys                     |
| Asn (N)          | Gln; His; Asp; Lys; Arg            | Gln                     |
| Asp (D)          | Glu; Asn                           | Glu                     |
| Cys (C)          | Ser; Ala                           | Ser                     |
| Gln (Q)          | Asn; Glu                           | Asn                     |
| Glu (E)          | Asp; Gln                           | Asp                     |
| Gly (G)          | Ala                                | Ala                     |
| His (H)          | Asn; Gln; Lys; Arg                 | Arg                     |
| Ile (I)          | Leu; Val; Met; Ala; Phe; норлейцин | Leu                     |
| Leu (L)          | Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe | Ile                     |
| Lys (K)          | Arg; Gln; Asn                      | Arg                     |
| Met (M)          | Leu; Phe; Ile                      | Leu                     |

|         |                                    |     |
|---------|------------------------------------|-----|
| Phe (F) | Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr       | Tyr |
| Pro (P) | Ala                                | Ala |
| Ser (S) | Thr                                | Thr |
| Thr (T) | Ser                                | Ser |
| Trp (W) | Tyr; Phe                           | Tyr |
| Tyr (Y) | Trp; Phe; Thr; Ser                 | Phe |
| Val (V) | Ile; Leu; Met; Phe; Ala; норлейцин | Leu |

По общим свойствам боковых цепей аминокислоты могут быть сгруппированы следующим образом:

- (1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) нейтральные, гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) кислые: Asp, Glu;
- (4) основные: His, Lys, Arg;
- (5) остатки, влияющие на ориентацию цепи: Gly, Pro;
- (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

Неконсервативные замены включают замену члена одного из этих классов членом другого класса.

Один из типов варианта замены включает замену одного или нескольких остатков CDR исходного антитела (например, гуманизированного или человеческого антитела). Как правило, полученный вариант, выбранный для дальнейшего изучения, будет иметь изменения (например, улучшения) в определенных биологических свойствах (например, повышенная аффинность, снижение иммуногенности) по сравнению с исходным антителом и/или будет по существу сохранять определенные биологические свойства исходного антитела. Типичным вариантом с заменой является антитело с созревшей аффинностью, которое можно удобно получать, например, с использованием методик созревания аффинности на основе фагового дисплея, таких как описанные в настоящем документе. Вкратце, один или несколько CDR остатков подвергаются мутации, а варианты антител экспонируются на фагах и подвергаются скринингу на конкретную биологическую активность (например, аффинность связывания). Изменения (например, замены) могут быть внесены в CDR, например, для улучшения аффинности антител. Такие изменения могут быть сделаны в «горячих точках» CDR, т.е. остатках, кодируемых кодонами, которые претерпевают мутации с высокой частотой в процессе соматического созревания, и/или остатках, контактирующих с антигеном, и при этом полученный вариант VH или VL тестируют на аффинность связывания. В некоторых вариантах осуществления аффинного созревания разнообразие вносится в переменные гены, отобранные для

созревания, любым из множества методов (например, ПЦР сниженной точности, перетасовка цепей или олигонуклеотид-направленный мутагенез). После этого создается дополнительная библиотека. Затем данная библиотека подвергается скринингу для выявления любых вариантов антител с требуемой аффинностью. Другой способ введения разнообразия включает в себя способы, направленные на CDR, в которых несколько остатков CDR (например, 4-6 остатков за раз) рандомизируют. Остатки CDR, участвующие в связывании антигенов, могут быть идентифицированы, например, с помощью аланин-сканирующего мутагенеза или моделирования. В частности, HCDR3 и LCDR3 часто становятся мишенью.

В некоторых вариантах осуществления замены, вставки или делеции могут происходить в пределах одного или нескольких CDR до тех пор, пока такие изменения не приведут к существенному снижению способности антитела связываться с антигеном. Например, в CDR могут быть внесены консервативные изменения (например, консервативные замены, как предложено в настоящем документе), которые существенно не снижают аффинность связывания. Такие изменения могут происходить, например, за пределами остатков, контактирующих с антигеном, в CDR. В некоторых вариантах осуществления вариантных последовательностей VH и VL, приведенных выше, каждый CDR не подвергается изменениям или содержит не более 1, 2 или 3 аминокислотных замен.

Полезный способ идентификации остатков или участков антитела, которые могут использоваться в качестве мишеней мутагенеза, называется «аланин-сканирующий мутагенез». В данном способе остаток или группа остатков-мишеней (например, заряженные остатки, такие как Arg, Asp, His, Lys и Glu) идентифицируются и заменяются нейтральной или отрицательно заряженной аминокислотой (например, Ala или полиаланином), чтобы определить, влияет ли это на взаимодействие антитела с антигеном. Дополнительные замены могут быть введены в положения аминокислот, которые демонстрируют функциональную чувствительность к исходным заменам. Кроме того, может быть изучена кристаллическая структура комплекса антиген-антитело для выявления точек контакта между антителом и антигеном. Эти контактные остатки и соседние остатки могут быть мишенями или устранены в качестве кандидатов для замещения. Варианты могут быть подвергнуты скринингу для определения того, обладают ли они требуемыми свойствами. Вставки аминокислотных последовательностей включают слияния амино- и/или карбокси-концов длиной от 1 остатка до полипептидов, содержащих 100 или более остатков, а также вставки внутри последовательности одиночных или нескольких аминокислотных остатков. Примеры концевых вставок включают антитела с N-концевым метионильным остатком. Другие варианты вставок молекулы антитела включают слияние N- или C-конца антитела с ферментом или полипептидом, что увеличивает период полувыведения антитела в сыворотке крови.

### Конструирование Fc-области

В одном из аспектов Fc-область антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению содержит одну или несколько аминокислотных замен, которые снижают ее связывание с Fc-рецептором, например, ее связывание с Fc $\gamma$ -рецептором, а также снижают или устраняют эффекторные функции. Fc-область природного IgG, в частности Fc-область IgG1 или Fc-область IgG4, может вызвать нацеливание антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению на клетки, экспрессирующие Fc-рецептор, а не на клетки, экспрессирующие антиген. Сконструированная Fc-область по настоящему изобретению демонстрирует пониженную аффинность связывания с Fc-рецептором и/или пониженные эффекторные функции. В некоторых вариантах осуществления сконструированная Fc-область демонстрирует снижение аффинности связывания с Fc-рецептором более чем на 50%, 80%, 90% или 95% по сравнению с нативной Fc-областью. В некоторых вариантах осуществления Fc-рецептор представляет собой Fc $\gamma$ -рецептор. В некоторых вариантах осуществления Fc-рецептор представляет собой человеческий Fc $\gamma$ -рецептор, например, Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIIB или Fc $\gamma$ RIIIa. В некоторых вариантах осуществления сконструированная Fc-область также имеет пониженную аффинность связывания с компонентом, например, C1q, по сравнению с нативной Fc-областью. В некоторых вариантах осуществления сконструированная Fc-область не имеет сниженной аффинности связывания с неонатальным Fc-рецептором (FcRn) по сравнению с нативной Fc-областью. В некоторых вариантах осуществления сконструированная Fc-область характеризуется сниженными эффекторными функциями, которые могут включать, помимо прочего, одно или несколько из следующего: сниженная комплементзависимая цитотоксичность (CDC), сниженная антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC), сниженный антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP), сниженная секреция цитокинов, сниженный захват антигена антигенпрезентирующими клетками, опосредованный иммунным комплексом, сниженное связывание с NK-клетками, сниженное связывание с макрофагами, сниженное связывание с моноцитами, сниженное связывание с полиморфно-ядерными клетками, сниженный апоптоз, индуцируемый прямой передачей сигналов, сниженное созревание дендритных клеток и сниженное праймирование Т-клеток. Для Fc-области IgG1 замены аминокислотных остатков в таких положениях, как положения 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329, могут снижать эффекторные функции. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой Fc-область человеческого IgG1, а аминокислотные остатки в положениях 234 и 235 представляют собой А, в соответствии с нумерацией по EU индексу. В Fc-области IgG4 замены аминокислотных остатков в таких положениях, как положение 228, могут снижать эффекторные функции.

Антигенсвязывающая молекула может содержать различные антигенсвязывающие домены, слитые с двумя субъединицами Fc-области, что, таким образом, может приводить к нежелательной гомодимеризации. Поэтому для улучшения выхода и чистоты было бы выгодно вводить в Fc-область антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению модификации, которые способствуют гетеродимеризации. В некоторых вариантах осуществления область Fc по настоящему изобретению включает конструирование по методике «выступ-во-впадину» (K1H), которая включает введение выпуклой структуры (выступа) в область контакта первой субъединицы и поровой структуры (впадины) на область контакта второй субъединицы. Как таковая выпуклая структура может быть расположена в поровой структуре, тем самым способствуя образованию гетеродимеров и ингибируя образование гомодимеров. Выпуклая структура создается путем замены небольшой боковой цепи аминокислоты на области контакта первой субъединицы более крупной боковой цепью (например, тирозином или триптофаном). Поровая структура создается на области контакта второй субъединицы путем замены большой боковой цепи аминокислоты на меньшую боковую цепь аминокислоты (например, аланин или треонин). Выпуклые структуры и поровые структуры получают путем изменения нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, с необязательными заменами аминокислот, показанными в таблице ниже:

Таблица 3. комбинации K1H мутаций

|                    |       |       |       |       |                         |                |                |                |
|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------------------------|----------------|----------------|----------------|
| Первая субъединица | T366Y | T366W | T394W | F405W | T366W                   | T366Y<br>F405A | T366W<br>F405W | F405W<br>Y407A |
| Вторая субъединица | Y407T | Y407A | F405A | T394S | T366S<br>L358A<br>Y407V | T394W<br>Y407T | T394W<br>Y407A | T366W<br>T394S |

Помимо методики «выступ-во-впадину», в данной области техники также известны другие методики модификации CH3 домена тяжелой цепи мультиспецифических антител для достижения гетеродимеризации, например, WO96/27011, WO98/050431, EP1870459, WO2007/110205, WO 007/147901, WO2009/089004, WO2010/129304, WO2011/90754, WO2011/143545, WO2012/058768, WO2013/157954 и WO 013/096291.

C-конец Fc-области может представлять собой интактный C-конец, оканчивающийся аминокислотными остатками PGK, или укороченный C-конец, например, укороченный C-конец, на котором удалены один или два C-концевых аминокислотных остатка. В предпочтительном аспекте C-конец тяжелой цепи представляет собой укороченный C-конец, заканчивающийся PG. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления композиция интактных антител может содержать популяции антител, где удалены все остатки K447 и/или G446 + K447. В некоторых вариантах осуществления

композиция интактных антител может содержать популяции антител без остатка K447 и/или G446 + K447 удаленный остаток. В некоторых вариантах осуществления композиция интактных антител включает популяции антител, содержащие смесь антител с остатками K447 и/или остатками G446 + K447 и без них.

### **Рекомбинантный способ**

Антитела могут быть получены рекомбинантными способами. Для этих способов предложены одна или несколько выделенных нуклеиновых кислот, кодирующих антитела.

В случае нативного антитела, фрагмента нативного антитела или биспецифического антитела с гомодимерными тяжелыми цепями требуются две нуклеиновые кислоты, одна для легкой цепи или ее фрагмента, а другая - для тяжелой цепи или ее фрагмента. Такие нуклеиновые кислоты кодируют аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и/или аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела (например, легкую и/или тяжелую цепь (цепи) антитела). Данные нуклеиновые кислоты могут находиться на одном и том же экспрессионном векторе или на разных экспрессионных векторах.

В случае биспецифического антитела с гетеродимерными тяжелыми цепями требуются четыре нуклеиновые кислоты: одна для первой легкой цепи, одна для первой тяжелой цепи, содержащей первый гетеромономерный полипептид Fc-области, одна для второй легкой цепи и одна для второй тяжелой цепи, содержащей второй гетеромономерный полипептид Fc-области. Четыре нуклеиновые кислоты могут содержаться в одной или нескольких молекулах нуклеиновых кислот или экспрессионных векторах. Как правило, эти нуклеиновые кислоты расположены на двух или трех экспрессионных векторах, то есть один вектор может содержать более одной из указанных нуклеиновых кислот.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело согласно вышеизложенному. Каждая из таких нуклеиновых кислот может независимо кодировать любую из полипептидных цепей, описанных выше. В другом аспекте настоящего изобретения предложен один или несколько векторов (например, экспрессионных векторов), содержащих такие нуклеиновые кислоты. В другом аспекте настоящего изобретения предложена клетка-хозяин, содержащая такие нуклеиновые кислоты. В одном варианте осуществления предложен способ получения антигенсвязывающей молекулы или антитела к RANKL, причем указанный способ включает культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, предложенное выше, в условиях, подходящих для экспрессии антитела, и возможно выделение антитела из клетки-хозяина (или среды клетки-хозяина).

Для рекомбинантного получения антигенсвязывающей молекулы или антитела к RANKL нуклеиновую кислоту, кодирующую белок, выделяют и вставляют в один или несколько векторов для дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Такие нуклеиновые кислоты могут быть легко выделены и секвенированы с помощью общепринятых процедур (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, способных специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антитела), или получены рекомбинантными способами, или получены химическим синтезом.

Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии вектора, кодирующего антитело, включают прокариотические или эукариотические клетки, описанные в настоящем документе. Например, антитело может продуцироваться в бактериях, в частности, когда антителу не требуется гликозилирование и эффекторные функции Fc. После экспрессии антитело может быть выделено из бактериальной клеточной пасты в растворимой фракции и может быть дополнительно очищено.

В дополнение к прокариотам, эукариотические микроорганизмы, такие как мицелиальные грибы или дрожжи, являются подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитела, включая штаммы грибов и дрожжей, чьи пути гликозилирования «гуманизированы», так что продуцируется антитело с частично или полностью человеческим профилем гликозилирования. Подходящие клетки-хозяева для экспрессии (гликозилированных) антител также могут быть получены из многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных); примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Идентифицирован ряд штаммов бакуловируса, которые можно использовать в комбинации с клетками насекомых, в частности, для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*; культуры растительных клеток также можно использовать в качестве хозяев, см., например, US5959177, US 6040498, US6420548, US 7125978 и US6417429; В качестве хозяев также можно использовать клетки позвоночных, например, клеточные линии млекопитающих, адаптированные для роста в суспензии. Другие примеры подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих включают линию CV1 почки обезьяны, трансформированную SV40 (COS-7); клеточную линию эмбриональных почек человека (клетки 293 или 293T); клетки почки новорожденного хомяка (BHK); мышечные клетки Сертоли (клетки TM4); клетки почек обезьяны (CV1); клетки почек африканской зеленой мартышки (VERO-76); клетки рака шейки матки человека (HELA); клетки почки собаки (MDCK); клетки печени буйволиной крысы (BRL3A); клетки легких человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); опухолевые клетки молочной железы мыши (MMT 060562); TRI-клетки; клетки MRC5; и клетки FS4. Другие подходящие линии клеток-хозяев млекопитающих включают клетки яичника китайского хомячка (CHO), включая клетки DHFR-CHO; и клеточные линии миеломы, такие как Y0, NS0 и Sp2/0. Для обзора конкретных линий клеток-хозяев

млекопитающих, подходящих для продукции антитела, см., например, Yazaki, P. and Wu, A.M., *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248, Lo, B.K.C. (eds.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), стр. 255-268.

### **Анализы**

Антигенсвязывающая молекула или антитело к RANKL, предложенные в настоящем документе, могут быть идентифицированы, проверены или охарактеризованы по своим физическим/химическим характеристикам и/или биологической активности с помощью различных анализов, известных в данной области техники.

В одном из аспектов антитела, предложенные в настоящем документе, тестируются на антигенсвязывающую активность, например, с помощью известных способов, таких как ИФА и вестерн-блоттинг.

В другом аспекте может использоваться конкурентный анализ для идентификации антитела, которое конкурирует за связывание с RANKL. В некоторых вариантах осуществления конкурирующее антитело связывается с тем же самым эпитопом (например, линейным или конформационным эпитопом), что и антигенсвязывающая молекула или антитело к RANKL. В иллюстративном конкурентном анализе иммобилизованный RANKL инкубируют в растворе, содержащем первое меченое антитело, которое связывается с RANKL, и второе немеченое антитело, которое тестируют на способность конкурировать с первым меченым антителом за связывание с RANKL. Второе немеченое антитело может присутствовать в супернатанте гибридомы. В качестве контроля иммобилизованный RANKL инкубируют в растворе, содержащем первое меченое антитело, но не второе немеченое антитело. Избыток несвязанных антител удаляют, и измеряют количество метки, связанной с иммобилизованным RANKL. Если количество метки, связанной с иммобилизованным RANKL, существенно снижено в испытуемом образце по сравнению с контрольным образцом, то указывается, что второе антитело конкурирует с первым антителом за связывание с RANKL.

В одном из аспектов предложен анализ для идентификации биологически активных антител к RANKL. Подробнее см. в разделе «примеры испытаний» настоящего раскрытия.

### **Иммуноконъюгат**

В соответствии с настоящим изобретением также предложен иммуноконъюгат, содержащий антигенсвязывающую молекулу или антитело к RANKL, конъюгированное с одним или несколькими цитотоксическими агентами, такими как химиотерапевтический агент или лекарственное средство, ингибитор роста, токсин (например, белковый токсин, ферментативно активный токсин или его фрагмент бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения) или радиоизотоп.



### Диагностические и терапевтические композиции

В конкретных вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула, предложенная в настоящем изобретении, может использоваться для обнаружения присутствия RANKL или NGF в биологическом образце, и антитело к RANKL, предложенное в настоящем документе, может использоваться для обнаружения присутствия RANKL в биологическом образце. Используемый в данном документе термин «обнаружение» включает количественное или качественное обнаружение. В конкретных вариантах осуществления биологический образец включает клетку или ткань, такую как опухолевая ткань.

В одном из вариантов осуществления предложена антигенсвязывающая молекула или антитело к RANKL для применения в способе диагностики или обнаружения. В еще одном аспекте предложен способ обнаружения наличия RANKL или NGF в биологическом образце. В некоторых вариантах осуществления способ включает приведение биологического образца в контакт с антигенсвязывающей молекулой или антителом к RANKL в подходящих условиях и обнаружение того, образуется ли комплекс между агентом для обнаружения и антигеном. Такие способы могут представлять собой *in vitro* или *in vivo* способы. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающую молекулу или антитело к RANKL используют для отбора субъекта, подходящего для лечения; например, RANKL или NGF является биомаркером для отбора пациента.

Типичными нарушениями, которые можно диагностировать с использованием антитела по настоящему изобретению, являются, например, В-клеточные нарушения, связанные с экспрессией RANKL, нарушения плазматических клеток, множественная миелома, плазмоцитома, плазмноклеточный лейкоз, макроглобулинемия, амилоидоз, макроглобулинемия Вальденстрема, одиночная плазмоцитома кости, экстрамедуллярная плазмоцитома, остеосклеротическая миелома, заболевания тяжелых цепей, моноклональная гаммапатия неустановленного значения и вялотекущая множественная миелома; аутоиммунные заболевания и системная красная волчанка.

В некоторых вариантах осуществления предложена меченая антигенсвязывающая молекула или меченое антитело к RANKL. Метки включают, помимо прочего, метки или модули, которые обнаруживаются напрямую (например, флуоресцентные, хромофорные, электроноплотные, хемилюминесцентные и радиоактивные метки), и модули, которые обнаруживаются опосредованным путем (например, модули, которые обнаруживаются опосредованно через ферментативную реакцию или молекулярное взаимодействие, такое как ферменты или лиганды).

В дополнительном аспекте предложена фармацевтическая композиция, содержащая антигенсвязывающую молекулу или антитело к RANKL, например, для применения в любом из следующих способов лечения. В одном из аспектов фармацевтическая композиция содержит любое из антител, предложенных в настоящем

документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В другом аспекте фармацевтическая композиция содержит любое из антител, предложенных в настоящем документе, и по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент.

Фармацевтическую композицию антигенсвязывающей молекулы или антитела к RANKL, описанную в настоящем описании, получают путем смешивания антитела с одним или несколькими необязательными фармацевтически приемлемыми носителями. Фармацевтическая композиция находится в форме лиофилизированной композиции или водного раствора. Составы для введения *in vivo* обычно стерильны. Стерильность может быть легко достигнута, например, путем фильтрации через стерильную фильтрационную мембрану.

### **Способ лечения и путь введения**

Любая из антигенсвязывающих молекул или антител к RANKL, предложенных в настоящем документе, может использоваться в способе лечения.

В одном из таких вариантов осуществления способ лечения дополнительно включает введение субъекту эффективного количества по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента (например, одного, двух, трех, четырех, пяти или шести дополнительных терапевтических агентов). «Субъектом» в соответствии с любым из вышеперечисленных вариантов может быть человек.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложено применение антигенсвязывающей молекулы или антитела к RANKL для изготовления или получения лекарственного средства. В одном из вариантов осуществления лекарственное средство используется для лечения заболевания, ассоциированного с RANKL, такого как скованность суставов или потеря костной массы, ассоциированная с экспрессией RANKL. Причем лекарственное средство присутствует в количестве, эффективном при описанных выше заболеваниях. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество составляет единичную суточную дозу или единичную недельную дозу.

В другом аспекте фармацевтическая композиция, содержащая антигенсвязывающую молекулу или антитело к RANKL, предложена например, для применения в любом из описанных выше фармацевтических применений или способов лечения. В одном из вариантов осуществления фармацевтическая композиция содержит любое из предложенных в настоящем документе антител к RANKL и фармацевтически приемлемый носитель. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент.

Антигенсвязывающая молекула или антитело к RANKL по настоящему изобретению могут быть использованы отдельно или в комбинации с другими средствами для лечения. Например, антитело по настоящему изобретению может быть совместно введено с по меньшей мере одним дополнительным терапевтическим агентом.

Антигенсвязывающая молекула или антитело к RANKL, описанные в настоящем документе (и любое дополнительное терапевтическое средство), могут быть введены любым подходящим способом, включая парентеральное, внутрилегочное и интраназальное введение, и, если этого требует местное лечение, внутриочаговое введение. Парентеральная инфузия включает внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Введение может осуществляться любым подходящим способом, например, инъекционно, например, внутривенно или подкожно, в зависимости от того, является ли введение краткосрочным или долгосрочным. В настоящем документе рассматриваются различные графики введения, включая, помимо прочего, однократное введение или несколько введений в разные моменты времени, болюсное введение и импульсную инфузию.

Антигенсвязывающая молекула или антитело к RANKL, указанные в настоящем документе, должны быть разработаны, введены и введены в соответствии с нормативными актами или отраслевыми стандартами. Факторы, учитываемые в этом контексте, включают конкретное заболевание, которое лечат, конкретное млекопитающее, которое лечат, клиническое состояние индивидуума, причину расстройства, место доставки препарата, способ введения, время введения и другие факторы, известные практикующим врачам. Антигенсвязывающая молекула или антитело к RANKL не обязательно должны быть (но необязательно) приготовлены вместе с одним или несколькими агентами, используемыми в настоящее время для профилактики или лечения расстройства. Эффективное количество таких дополнительных агентов зависит от количества антигенсвязывающей молекулы или антитела к RANKL, присутствующего в фармацевтической композиции, типа расстройства или лечения и других факторов, рассмотренных выше. Как правило, они используются в тех же дозах и с теми же путями введения, как описано в настоящем документе, или примерно в количестве, составляющем от 1 до 99% доз, описанных в настоящем документе, или в любой дозе и любым путем, который эмпирически/клинически определен как подходящий.

Для профилактики или лечения заболевания соответствующая дозировка антигенсвязывающей молекулы или антитела к RANKL (при использовании отдельно или в сочетании с одним или несколькими другими дополнительными терапевтическими агентами) будет зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, типа терапевтической молекулы, тяжести и течения заболевания. Вводится ли терапевтическая молекула в профилактических или терапевтических целях, предыдущая терапия, история болезни пациента и реакция на терапевтическую молекулу, а также усмотрение лечащего врача. Терапевтическая молекула вводится пациенту за один раз или в течение серии процедур. В зависимости от типа и тяжести заболевания от 1 мкг/кг до 15 мг/кг антигенсвязывающей молекулы или антитела к RANKL могут быть начальной дозой-кандидатом для введения пациенту, будь то, например, путем одного или

нескольких отдельных введений или путем непрерывной инфузии. Одна типичная суточная доза может варьироваться от 1 мкг/кг до 100 мг/кг и более, в зависимости от факторов, упомянутых выше. Соответственно, взяв для примера 50 кг массы тела, типичная единичная суточная доза составляет 50 мкг-5 г.

В целях предупреждения или лечения заболевания соответствующая доза антигенсвязывающей молекулы или антитела к RANKL (при использовании отдельно или в комбинации с одним или несколькими другими дополнительными терапевтическими агентами) будет зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, типа терапевтической молекулы, тяжести и течения заболевания, вводится ли терапевтическая молекула в профилактических или терапевтических целях, предыдущей терапии, истории болезни пациента и реакции на терапевтическую молекулу, а также решения лечащего врача. Терапевтическую молекулу целесообразно вводить пациенту за один раз или курсом лечения. В зависимости от типа и тяжести заболевания примерно от 1 мкг/кг до 15 мг/кг антигенсвязывающей молекулы или антитела к RANKL может быть начальной кандидатной дозой для введения пациенту, например, посредством одного или нескольких отдельных введений, или путем непрерывной инфузии. Одна типичная суточная доза может варьироваться от примерно 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более, в зависимости от факторов, упомянутых выше. Соответственно, если взять в качестве примера массу тела 50 кг, типичная суточная доза составляет от 50 мкг до 5 г.

### **Готовое изделие**

В другом аспекте настоящего изобретения предложено готовое изделие, которое включает в себя вещества, применяемые для лечения, предупреждения и/или диагностики вышеуказанного расстройства. Изделие содержит контейнер и этикетку или вкладыш, расположенный на контейнере или связанный с ним. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы, пакеты с раствором для внутривенного введения и т.п. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик.

Контейнер содержит композицию, которая сама по себе или в комбинации с другой композицией эффективна при лечении, предупреждении и/или диагностике заболевания, и может иметь стерильное отверстие для доступа (например, контейнер может представлять собой пакет с раствором для внутривенного введения или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций). По меньшей мере один активный агент в композиции представляет собой антигенсвязывающую молекулу или антитело к RANKL по настоящему изобретению. На этикетке или вкладыше в упаковке указано, что композиция используется для лечения выбранного состояния.

Кроме того, готовое изделие может содержать:

(a) первый контейнер с содержащейся в нем композицией, где композиция содержит антигенсвязывающую молекулу или антитело к RANKL по настоящему изобретению; и

(b) второй контейнер с содержащейся в нем композицией, где композиция содержит дополнительный цитотоксический или иной терапевтический агент.

В качестве альтернативы или дополнительно, изделие может дополнительно содержать второй (или третий) контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер. Он может дополнительно включать другие материалы, желательные с коммерческой точки зрения и с точки зрения пользователя, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

В качестве примера, готовое изделие представляет собой набор или набор реагентов, содержащий антигенсвязывающую молекулу или антитело к RANKL по настоящему изобретению.

### Примеры и примеры испытаний

Настоящее изобретение дополнительно описано ниже со ссылкой на следующие примеры и примеры испытаний, которые, однако, не ограничивают объем настоящего раскрытия. Экспериментальные способы в примерах и примерах испытаний по настоящему изобретению, в которых конкретные условия не указаны, как правило выполняются в общепринятых условиях, таких как «Антитела: лабораторное руководство» и «Молекулярное клонирование: лабораторное руководство» лаборатории Cold Spring Harbor Laboratory, или в условиях, рекомендуемых производителями исходных материалов или коммерческих продуктов. Реагенты без указания конкретного происхождения являются коммерчески доступными обычными реагентами.

### Пример 1: Получение антител к RANKL

Были разработаны праймеры и сконструированы дрожжевые библиотеки. Библиотеки обогащали и подвергали скринингу на наличие клонов-кандидатов с использованием белка RANKL (Sino Biology, 11682-HNCH), а аминокислотные последовательности переменных областей легких и тяжелых цепей антител в клонах определяли путем секвенирования. Последовательности полученных типичных антител к RANKL следующие:

Таблица 4. Последовательности CDR-областей антител

|       |       |  |       |                              |
|-------|-------|--|-------|------------------------------|
| 1-22H | HCDR1 | <u>D</u> YAMS<br>SEQ ID NO: 1                      | LCDR1 | RASQSVRGRYLA<br>SEQ ID NO: 4 |
|       | HCDR2 | GIS <u>A</u> SGSSTYYADSVK <u>G</u><br>SEQ ID NO: 2 | LCDR2 | GASSRAT<br>SEQ ID NO: 5      |

|       |       |   |       |                              |
|-------|-------|---|-------|------------------------------|
|       | HCDR3 | DPGTTVIMSWFDP<br>SEQ ID NO: 3           | LCDR3 | QQYGSSPRT<br>SEQ ID NO: 6    |
| 5-16H | HCDR1 | SYAMS<br>SEQ ID NO: 7                   | LCDR1 | RASQSVRGRYLA<br>SEQ ID NO: 4 |
|       | HCDR2 | GITGSGGSTYYADSVKG<br>SEQ ID NO: 8       | LCDR2 | GASSRAT<br>SEQ ID NO: 5      |
|       | HCDR3 | DP <u>AS</u> IVIMSWFDP<br>SEQ ID NO: 9  | LCDR3 | QQYGSSPRT<br>SEQ ID NO: 6    |
| 5-51H | HCDR1 | SYAMS<br>SEQ ID NO: 7                   | LCDR1 | RASQSVRGRYLA<br>SEQ ID NO: 4 |
|       | HCDR2 | GITGSGGSTYYADSVKG<br>SEQ ID NO: 8       | LCDR2 | GASSRAT<br>SEQ ID NO: 5      |
|       | HCDR3 | DPC <u>FSY</u> IMSWFDP<br>SEQ ID NO: 10 | LCDR3 | QQYGSSPRT<br>SEQ ID NO: 6    |
| 5-53H | HCDR1 | SYAMS<br>SEQ ID NO: 7                   | LCDR1 | RASQSVRGRYLA<br>SEQ ID NO: 4 |
|       | HCDR2 | GITGSGGSTYYADSVKG<br>SEQ ID NO: 8       | LCDR2 | GASSRAT<br>SEQ ID NO: 5      |
|       | HCDR3 | DPC <u>F</u> TYIMSWFDP<br>SEQ ID NO: 11 | LCDR3 | QQYGSSPRT<br>SEQ ID NO: 6    |
| 5-58H | HCDR1 | SYAMS<br>SEQ ID NO: 7                   | LCDR1 | RASQSVRGRYLA<br>SEQ ID NO: 4 |
|       | HCDR2 | GITGSGGSTYYADSVKG<br>SEQ ID NO: 8       | LCDR2 | GASSRAT<br>SEQ ID NO: 5      |
|       | HCDR3 | DPG <u>F</u> TYIMSWFDP<br>SEQ ID NO: 12 | LCDR3 | QQYGSSPRT<br>SEQ ID NO: 6    |
| D35H  | HCDR1 | <u>A</u> YPMS<br>SEQ ID NO: 13          | LCDR1 | RASQSVRGRYLA<br>SEQ ID NO: 4 |
|       | HCDR2 | GITGSGGSTYYADSVKG<br>SEQ ID NO: 8       | LCDR2 | GASSRAT<br>SEQ ID NO: 5      |
|       | HCDR3 | DPGTTVIMSWFDP<br>SEQ ID NO: 3           | LCDR3 | QQYGSSPRT<br>SEQ ID NO: 6    |
| D75H  | HCDR1 | SYAMS<br>SEQ ID NO: 7                   | LCDR1 | RASQSVRGRYLA<br>SEQ ID NO: 4 |
|       | HCDR2 | GITGSGGSTYYADSVKG<br>SEQ ID NO: 8       | LCDR2 | GASSRAT<br>SEQ ID NO: 5      |

|       |       |   |       |   |
|-------|-------|---|-------|---|
|       | HCDR3 | DPGTT <u>S</u> IMSWFDP<br>SEQ ID NO: 14 | LCDR3 | QQYGSSPRT<br>SEQ ID NO: 6   |
| D80H  | HCDR1 | SYAMS<br>SEQ ID NO: 7                   | LCDR1 | RASQSVRGRYLA<br>SEQ ID NO: 4  |
|       | HCDR2 | GITGSGGSTYYADSVKG<br>SEQ ID NO: 8       | LCDR2 | GASSRAT<br>SEQ ID NO: 5   |
|       | HCDR3 | DPGSTIIMSWFDP<br>SEQ ID NO: 15          | LCDR3 | QQYGSSPRT<br>SEQ ID NO: 6   |
| 2-52L | HCDR1 | SYAMS<br>SEQ ID NO: 7                   | LCDR1 | RASQSVRGRYLA<br>SEQ ID NO: 4  |
|       | HCDR2 | GITGSGGSTYYADSVKG<br>SEQ ID NO: 8       | LCDR2 | <u>Q</u> GSSRAT<br>SEQ ID NO: 16  |
|       | HCDR3 | DPGTTVIMSWFDP<br>SEQ ID NO: 3           | LCDR3 | QQYGSSPRT<br>SEQ ID NO: 6   |
| 2-72L | HCDR1 | SYAMS<br>SEQ ID NO: 7                   | LCDR1 | RASQSL <u>G</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>A</u><br>SEQ ID NO: 17         |
|       | HCDR2 | GITGSGGSTYYADSVKG<br>SEQ ID NO: 8       | LCDR2 | <u>G</u> TSSRAT<br>SEQ ID NO: 18  |
|       | HCDR3 | DPGTTVIMSWFDP<br>SEQ ID NO: 3           | LCDR3 | QQYGSSPRT<br>SEQ ID NO: 6   |
| 2-76L | HCDR1 | SYAMS<br>SEQ ID NO: 7                   | LCDR1 | RASQA <u>I</u> <u>P</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>A</u><br>SEQ ID NO: 19 |
|       | HCDR2 | GITGSGGSTYYADSVKG<br>SEQ ID NO: 8       | LCDR2 | <u>G</u> <u>V</u> SSRAT<br>SEQ ID NO: 20  |
|       | HCDR3 | DPGTTVIMSWFDP<br>SEQ ID NO: 3           | LCDR3 | QQYGSSPRT<br>SEQ ID NO: 6   |
| 2-79L | HCDR1 | SYAMS<br>SEQ ID NO: 7                   | LCDR1 | RASQSVRGRYLA<br>SEQ ID NO: 4  |
|       | HCDR2 | GITGSGGSTYYADSVKG<br>SEQ ID NO: 8       | LCDR2 | <u>G</u> SSRAT<br>SEQ ID NO: 21   |
|       | HCDR3 | DPGTTVIMSWFDP<br>SEQ ID NO: 3           | LCDR3 | QQYGSSPRT<br>SEQ ID NO: 6   |
| 2-87L | HCDR1 | SYAMS<br>SEQ ID NO: 7                   | LCDR1 | RASQYL <u>P</u> <u>F</u> <u>H</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>A</u><br>SEQ ID NO: 22         |
|       | HCDR2 | GITGSGGSTYYADSVKG<br>SEQ ID NO: 8       | LCDR2 | <u>D</u> TSSRAT<br>SEQ ID NO: 23  |

|       |       |                                   |       |  |
|-------|-------|-----------------------------------|-------|--|
|       | HCDR3 | DPGTTVIMSWFDP<br>SEQ ID NO: 3     | LCDR3 | QQYGSSPRT<br>SEQ ID NO: 6                                |
| 3-20L | HCDR1 | SYAMS<br>SEQ ID NO: 7             | LCDR1 | RASQA <u>IR</u> GP <u>N</u> LA<br>SEQ ID NO: 24          |
|       | HCDR2 | GITGSGGSTYYADSVKG<br>SEQ ID NO: 8 | LCDR2 | <u>D</u> TSSRAT<br>SEQ ID NO: 25                         |
|       | HCDR3 | DPGTTVIMSWFDP<br>SEQ ID NO: 3     | LCDR3 | QQYGSSPRT<br>SEQ ID NO: 6                                |
| 3-37L | HCDR1 | SYAMS<br>SEQ ID NO: 7             | LCDR1 | RASQA <u>IR</u> GR <u>K</u> LA<br>SEQ ID NO: 26          |
|       | HCDR2 | GITGSGGSTYYADSVKG<br>SEQ ID NO: 8 | LCDR2 | <u>D</u> TSSRAT<br>SEQ ID NO: 27                         |
|       | HCDR3 | DPGTTVIMSWFDP<br>SEQ ID NO: 3     | LCDR3 | QQYGSSPRT<br>SEQ ID NO: 6                                |
| 3-83L | HCDR1 | SYAMS<br>SEQ ID NO: 7             | LCDR1 | RASQA <u>L</u> G <u>V</u> R <u>G</u> LA<br>SEQ ID NO: 28 |
|       | HCDR2 | GITGSGGSTYYADSVKG<br>SEQ ID NO: 8 | LCDR2 | GASSRAT<br>SEQ ID NO: 5                                  |
|       | HCDR3 | DPGTTVIMSWFDP<br>SEQ ID NO: 3     | LCDR3 | QQYGSSPRT<br>SEQ ID NO: 6                                |
| 3-85L | HCDR1 | SYAMS<br>SEQ ID NO: 7             | LCDR1 | RASQS <u>I</u> P <u>G</u> P <u>R</u> LA<br>SEQ ID NO: 29 |
|       | HCDR2 | GITGSGGSTYYADSVKG<br>SEQ ID NO: 8 | LCDR2 | GASSRAT<br>SEQ ID NO: 5                                  |
|       | HCDR3 | DPGTTVIMSWFDP<br>SEQ ID NO: 3     | LCDR3 | QQYGSSPRT<br>SEQ ID NO: 6                                |
| 4-64L | HCDR1 | SYAMS<br>SEQ ID NO: 7             | LCDR1 | RASQSVRGR <u>Y</u> LA<br>SEQ ID NO: 4                    |
|       | HCDR2 | GITGSGGSTYYADSVKG<br>SEQ ID NO: 8 | LCDR2 | GASSRAT<br>SEQ ID NO: 5                                  |
|       | HCDR3 | DPGTTVIMSWFDP<br>SEQ ID NO: 3     | LCDR3 | QQYGSSP <u>R</u> I<br>SEQ ID NO: 30                      |

Таблица 5. Последовательности переменных областей антител к RANKL

| Название антитела | Последовательность области тяжелой цепи | вариабельной | Последовательность области легкой цепи |
|-------------------|---|--------------|--|
|-------------------|---|--------------|--|



|       |   |  |
|-------|---|--|
| 1-22H | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT<br>FADYAMSWWRQAPGKGLEWVSGISASG<br><u>SSTYYADSVKGRFTISRDN</u> SKNTLYLQM<br>NSLRAEDTAVYYCAK <u>DPGTTVIMSWFDP</u><br>WGQGTLVTVSS<br>SEQ ID NO: 31 |  |
| 5-16H | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT<br>FSSYAMSWWRQAPGKGLEWVSGITGSG<br><u>GSTYYADSVKGRFTISRDN</u> SKNTLYLQM<br>NSLRAEDTAVYYCAK <u>DPASIVIMSWFDP</u><br>WGQGTLVTVSS<br>SEQ ID NO: 32 |  |
| 5-51H | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT<br>FSSYAMSWWRQAPGKGLEWVSGITGSG<br><u>GSTYYADSVKGRFTISRDN</u> SKNTLYLQM<br>NSLRAEDTAVYYCAK <u>DPCFSYIMSWFDP</u><br>WGQGTLVTVSS<br>SEQ ID NO: 33 | EIVLTQSPGTL <del>SL</del> SPGERAT<br>LSCRASQSVRGRYLAWYQ<br>QKPGQAPRLLIYGASSRAT<br>GIPDRFSGSGSGTDFTLTIS |
| 5-53H | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT<br>FSSYAMSWWRQAPGKGLEWVSGITGSG<br><u>GSTYYADSVKGRFTISRDN</u> SKNTLYLQM<br>NSLRAEDTAVYYCAQ <u>DPCFTYIMSWFDP</u><br>WGQGTLVTVSS<br>SEQ ID NO: 34 | RLEPEDFAVFYC <u>QQYGSSP</u><br>RTFGQGTKVEIK<br>SEQ ID NO: 40   |
| 5-58H | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT<br>FSSYAMSWWRQAPGKGLEWVSGITGSG<br><u>GSTYYADSVKGRFTISRDN</u> SKNTLYLQM<br>NSLRAEDTAVYYCVQ <u>DPGFTYIMSWFDP</u><br>WGQGTLVTVSS<br>SEQ ID NO: 35 |  |
| D35H  | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT<br>FSAYPMSWWRQAPGKGLEWVSGITGSG<br><u>GSTYYADSVKGRFTISRDN</u> SKNTLYLQM<br>NSLRAEDTAVYYCAK <u>DPGTTVIMSWFDP</u><br>WGQGTLVTVSS<br>SEQ ID NO: 36 |  |

|       |   |   |
|-------|---|---|
| D75H  | <p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT<br/> <u>FSSYAMS</u>WVRQAPGKGLEWVSGITGSG<br/> <u>GSTYYADSVKGR</u>FTISRDN SKNTLYLQM<br/> NSLRAEDTAVYYCVKDPGTT<u>SIM</u>SWFDP<br/> WGQGTLVTVSS<br/> SEQ ID NO: 37</p>        |   |
| D80H  | <p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT<br/> <u>FSSYAMS</u>WVRQAPGKGLEWVSGITGSG<br/> <u>GSTYYADSVKGR</u>FTISRDN SKNTLYLQM<br/> NSLRAEDTAVYYCVKDPG<u>STI</u>MSWFD<u>P</u><br/> WGQGTLVTVSS<br/> SEQ ID NO: 38</p>  |   |
| 2-52L |   | <p>EIVLTQSPGTLSSLSPGERAT<br/> LSC<u>CRASQSVRGR</u>YLA<u>WYQ</u><br/> QKPGQAPRLLI<u>YQGSS</u>RAT<br/> GIPDRFSGSGSGTDFTLTIS<br/> RLEPEDFAVFYC<u>QQYGSSP</u><br/> <u>RTFGQGTKVEIK</u><br/> SEQ ID NO: 41</p> |
| 2-72L | <p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT<br/> <u>FSSYAMS</u>WVRQAPGKGLEWVSGITGSG<br/> <u>GSTYYADSVKGR</u>FTISRDN SKNTLYLQM<br/> NSLRAEDTAVYYCAKDPGTT<u>VIM</u>SWFD<u>P</u><br/> WGQGTLVTVSS<br/> SEQ ID NO: 39</p> | <p>EIVLTQSPGTLSSLSPGERAT<br/> LSC<u>CRASQSLGARG</u>LA<u>WYQ</u><br/> QKPGQAPRLLI<u>YGTSS</u>RAT<br/> GIPDRFSGSGSGTDFTLTIS<br/> RLEPEDFAVFYC<u>QQYGSSP</u><br/> <u>RTFGQGTKVEIK</u><br/> SEQ ID NO: 42</p> |
| 2-76L |   | <p>EIVLTQSPGTLSSLSPGERAT<br/> LSC<u>CRASQAIPYNQL</u>A<u>WYQQ</u><br/> KPGQAPRLLI<u>YGVSS</u>RATGI<br/> PDRFSGSGSGTDFTLTISRL<br/> EPEDFAVFYC<u>QQYGSSPRT</u><br/> FGQGTKVEIK<br/> SEQ ID NO: 43</p>        |

|       |  |  |
|-------|--|--|
| 2-79L |  | EIVLTQSPGTL <del>S</del> SLSPGERAT<br>LSC <u>RASQSVRGRY</u> LAWYQ<br>QKPGQAPRLLIY <u>GSSSRAT</u><br>GIPDRFSGSGSGTDFTLTIS<br>RLEPEDFAVFYC <u>QQYGSSP</u><br><u>RTFGQGTKVEIK</u><br>SEQ ID NO: 44  |
| 2-87L |  | EIVLTQSPGTL <del>S</del> SLSPGERAT<br>LSC <u>RASQYLPFHRL</u> LAWYQ<br>QKPGQAPRLLIY <u>DTSSRAT</u><br>GIPDRFSGSGSGTDFTLTIS<br>RLEPEDFAVFYC <u>QQYGSSP</u><br><u>RTFGQGTKVEIK</u><br>SEQ ID NO: 45 |
| 3-20L |  | EIVLTQSPGTL <del>S</del> SLSPGERAT<br>LSC <u>RASQAIRGPNL</u> LAWYQQ<br>KPGQAPRLLIY <u>DTSSRATGI</u><br>PDRFSGSGSGTDFTLTISR<br>EPEDFAVFYC <u>QQYGSSPRT</u><br>FGQGTKVEIK<br>SEQ ID NO: 46         |
| 3-37L |  | EIVLTQSPGTL <del>S</del> SLSPGERAT<br>LSC <u>RASQAIRGRKL</u> LAWYQQ<br>KPGQAPRLLIY <u>DTSSRATGI</u><br>PDRFSGSGSGTDFTLTISR<br>EPEDFAVFYC <u>QQYGSSPRT</u><br>FGQGTKVEIK<br>SEQ ID NO: 47         |
| 3-83L |  | EIVLTQSPGTL <del>S</del> SLSPGERAT<br>LSC <u>RASQALGVRGL</u> LAWYQ<br>QKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u><br>GIPDRFSGSGSGTDFTLTIS<br>RLEPEDFAVFYC <u>QQYGSSP</u><br><u>RTFGQGTKVEIK</u><br>SEQ ID NO: 48 |

|       |  |   |
|-------|--|---|
| 3-85L |  | EIVLTQSPGTL <del>SL</del> SPGERAT<br>LSC <u>CRASQS</u> IPGPRLAWYQQ<br>KPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u> GI<br>PDRFSGSGSGTDFTLTISRL<br>EPEDFAVFYC <u>QQYGSSPRT</u><br>FGQGTKVEIK<br>SEQ ID NO: 49       |
| 4-64L |  | EIVLTQSPGTL <del>SL</del> SPGERAT<br>LSC <u>CRASQSVRGRYLA</u> WYQ<br>QKPGQAPRLLIY <u>GASSRAT</u><br>GIPDRFSGSGSGTDFTLTIS<br>RLEPEDFAVFYC <u>QQYGSSP</u><br><u>RIFGQGTKVEIK</u><br>SEQ ID NO: 50 |

Вышеуказанные переменные области подвергали слиянию с константной областью легкой цепи и константной областью тяжелой цепи человека с образованием легкой и тяжелой цепей полного антитела. Последовательности константных областей типичных антител следующие:

Константная область тяжелой цепи человеческого IgG4:

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGKTYTCNV~~DH~~KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO: 51;

Константная область легкой цепи к человека:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 52.

**Последовательности типичных антител к RANKL следующие:**

**Тяжелая цепь D35H:**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYPMSWVRQAPGKGLEWWSGITGSGGS  
TYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPGTTVIMSWFDPWGQGLTVT  
SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL

YSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNV~~DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPP~~  
 KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV  
 LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG  
 FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH  
 NHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 53;

**Легкая цепь D35H:**

EIVLTQSPGTL~~SLSPGERATL~~SCRASQSVRGRYLA~~WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGI~~  
 PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV~~FYCQQYGSSPRT~~FGQGTKVEIKRTVAAPS~~VFIFPPSDE~~  
 QLKSGTASV~~VCLLNNFY~~PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK~~DSTYLSSTLTL~~SKADY  
 EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 54.

**Тяжелая цепь D75H:**

EVQLLES~~GGGLVQP~~GGSLRLS~~CAASGFTFSSYAMS~~WVRQAPGK~~GLEWVSGITGSGGS~~  
 TYYADSVKGRFTISRDN~~SKNTLYLQMNSL~~RAEDTAVYYCVK~~DPGTTSIMSWFDPWGQ~~TLTV  
 SSASTKGPSVF~~PLAPCSR~~STSESTAALGCLVKDYFPEPVT~~SVWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL~~  
 YSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNV~~DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPP~~  
 KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV  
 LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG  
 FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH  
 NHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 55;

**Легкая цепь D75H:**

EIVLTQSPGTL~~SLSPGERATL~~SCRASQSVRGRYLA~~WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGI~~  
 PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV~~FYCQQYGSSPRT~~FGQGTKVEIKRTVAAPS~~VFIFPPSDE~~  
 QLKSGTASV~~VCLLNNFY~~PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK~~DSTYLSSTLTL~~SKADY  
 EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 54.

**Тяжелая цепь D80H:**

EVQLLES~~GGGLVQP~~GGSLRLS~~CAASGFTFSSYAMS~~WVRQAPGK~~GLEWVSGITGSGGS~~  
 TYYADSVKGRFTISRDN~~SKNTLYLQMNSL~~RAEDTAVYYCVK~~DPGSTIIMSWFDPWGQ~~TLTVS  
 SASTKGPSVF~~PLAPCSR~~STSESTAALGCLVKDYFPEPVT~~SVWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY~~  
 SLSSVVTVPSSSLGKTYTCNV~~DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPK~~  
 PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL  
 HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG  
 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN  
 HYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 56;

**Легкая цепь D80H**

EIVLTQSPGTL~~SL~~SPGERATL~~SC~~RASQSVRGRYLA~~WY~~QQKPGQAPRLLIYGASSRATGI  
PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV~~FYC~~QQYGSSPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE  
QLKSGTASV~~V~~CLLN~~N~~FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK~~ST~~YLSSTL~~T~~LSKADY  
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 54.

Последовательности контрольного антитела к RANKL следующие:

Последовательность тяжелой цепи деносумаба:

EVLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITGSGGS  
TYYADSVKGRFTISRDN~~SK~~N~~T~~LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPGTTVIMSWFDPWGQGLVTV  
SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS~~GV~~H~~T~~FP~~AV~~LQSSGL  
YLS~~SS~~V~~V~~TV~~P~~SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDK~~T~~VERKCCVECP~~PC~~PAPPVAGPSVFLFPPK  
PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV~~V~~SVLTVV  
HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK~~T~~ISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN~~Q~~VSLTCLVKGF  
YPSDIAVEWESNGQPENNYK~~T~~TPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV~~F~~SCSV~~M~~HEALHN  
HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 57;

Последовательность легкой цепи деносумаба:

EIVLTQSPGTL~~SL~~SPGERATL~~SC~~RASQSVRGRYLA~~WY~~QQKPGQAPRLLIYGASSRATGI  
PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV~~FYC~~QQYGSSPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE  
QLKSGTASV~~V~~CLLN~~N~~FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK~~ST~~YLSSTL~~T~~LSKADY  
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 54.

**Пример 2: Получение биспецифических антител к RANKL/NGF**

Вторые антигенсвязывающие домены биспецифических антител по настоящему изобретению, которые связываются с NGF, могут быть получены из антигенсвязывающего фрагмента любого подходящего антитела. В частности, подходящие антитела описаны, например, в международной заявке WO2004058184 (полностью включенной в настоящий документ посредством ссылки).

CDR NGF-связывающего домена и последовательности переменных областей типичных биспецифических антител показаны ниже:

Таблица 6. CDR NGF-связывающего домена

|       |                          |       |   |
|-------|--------------------------|-------|---|
| HCDR1 | GYDLN<br>(SEQ ID NO: 58) | LCDR1 | RASQ <del>S</del> ISNNLN<br>(SEQ ID NO: 61) |
| HCDR2 | IIWGDGTTDYNSAVKS         | LCDR2 | YTSRFHS                                     |

|       |                                 |       |                              |
|-------|---------------------------------|-------|------------------------------|
|       | (SEQ ID NO: 59)                 |       | (SEQ ID NO: 62)              |
| HCDR3 | GGYWYATSYFDY<br>(SEQ ID NO: 60) | LCDR3 | QQEHTLPYT<br>(SEQ ID NO: 63) |

Вариабельная область тяжелой цепи NGF-связывающего домена:

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGIHWGDGTTDY  
NSAVKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYFDYWGQGTLVTVSS  
 SEQ ID NO: 64;

Вариабельная область легкой цепи NGF-связывающего домена:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI<sup>S</sup>NNLNWYQQKPGKAPKLLIYYT<sup>S</sup>RFHSGVP  
 SRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQEHTLPYTFGQGTKLEIK  
 SEQ ID NO: 65.

Вариабельные области NGF-связывающего домена подвергали слиянию с константной областью тяжелой цепи с SEQ ID NO: 51 или SEQ ID NO: 66 и константной областью легкой цепи с SEQ ID NO: 52 соответственно, с получением антитела к NGF. Последовательности следующие:

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS<sup>G</sup>VHTFPAVLQS  
 SGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNV<sup>D</sup>HKPSNTKVDK<sup>T</sup>VERKCCVECP<sup>P</sup>CPAPPVAGPSVFLF  
 PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVL  
 TVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV  
 KGFYP<sup>S</sup>DIAVEWESNGQPENNYKTT<sup>P</sup>PMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA  
 LHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 66;

тяжелая цепь антитела к NGF (N-mAb):

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGIHWGDGTTDY  
NSAVKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYFDYWGQGTLVTVSSA  
 STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS<sup>G</sup>VHTFPAVLQSSGLYSL  
 SSVTVPS<sup>S</sup>SLGTKTYTCNV<sup>D</sup>HKPSNTKVDK<sup>R</sup>VESKYGPPCP<sup>P</sup>CPAPEFLGGPSVFLFPPKPK  
 DTL<sup>M</sup>ISRTPEVTCVVDV<sup>S</sup>QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ  
 DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP  
 SDIAVEWESNGQPENNYKTT<sup>P</sup>PVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY  
 TQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 67;

Легкая цепь антитела к NGF (N-mAb):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI<sup>S</sup>NNLNWYQQKPGKAPKLLIYYT<sup>S</sup>RFHSGVP  
 SRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQEHTLPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ  
 LKSGTASV<sup>V</sup>CLLN<sup>N</sup>FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYE  
 KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Последовательности контрольного антитела к NGF:

Тяжелая цепь танезумаба:

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGIHWGDGTTDY  
NSAVKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYFYFDYWGQGLTVTVSSA  
 STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL  
 SSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCCVECPGPCAPPVAGPSVFLFPPKPKD  
 TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQQD  
 WLNQKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS  
 DIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT  
 QKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 69;

>Легкая цепь танезумаба:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSSINLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVP  
SRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYCQQEHTLPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ  
 LKSGTASVVCLLNFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE  
 KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 68.

В настоящее время для индикации костных метастазов моноклональные антитела, нацеленные на NGF, значительно отличаются от антител, нацеленных на RANKL, по клиническим дозам. Следовательно, при получении биспецифического антитела к NGF и RANKL необходимо сбалансировать активности плеча NGF и плеча RANKL биспецифического антитела, чтобы определить подходящую дозу биспецифического антитела, которая не будет вызывать побочные эффекты, возникающие в результате чрезмерно высоких доз или в результате неспособности выполнять функцию биспецифического антитела, как это происходит при чрезмерно низких дозах.

В настоящем изобретении было получено множество различных по структуре биспецифических антител, и в качестве примера были сконструированы биспецифические антитела со структурой DVD-IgG. Два разных переменных домена легкой цепи (VL) из антитела к RANKL и антитела к NGF были связаны последовательно, напрямую или через короткий линкер с помощью технологий рекомбинантных ДНК, после которых следует константный домен легкой цепи. Аналогичным образом, тяжелая цепь содержит два разных переменных домена тяжелой цепи (VH), соединенных последовательно, за которыми следуют константный домен CH1 и Fc-область. Линкер включает, помимо прочего, следующие пептидные линкеры: ASTKGP (SEQ ID NO: 70), TVAAPS (SEQ ID NO: 71), ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 72), TVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO: 73), AKTTPKLEEGEFSEAR (SEQ ID NO: 74), AKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO: 75), AKTTPKLG (SEQ ID NO: 76), SAKTTPKLG (SEQ ID NO: 77), SAKTTP (SEQ ID NO: 78),



RADAAP (SEQ ID NO: 79), RADAAPTVS (SEQ ID NO: 80), RADAAAAGGPGS (SEQ ID NO: 81), SAKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO: 82), ADAAP (SEQ ID NO: 83), ADAAPTVSIFPP (SEQ ID NO: 84), TVAAP (SEQ ID NO: 85), TVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO: 86), QPKAAP (SEQ ID NO: 87), QPKAAPSVTLFPP (SEQ ID NO: 88), AKTTPP (SEQ ID NO: 89), AKTTPPSVTPLAP (SEQ ID NO: 90), AKTTAP (SEQ ID NO: 91), AKTTAPSVYPLAP (SEQ ID NO: 92), ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 93), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 94), GENKVEYAPALMALS (SEQ ID NO: 95), GPAKELTPLKEAKVS (SEQ ID NO: 96) и GHEAAVMQVQYPAS (SEQ ID NO: 97).

Последовательности типичных биспецифических антител следующие:

>Первая цепь биспецифического антитела 1

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWWSGITGSGGS  
TYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDAVYYCVKDPGTTSIMSWFDPWGQGTLTV  
SSASTKGPQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGIWGDGT  
TDYNSAVKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYYFDYWGQGTLTV  
SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL  
YLSSSVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPP  
KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTV  
LHQDWLNGKEYKCKVSNKLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG  
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH  
NHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 98;

> Вторая цепь биспецифического антитела 1

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVRGRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGI  
PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVFYCQQYGSSPRTFGQGTKVEIKTVAAPDIQMTQSPSS  
LSASVGDRVTITCRASQSISNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGSGTDFTFT  
ISSLQPEDIATYCQQEHTLPYTFGQTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY  
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS  
SPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 99.

Первая цепь биспецифического антитела 2:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYPMSWVRQAPGKGLEWWSGITGSGGS  
TYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDAVYYCAKDPGTTVIMSWFDPWGQGTLTV  
SSASTKGPQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGIWGDGT  
TDYNSAVKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYYFDYWGQGTLTV  
SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL  
YLSSSVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPP  
KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTV  
LHQDWLNGKEYKCKVSNKLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG  
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH  
NHYTQKSLSLSLGK

KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV  
LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG  
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH  
NHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 100;

Вторая цепь биспецифического антитела 2:

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVRGRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGI  
PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVFCYQQYGSSPRTFGQGTKVEIK**TVAAPDIQMTQSPSS**  
LSASVGDRVTITCRASQSISNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGSGTDFTFT  
ISLQPEDIATYYCQQEHTLPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY  
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS  
SPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 99.

Первая цепь биспецифического антитела 3

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITGSGGS  
TYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVKDPGSTIIMSWFDPWGQGTLVTVS  
**SASTKGPQVQLQESG**PGLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGIWGDGTT  
DYNSAVKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYFDYWGQGTLVTVS  
**S**ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY  
SLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPK  
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL  
HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF  
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN  
HYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 101;

Вторая цепь биспецифического антитела 2:

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVRGRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGI  
PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVFCYQQYGSSPRTFGQGTKVEIK**TVAAPDIQMTQSPSS**  
LSASVGDRVTITCRASQSISNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGSGTDFTFT  
ISLQPEDIATYYCQQEHTLPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY  
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS  
SPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 99.

Примечание. Последовательности, подчеркнутые одной линией, представляют собой переменные области антитела к RANKL, последовательности, подчеркнутые двумя линиями, представляют собой переменные области антитела к NGF, последовательности, выделенные жирным шрифтом, представляют собой линкеры, а остальные последовательности являются константными областями.

### Примеры испытаний

#### Пример испытаний 1: испытание антител к RANKL на аффинность

Биосенсорный чип с белком А (GE, 29127556) использовался для аффинного захвата определенного количества тестируемых антител, а затем антигенов, человеческого белка RANKL (Sino Biological, 11682-HNCH) и человеческого белка NGF (Sino biological, 11050-HNAC), которым в серийных концентрациях позволяли растекаться по поверхности чипа. Сигналы реакции детектировали в реальном времени с помощью Biacore и получали кривые связывания и диссоциации. После завершения диссоциации в каждом цикле биочип промывали и регенерировали регенерационным раствором глицина и соляной кислоты (GE, BR-1003-54) с pH 1,5. Аппроксимацию экспериментальных данных проводили с использованием программного обеспечения BIAevaluation версии 4.1 с моделью 1:1 и получали значения аффинности. Результаты представлены в Таблице 7.

Таблица 7. Значения KD аффинности антител к RANKL

| Антитело | Аффинность к человеческому RANKL |          |          |   |
|----------|----------------------------------|----------|----------|---|
|          | ka (1/Ms)                        | kd (1/s) | KD (M)   | Соотношение аффинностей<br>(кратное увеличение<br>аффинности по сравнению с<br>деносумабом) |
| 1-22H    | 2,58E+04                         | 2,53E-04 | 9,81E-09 | 0,94  |
| 5-16H    | 2,92E+04                         | 2,60E-04 | 8,91E-09 | 1,04  |
| 5-51H    | 2,92E+04                         | 6,90E-04 | 2,36E-08 | 0,39  |
| 5-53H    | 1,72E+04                         | 5,83E-04 | 3,40E-08 | 0,27  |
| 5-58H    | 1,22E+04                         | 5,01E-04 | 4,10E-08 | 0,23  |
| D35H     | 2,71E+04                         | 7,61E-05 | 2,81E-09 | <b>3,29</b>   |
| D75H     | 5,24E+04                         | 7,73E-05 | 1,48E-09 | <b>6,24</b>   |
| D80H     | 1,97E+04                         | 7,40E-05 | 3,76E-09 | <b>2,46</b>   |

|          |          |          |          |      |
|----------|----------|----------|----------|------|
| 2-52L    | 1,57E+04 | 2,22E-04 | 1,42E-08 | 0,65 |
| 2-72L    | 1,62E+04 | 3,08E-04 | 1,90E-08 | 0,49 |
| 2-76L    | 1,68E+04 | 3,41E-04 | 2,03E-08 | 0,46 |
| 2-79L    | 1,42E+04 | 2,32E-04 | 1,63E-08 | 0,57 |
| 2-87L    | 1,07E+04 | 2,73E-04 | 2,56E-08 | 0,36 |
| 3-20L    | 2,01E+04 | 2,72E-04 | 1,35E-08 | 0,68 |
| 3-37L    | 1,55E+04 | 3,05E-04 | 1,97E-08 | 0,47 |
| 3-83L    | 1,56E+04 | 3,22E-04 | 2,07E-08 | 0,45 |
| 3-85L    | 1,50E+04 | 3,35E-04 | 2,23E-08 | 0,41 |
| 4-64L    | 1,48E+04 | 2,53E-04 | 1,71E-08 | 0,54 |
| Деносуаб | 1,90E+04 | 1,75E-04 | 9,24E-09 | 1,00 |

Результаты показывают, что аффинность сконструированного антитела D75H более чем в 6 раз выше, чем у деносуаба, и значения аффинности D35H и D80H также значительно лучше, чем у деносуаба. Аффинность других антител к RANKL незначительно выше. Она в ряде случаев даже ниже, чем у деносуаба.

**Пример испытания 2: испытание антител к RANKL на способность блокировать связывание RANKL с RANK**

Активность антител, блокирующих связывание лиганда с рецептором, определяли методом ИФА. Человеческий белок RANK разводили до концентрации 2 мкг/мл PBS с pH 7,4 (BasalMedia, B320) и вносили в 96-луночный микропланшет (Corning, 3590) в количестве 100 мкл/лунка, и планшет инкубировали в течение ночи при 4°C. После удаления жидкости в каждую лунку для блокирования добавляли по 200 мкл 1%-ного блокирующего раствора казеина (Thermo, 37528) и планшет инкубировали при 37°C в течение 2 часов. После завершения блокирования блокирующий раствор отбрасывали, и планшет трижды промывали PBST-буфером (pH 7,4, PBS, содержащий 0,1% Твин-20) для

последующего использования. После того как фиксированную концентрацию меченного биотином человеческого белка RANKL (Sino Biological, 11682-HNCH) смешивали с серийно разведенным антителом, смеси предварительно инкубировали при 37°C в течение 30 минут, затем добавляли в заблокированный микропланшет и инкубировали при 37°C в течение 1,5 часов. После завершения инкубации планшет 3 раза промывали PBST. Стрептавидин-HRP (Invitrogen, 434323, разведение 1:4000) добавляли в количестве 100 мкл/лунка и планшет инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Супернатант удаляли. После того как планшет 3 раза промыли PBST, добавляли хромогенный субстрат TMB (KPL, 5120-0077) в количестве 100 мкл/лунка и инкубировали планшет при комнатной температуре в течение 10-15 минут. Для остановки реакций добавляли 1 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> из расчета 50 мкл/лунка. Значения поглощения при 450 нм измеряли с помощью микропланшет-ридера. Кривую ингибирования связывания лиганда с рецептором строили с использованием программного обеспечения и рассчитывали значения IC<sub>50</sub>. Результаты представлены в Таблице 8.

Таблица 8. Способность антител к RANKL блокировать связывание RANKL с RANK

| Название антитела | Блокирование связывания RANKL с RANK<br>IC <sub>50</sub> (нМ) |
|-------------------|---|
| 5-53H             | 1,366   |
| 5-58H             | 0,9992  |
| D35H              | <b>0,2891</b>   |
| D75H              | <b>0,2964</b>   |
| D80H              | <b>0,3659</b>   |
| Деносумаб         | 0,5324  |

Результаты показывают, что все антитела к RANKL D35H, D75H и D80H могут блокировать связывание RANKL с RANK, при этом их блокирующая активность лучше, чем у деносумаба.

### **Пример испытаний 3: Определение связывающей активности биспецифических антител к антигенам разных видов методом ИФА**

Связывающую активность биспецифических антител по настоящему изобретению в отношении RANKL человека (Sino Biological, 11682-HNCH), RANKL обезьяны (Sino Biological, 90301-C01H), мышинового RANKL (R&D Systems, 462-TR/CF) и человеческого NGF (NGF обезьяны и NGF человека идентичны по последовательности) (Sino Biological, 11050-HNAC), и мышинового NGF (Sino Biological, 50385-MNAC) определяли с помощью ИФА следующим образом:

Антиген разводили до концентрации 1 мкг/мл PBS-буфером с pH 7,4 (BasalMedia, B320) и вносили в 96-луночный микропланшет (Corning, 9018) из расчета 100 мкл/лунка, и

планшет инкубировали в течение ночи при 4°C. После отбрасывания жидкости добавляли 5% блокирующий раствор обезжиренного молока (BD, 232100), разведенный PBS, из расчета 300 мкл/лунка, и планшет инкубировали при 37°C в течение 2 часов для блокирования. После завершения блокирования блокирующий раствор отбрасывали, и планшет промывали 3 раза буфером PBST (PBS, содержащим 0,1% Твин-20, с pH 7,4). Затем добавляли биспецифическое антитело, разведенное разводящим буфером (pH 7,4, содержащим 1% BSA) до различных концентраций, по 100 мкл/лунку, и планшет инкубировали в инкубаторе при 37°C в течение 1 часа. После завершения инкубации планшет 3 раза промывали PBST. Вторичное антитело к человеческому Fc, меченное HRP (Abcam, ab97225), разведенное разводящим буфером, добавляли в количестве 100 мкл/лунка, и планшет инкубировали при 37°C в течение 1 часа. После того как планшет 3 раза промыли PBST, добавляли хромогенный субстрат TMB (KPL, 5120-0077) в количестве 100 мкл/лунка и инкубировали планшет при комнатной температуре в течение 10-15 минут. В каждую лунку добавляли по 50 мкл 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> для остановки реакций. Значения поглощения при 450 нм измеряли с помощью микропланшетного ридера и рассчитывали значения EC50 связывания биспецифического антитела с антигенами. Результаты показаны в Таблице 9.

Таблица 9. EC50 связывания биспецифических антител с антигенами разных видов

| Антитело                   | EC50 по ИФА (нМ)       |                        |                        |                          |                        |
|----------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|
|                            | Человеч.<br>RANKL      | RANKL<br>обезьяны      | Мышиный<br>RANKL       | Человеч.(обезьян)<br>NGF | Мышиный<br>NGF         |
| Биспецифическое антитело 1 | 0,06245                | 0,4666                 | Связывание отсутствует | 12,27                    | 4,344                  |
| Деносумаб                  | 0,1277                 | 2,129                  | Связывание отсутствует | Связывание отсутствует   | Связывание отсутствует |
| Танезумаб                  | Связывание отсутствует | Связывание отсутствует | Связывание отсутствует | 2,270                    | 1,151                  |

Результаты показывают, что связывающая активность биспецифического антитела 1 в отношении RANKL человека или RANKL обезьяны лучше, чем у контрольного антитела деносумаба. Однако ни биспецифическое антитело 1, ни деносумаб не имеют перекрестного связывания с мышиным RANKL. Связывающая активность биспецифического антитела 1 в отношении человеческого NGF или мышинового NGF значительно слабее, чем у танезумаба, что указывает на то, что биспецифическое

антитело 1 по настоящему изобретению успешно снизило связывающую активность танезумабного конца (второго антигенсвязывающего домена, который специфически связывается с NGF).

#### **Пример испытаний 4: Испытания биспецифических антител на аффинность**

Биосенсорный чип с белком А (GE, 29127556) использовался для аффинного захвата определенного количества тестируемых антител, а затем антигенов, человеческого белка RANKL (Sino Biological, 11682-HNCH) и человеческого белка NGF (Sino biological, 11050-HNAC), которым в серийных концентрациях позволяли растекаться по поверхности чипа. Сигналы реакции детектировали в реальном времени с использованием Biacore и получали кривые связывания и диссоциации. После завершения диссоциации в каждом цикле биочип промывали и регенерировали регенерационным раствором глицина и соляной кислоты (GE, BR-1003-54) с pH 1,5. Аппроксимацию экспериментальных данных проводили с использованием программного обеспечения BIAevaluation версии 4.1 с моделью 1:1 и получали значения аффинности. Результаты представлены в Таблице 10.

Таблица 10. Значения аффинности биспецифических антител к разным антигенам

| Антитело                   | Аффинность к RANKL человека |          |          | Аффинность к NGF человека |          |          |
|----------------------------|-----------------------------|----------|----------|---------------------------|----------|----------|
|                            | ka (1/Ms)                   | kd (1/s) | KD (M)   | ka (1/Ms)                 | kd (1/s) | KD (M)   |
| Биспецифическое антитело 1 | 2,25E+04                    | 8,77E-05 | 3,89E-09 | 1,13E+03                  | 6,33E-05 | 5,61E-08 |
| Деносумаб                  | 1,04E+04                    | 1,53E-04 | 1,47E-08 | /                         | /        | /        |
| Танезумаб                  | /                           | /        | /        | 1,29E+06                  | 1,84E-04 | 1,42E-10 |

Результаты показывают, что аффинность биспецифического антитела 1 к RANKL человека в 3,8 раза выше, чем у деносумаба, а аффинность биспецифического антитела 1 к NGF человека значительно ниже, чем у танезумаба.

#### **Пример испытаний 5: Эксперименты по блокированию лигандов и рецепторов**

Блокирующую активность антител к лигандам и рецепторам определяют методом ИФА. Белок-рецептор (RANK или TrkA) разводили до концентрации 2 мкг/мл PBS с pH 7,4 (BasalMedia, B320) и вносили в 96-луночный микропланшет (Corning, 3590) из расчета 100 мкл/лунка, и планшет инкубировали в течение ночи при 4°C. После удаления жидкости в каждую лунку для блокирования добавляли по 200 мкл 1%-ного блокирующего раствора

казеина (Thermo, 37528) и планшет инкубировали при 37°C в течение 2 часов. После завершения блокирования блокирующий раствор отбрасывали и планшет трижды промывали PBST-буфером (pH 7,4, PBS, содержащий 0,1% Твин-20) для последующего использования. После того как фиксированную концентрацию меченного биотином белка-лиганда (RANKL или NGF) смешивали с серийно разведенным антителом или слитым белком, смеси предварительно инкубировали при 37°C в течение 30 минут, а затем добавляли в заблокированный микропланшет. Планшет инкубировали при 37°C в течение 1,5 часов. После завершения инкубации планшет 3 раза промывали PBST. Стрептавидин-HRP (Invitrogen, 434323, разведение 1:4000) добавляли в количестве 100 мкл/лунка и планшет инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Супернатант удаляли. После того как планшет 3 раза промыли PBST, вносили хромогенный субстрат ТМБ (KPL, 5120-0077) в количестве 100 мкл/лунка и инкубировали планшет при комнатной температуре в течение 10-15 минут. Для остановки реакций добавляли 1 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> из расчета 50 мкл/лунка. Значения поглощения при 450 нм измеряли с помощью микропланшет-ридера. Кривую ингибирования связывания лиганда с рецептором строили с использованием программного обеспечения и рассчитывали значения IC<sub>50</sub>.

В экспериментах использовались следующие белки-лиганды и рецепторы: человеческий белок RANKL (Sino Biological, 11682-HNCH), человеческий белок RANK (Sino Biological, 16078-H02H), человеческий белок TrkA (Sino Biological, 11073-H03H) и человеческий белок NGF (китайско-биологический, 11050-HNAC).

Результаты эксперимента представлены в таблице 11.

Таблица 11: блокирующая активность биспецифических антител

| Антитело                   | Блокирование связывания RANKL с RANK | Блокирование связывания NGF с TrkA |
|----------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|
|                            | IC <sub>50</sub> (нМ)                | IC <sub>50</sub> (нМ)              |
| Биспецифическое антитело 1 | 0,3225                               | 102,1                              |
| Деносумаб                  | 0,5585                               | /                                  |
| Танезумаб                  | /                                    | 3,663                              |

Результаты показывают, что блокирующая активность биспецифического антитела 1 в отношении RANKL лучше, чем у деносумаба, а его блокирующая активность в отношении NGF значительно слабее, чем у танезумаба. Это указывает на то, что снижение связывающей активности NGF-конца биспецифического антитела 1 также значительно снижает его блокирующую активность в отношении NGF.

#### Пример испытаний 6: Эксперименты по дифференцировке остеокластов



Основная функция RANKL — стимулировать дифференцировку и созревание остеокластов. Следовательно, ингибирующую активность антител к RANKL можно проверить с помощью экспериментов по дифференцировке остеокластов. Конкретные процедуры заключались в следующем:

Клетки Raw264.7 (ECACC, 91062702) высевали в 96-луночный планшет для культивирования клеток (Corning, 3599) и инкубировали в течение ночи в инкубаторе при 37°C. На следующие сутки фиксированную концентрацию человеческого белка RANKL (Sino Biological, 11682-HNCH) и серийно разведенное тестируемое биспецифическое антитело вносили в 96-луночный планшет с клетками и данный планшет инкубировали при 37°C в течение 4 суток. Затем 96-луночный планшет извлекали и удаляли супернатанты. Добавляли раствор для лизиса клеток (Beuyotime, P0013J) в количестве 100 мкл/лунка. После тщательного перемешивания смесей пипеткой клеточные лизаты переносили в центрифужные пробирки, помещали на лед на 10 мин и центрифугировали, и собирали супернатанты. Обращаясь к способу, описанному в наборе для анализа кислой фосфатазы, устойчивой к винной кислоте (Beuyotime, P0332), брали 40 мкл тестируемого образца и тщательно смешивали с 40 мкл хромогенного субстрата и 5 мкл винной кислоты; смесь инкубировали в инкубаторе при 37°C в течение 10 мин и добавляли 160 мкл стоп-раствора; значения оптической плотности (OD) при 405 нм были получены с использованием микропланшетного ридера, аппроксимация данных была выполнена с использованием программного обеспечения и было получено значение IC50. Результаты эксперимента представлены в Таблице 12.

Таблица 12. Ингибирующая дифференцировку остеокластов активность биспецифических антител

| Антитело                   | IC50 (нМ) |
|----------------------------|-----------|
| Биспецифическое антитело 1 | 1,193     |
| Деносуаб                   | 3,917     |

Результаты показывают, что активность биспецифического антитела 1 по ингибированию дифференцировки остеокластов более чем в 3,3 раза превышает активность деносуаба.

#### **Пример испытаний 7: Эксперимент по пролиферации клеток TF-1**

NGF стимулирует пролиферацию клеток TF-1 *in vitro*. Поэтому ингибирующую активность антител к NGF оценивали с помощью экспериментов по пролиферации клеток TF-1. Конкретные процедуры заключались в следующем:

Клетки TF-1 (ATCC, CRL-2003) ресуспендировали в среде 1640, не содержащей GM-CSF (Gibco, 22400-105), и помещали в 96-луночный планшет для культивирования

клеток (Corning, 3903), после чего планшет инкубировали в инкубаторе при 37°C в течение ночи. На следующий день фиксированную концентрацию человеческого белка NGF (Sino biological, 11050-HNAC) и серийно разведенное тестируемое антитело вносили в 96-луночный планшет с клетками и планшет инкубировали в инкубаторе при 37°C в течение 72 часов. Планшет с клеточной культурой вынимали и добавляли раствор Cell-titer Glo (Promega, G755B) из расчета 50 мкл/лунка. Планшет осторожно встряхивали в течение 10 минут и оставляли стоять при комнатной температуре на 10 минут, а биолюминесцентные сигналы детектировали с помощью PE Victor 3. Аппроксимацию данных проводили с помощью программного обеспечения и получали значения IC50. Результаты эксперимента представлены в Таблице 13.

Таблица 13. Ингибирующая пролиферацию клеток TF-1 активность биспецифических антител

| Антитело                   | IC50 (нМ) |
|----------------------------|-----------|
| Биспецифическое антитело 1 | 3,159     |
| Танезумаб                  | 0,7589    |

Результаты показывают, что биспецифическое антитело 1 все еще может ингибировать пролиферацию клеток TF-1, при этом ингибирующая активность танезумаба примерно в 4,2 раза выше, чем у биспецифического антитела 1, что указывает на то, что активность NGF-конца биспецифического антитела 1 была значительно снижена.

Следовательно, при условии, что существует корреляция между активностью *in vitro* и дозой, ожидается, что доза RANKL-конца биспецифического антитела 1 может быть снижена примерно до 40 мг, при этом *in vivo* эффективность RANKL-конца все еще сохраняется; доза NGF-конца может быть увеличена примерно до 80 мг, при этом сохраняется хорошая безопасность. Кроме того, в настоящее время цикл клинического применения антитела к NGF танезумаба в 2 раза больше цикла клинического применения антитела к RANKL деносумаба. Таким образом, типичное биспецифическое антитело 1 по настоящему изобретению может обеспечить баланс доз для указанных двух мишеней.

#### **Пример испытаний 8: Эффективность *in vivo* на животной модели костных метастазов**

Анальгезирующее и защищающее кости действие антител оценивали с использованием животной модели метастазов в костях.

Способ построения модели: самцы мышей C57 BL/6, SPF, были приобретены у Changzhou Cavens Laboratory Animal Co., Ltd. Животные были акклиматизированы к лабораторным условиям, был принят 12/12-часовой цикл света/темноты, температура

составляла  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ , влажность - от 40 до 50%. Животным давали свободный доступ к стандартному стерильному корму для мышей и воде. Когда масса тела мышей достигла примерно 25 г, приступили к моделированию.

После внутрибрюшинного введения 1% барбитурата натрия для обезболивания мышей проводили подготовку кожи. Мышь помещали на грелку-подушку, офтальмологическими ножницами осуществляли разрез в 1 см на коже латеральной части колена левой задней конечности в направлении, параллельном бедренной кости. Мышцы экспонировали, кожу и мышечные слои изолировали. Офтальмологическими ножницами производили разрез между прямой мышцей бедра и медиальной широкой мышцей бедра по линиям соединительной ткани. Прямую мышцу бедра и коленную чашечку перемещали к медиальной стороне коленного сустава изогнутым пинцетом. Мыщелок бедренной кости экспонировали без рассечения связки надколенника. Иглой диаметром 0,45 мм делали отверстие от верхушки до середины бедренной кости в межмышцелковой ямке. Иглу вводили в интрамедуллярное пространство на 1–1,5 см для формирования инъекционного канала. Микрошприц Hamilton (50 мкл, модель 1705 RN SYR, игла калибра 26, модель ga26/51 мм/pst3, кат. № 7768-02) вводили в полость костного мозга через отверстие и медленно инъецировали 10 мкл ( $5\times 10^4$ ) LLC1 клеток (ATCC, CRL-1642). После завершения инъекции иглу шприца вынимали. Ногу выпрямляли, коленную чашечку и связку вправляли изогнутым пинцетом, мышцы возвращали в исходное состояние. Присыпали порошком антибиотика, наружный разрез кожи закрывали автоматическим раневым зажимом (Roboz, Reflex 7 Clip 7 мм). После операции животных по возможности содержали в клетках не более чем по три особи. Через семь суток зажимы с ран удаляли. Группу плацебо-хирургического контроля подвергали той же операции, при этом в полость костного мозга вводили эквивалентный объем PBS. Контрольную группу как правило содержали без какого-либо лечения. Введение начинали через 7 суток после моделирования и осуществляли один раз каждые 5 суток и в общей сложности 3 раза. Болевое поведение мышей учитывали на 14-е сутки (или 15-е сутки), а повреждение костей ног оценивали в баллах на 21-е сутки.

Способ учета болевого поведения: животных помещали на пол из проволочной сетки, окруженный органическим стеклом, и акклиматизировали в течение 30 минут (до тех пор, пока животные не прекратили исследование и первичную деятельность по уходу в боксе). Затем наблюдали за их движениями и оценивали поведение, направленное на избегание боли в пораженной конечности, возникающей в течение 5 минут. Продолжительность поведения измеряли секундомером.

Поведение, направленное на избегание боли, определяли следующим образом:

(1) полная защита (ходьба с поднятой пораженной конечностью, стояние на земле без нее);

(2) скручивание пальцев пораженной конечности и выступ за сетку (у нормальной мыши пальцы конечностей растянуты и раздвинуты на сетке, и они стоят на передних частях лап. У мыши с метастазами в кости с опухолью пальцы пораженной конечности будут подгибаться. Если мышь делает это и может стоять на задней части ступни, боль считается легкой, а поведение не засчитывается. Если все подошвы лап не соприкасаются с сеткой или не проходят сквозь сетку, поведение засчитывается);

(3) облизывание конечностей на пораженной стороне;

(4) спорадические прыжки на одной ноге; и

(5) стояние на задней части конечности на одном боку (с поднятыми обеими передними конечностями).

Способ оценки в баллах повреждений костей:

Левое бедро в положении лежа на животе аккуратно вскрывали и исследовали на предмет разрушения костей с использованием цифровой кабинетной рентгеновской системы MX-20 (Faxitron/Bioptics), а повреждение кости оценивали в баллах назначенным специалистом.

Критерии оценки следующие:

0 - относительно нормальная, 1 – легкое локальное повреждение, 2 – локальное повреждение средней степени тяжести, 3 – множественные повреждения средней степени тяжести, 4 – тяжелое диффузное повреждение. Балльную оценку проводили на дистальном конце бедренной кости и проксимальном конце бедренной кости по отдельности, и баллы суммировали. Разрушение костей оценивалось в  $4 + 4 = 8$  баллов, когда оно было наиболее тяжелым.

1. Анальгезирующее и защищающее кости действие антагонистов RANLK и антагонистов NGF.

Поскольку деносумаб не обладает активностью перекрестного связывания с мышинным RANKL, авторы настоящего изобретения использовали антитело к мышинному RANKL AMR2 в комбинации с танезумабом, чтобы оценить, обладает ли комбинация двух антител улучшенной эффективностью *in vivo*, чем одно из них.

Последовательность вариабельной области антитела AMR2 получена из WO2013176469A1. Последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепей подвергали слиянию с константными областями человеческого IgG4 и  $\lambda$  человека соответственно, чтобы сконструировать полноразмерное антитело AMR2. Соответствующие последовательности AMR2 следующие:

Таблица 14. CDR антитела AMR2

|       |                           |       |                                   |
|-------|---------------------------|-------|-----------------------------------|
| HCDR1 | DYDMS<br>(SEQ ID NO: 102) | LCDR1 | TGSSSNIGNNAVS<br>(SEQ ID NO: 105) |
|-------|---------------------------|-------|-----------------------------------|

|       |  |       |                                 |
|-------|--|-------|---------------------------------|
| HCDR2 | WIYPSGGSIYYADSVKG<br>(SEQ ID NO: 103)  | LCDR2 | SDRHRPS<br>(SEQ ID NO: 106)     |
| HCDR3 | SGLTRTRWPIYYADGMDV<br>(SEQ ID NO: 104) | LCDR3 | GSWDASLSGYV<br>(SEQ ID NO: 107) |

Вариабельная область тяжелой цепи AMR2:

VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYDMSWVRQAPGKGLEWVSWIYPSGGSI  
YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGLTRTRWPIYYADGMDVWGQGT  
LVTVSS

SEQ ID NO: 108;

Вариабельная область легкой цепи AMR2:

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGNNAVSWYQQLPGTAPKLLIYSDRHRPSGV  
PDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGSWDASLSGYVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 109;

Тяжелая цепь AMR2

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYDMSWVRQAPGKGLEWVSWIYPSGG  
SIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGLTRTRWPIYYADGMDVWGQ  
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV  
LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPS  
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV  
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL  
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM  
HEALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO: 110;

Легкая цепь AMR2

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGNNAVSWYQQLPGTAPKLLIYSDRHRPSGV  
PDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGSWDASLSGYVFGGGTKLTVLGQPKANPTVTLF  
PPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYAASSYLSTP  
EQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO: 111.

Разделение на группы и дозирование представлены в таблице 15

Таблица 15. Разделение на группы и дозирование

| Группа | Кол-во<br>мышей | Антитело  | Доза (мг/кг<br>массы тела) | Частота<br>введения | Путь введения |
|--------|-----------------|-----------|----------------------------|---------------------|---------------|
| 1      | 12              | Носитель  | /                          | Q5d*3               | в/б           |
| 2      | 12              | Танезумаб | 10                         | Q5d*3               | в/б           |

|                   |    |                     |         |       |     |
|-------------------|----|---------------------|---------|-------|-----|
| 3                 | 12 | AMR2                | 20      | Q5d*3 | в/б |
| 4                 | 12 | Танезумаб +<br>AMR2 | 10 + 20 | Q5d*3 | в/б |
| Плацебо-хирургия  | 10 | /                   | /       | /     | /   |
| Холостой контроль | 10 | /                   | /       | /     | /   |

Примечания: Q5d\*3 обозначает, что введение осуществляли один раз каждые 5 суток и всего 3 раза; в/б обозначает внутривнутрибрюшинное введение.

Результаты эксперимента показаны на фиг. 2А-Фиг. 2D.

Результаты учета болевого поведения мышей показывают, что на 14-е сутки три группы, которым осуществляли введение, продемонстрировали значительные анальгезирующие эффекты по сравнению с отрицательной группой, причем анальгезирующий эффект у группы комбинированного введения был сильнее, чем у групп, получавших mAb. На 21-е сутки только группа комбинированного введения продемонстрировала значительный анальгезирующий эффект. Несмотря на то, что две группы, получавшие mAb, продемонстрировали определенные анальгетические эффекты, их эффекты статистически не отличались от эффектов негативной группы (по сравнению с носителем: \*P <0,05, \*\*P <0,01, \*\*\*P <0,0001).

Результаты балльной оценки повреждения костей показывают, что группа комбинированного введения демонстрировала определенный эффект по защите костной ткани на 14-е сутки. Группа комбинированного введения демонстрировала значительный эффект по защите костной ткани на 21-е сутки. Приведенные выше экспериментальные результаты показывают, что группа комбинированного введения продемонстрировала эффективность как в обезболивании, так и в защите костной ткани. Таким образом, авторы настоящего изобретения дополнительно подтвердили эффективность молекул биспецифических антител по настоящему изобретению *in vivo*.

## 2. Оценка *in vivo* эффективности NGF-конца биспецифического антитела.

Поскольку *in vitro* активность NGF-конца биспецифического антитела 1 примерно в 4 раза ниже, чем у NGF mAb танезумаба, в данном эксперименте по эффективности определяли, является ли NGF-конец биспецифического антитела 1 все еще эффективным у мышей. Разделение на группы представлено в таблице ниже:

Таблица 16. Дозирование и разделение на группы

| Группа | Число мышей | ЛС                         | Доза(мг/кг) | Частота введения | Путь введения |
|--------|-------------|----------------------------|-------------|------------------|---------------|
| 1      | 12          | Носитель                   | /           | Q5d              | в/б           |
| 2      | 12          | Биспецифическое антитело 1 | 13.5        | Q5d              | в/б           |

Примечания: Q5d означает, что введение осуществляли один раз каждые 5 суток; в/б. означает внутрибрюшинное введение.

Результаты эксперимента показаны на фиг. 3А-Фиг. 3В.

Результаты показывают, что биспецифическое антитело 1 оказывало значительное анальгезирующее действие по сравнению с отрицательной группой как на 14-е, так и на 21-е сутки после введения, что указывает на то, что NGF-конец биспецифического антитела 1 все еще является в значительной степени эффективным.

### 3. Оценка эффективности биспецифического антитела *in vivo*.

Животную модель костных метастазов конструировали с использованием трансгенных мышей RANKL человека (приобретенных у Biocytogen) для оценки эффективности биспецифического антитела *in vivo*. Разделение на группы представлено в Таблице 17:

Таблица 17. Дозирование и разделение на группы

| Группа | Число мышей | ЛС                         | Доза (мг/кг) | Частота введения | Путь введения |
|--------|-------------|----------------------------|--------------|------------------|---------------|
| 1      | 10          | плацебо                    |              | Q5d              | в/б           |
| 2      | 10          | Носитель                   | -            | Q5d              | в/б           |
| 3      | 14          | Биспецифическое антитело 1 | 5,4          | Q5d              | в/б           |
| 4      | 14          |                            | 21,6         | Q5d              | в/б           |

Примечания: Q5d означает, что введение осуществляли один раз каждые 5 суток; в/б означает внутрибрюшинное введение.

Результаты эксперимента показаны на фиг. 4А-Фиг. 4D.

Результаты показывают, что биспецифическое антитело 1 оказывало значительное анальгезирующее действие и защитное действие на костную ткань. Как на 15-е, так и на 21-е сутки группа, получавшая высокие дозы биспецифического антитела 1, демонстрировала значительный анальгезирующий эффект, при этом группы как высокой, так и низкой дозы демонстрировали значительное защитное действие на костную ткань от повреждения.

### Пример испытаний 9: ФК-анализы на крысах

Фармакокинетическое исследование *in vivo* было проведено на крысах SD. Самцов крыс SD (Zhejiang Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd.) делили на группы по 4 особи и внутривенно вводили биспецифическое антитело 1 в дозе 4 мг/кг. Образцы крови по 0,2 мл были собраны у групп, получавших введение, до осуществления введения и через 5 минут, 8 часов, 24 часа, 48 часов, 84 часа, 9 суток, 10 суток, 14 суток, 21 день и 28 суток после введения и без добавления антикоагулянта. Образцы крови оставляли при 4°C на 30 минут и центрифугировали при 1000 g в течение 15 минут. Сыворотку в верхних слоях собирали, помещали в EP-пробирки и хранили при -80°C.

Концентрацию в сыворотке определяли с помощью ИФА, а фармакокинетические параметры тестируемого антитела рассчитывали с помощью программного обеспечения Winnolin. Результаты показаны ниже:

Таблица 18. ФК результаты для биспецифического антитела 1

| Тест         | RANKL плечо | NGF плечо |
|--------------|-------------|-----------|
| t1/2 (суток) | 15,09       | 14,30     |

Результаты, полученные при проведении испытаний на крысах, показывают, что биспецифическое антитело 1 обладает хорошими ФК характеристиками; периоды полужизни RANKL и NGF- концов составляют 15,09 суток и 14,3 суток соответственно, данные значения являются близкими.



**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Антигенсвязывающая молекула, содержащая:  
по меньшей мере один первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с RANKL, и  
по меньшей мере один второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с NGF;

причем первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с RANKL, содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где:

i) переменная область тяжелой цепи содержит: HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; и

переменная область легкой цепи содержит: LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; или

ii) переменная область тяжелой цепи содержит: HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; и

переменная область легкой цепи содержит: LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; или

iii) переменная область тяжелой цепи содержит: HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и

переменная область легкой цепи содержит: LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

2. Антигенсвязывающая молекула по п. 1, где первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с RANKL, содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где:

вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 37, 36 или 38; и

вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 40;

предпочтительно,

вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, 36 или 38; и/или

вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40;

более предпочтительно,

вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и/или

вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.

3. Антигенсвязывающая молекула по п. 1 или 2, где второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с NGF, содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где:

вариабельная область тяжелой цепи содержит: HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59; и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60; и

вариабельная область легкой цепи содержит: LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63.

4. Антигенсвязывающая молекула по п. 3, где второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с NGF, содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где:

вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 64; и/или

вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 65;

предпочтительно,  
 переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64; и/или

переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65.

5. Антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1-4, содержащая Fc-область, где указанная Fc-область содержит две субъединицы, способные ассоциировать, при этом указанная Fc-область предпочтительно представляет собой Fc-область IgG<sub>4</sub>,

более предпочтительно, указанная Fc-область представляет собой Fc-область IgG<sub>4</sub>, а аминокислотный остаток в положении 228 представляет собой P, в соответствии с нумерацией по EU-индексу.

6. Антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1-5, содержащая первую цепь со структурой, имеющей формулу (I) и вторую цепь со структурой, имеющей формулу (II),

формула (I): VHa-линкер 1-VHb-CH1-одна субъединица Fc-области;

формула (II): VLa-линкер 2-VLb-CL;

где:

VHa и VHb представляют собой переменные области тяжелой цепи, а VLa и VLb представляют собой переменные области легкой цепи;

VHa и VLa образуют первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с RANKL, а VHb и VLb образуют второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с NGF; или

VHa и VLa образуют второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с NGF, а VHb и VLb образуют первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с RANKL; и

линкер 1 и линкер 2 являются пептидными линкерами, идентичными или разными по последовательности,

предпочтительно

VHa содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, 36 или 38, а VLa содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; и/или

VHb содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, а VLb содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65.

7. Антигенсвязывающая молекула по п. 6, где линкер 1 или линкер 2 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в любой из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 70-97;

предпочтительно линкер 1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70, и/или

линкер 2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85.

8. Антигенсвязывающая молекула по п. 6 или 7, где область CH1-Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51 или 66.

9. Антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 6-8, содержащая:

первую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 98, 100 или 101; и/или

вторую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 99;

предпочтительно антигенсвязывающая молекула содержит:

первую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98, 100 или 101; и

вторую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99; более предпочтительно, антигенсвязывающая молекула содержит две первые цепи, идентичные по последовательности, и две вторые цепи, идентичные по последовательности.

10. Антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1-9, где указанная антигенсвязывающая молекула обладает по меньшей мере одним из следующих свойств:

i) аффинность к RANKL первого антигенсвязывающего домена, который специфически связывается с RANKL, выше, чем аффинность к NGF второго антигенсвязывающего домена, который специфически связывается с NGF;

ii) значение EC50, с которым первый антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с RANKL, связывается с RANKL человека, меньше значения EC50, с которым второй антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с NGF, связывается с NGF человека; и

iii) значение IC50, при котором первый антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с RANKL, блокирует связывание RANKL с RANK, меньше значения IC50, при котором второй антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с NGF, блокирует связывание NGF с TrKA.

11. Антитело к RANKL, содержащее переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где:

i) переменная область тяжелой цепи содержит: HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; и

переменная область легкой цепи содержит: LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; или

ii) переменная область тяжелой цепи содержит: HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; и

переменная область легкой цепи содержит: LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; или

iii) переменная область тяжелой цепи содержит: HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и

переменная область легкой цепи содержит: LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

12. Антитело к RANKL по п.11, где:

переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 36, 37 или 38; и/или

переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 40;

предпочтительно переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, 37 или 38; и/или переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40;

более предпочтительно, переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и/или переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.

13. Антитело к RANKL по п.11 или 12, содержащее константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи, причем, предпочтительно, константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51 или 66, и /или константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52.

14. Антитело к RANKL по любому из пп. 11-13, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, где:

тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 53, 55 или 56, и/или легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 54. ;

предпочтительно,

тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и/или легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54; или

тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55, и/или легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54; или

тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, и/или легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54.

15. Антитело к RANKL по любому из пп.11-13, где указанное антитело к RANKL представляет собой фрагмент антитела; предпочтительно указанный фрагмент антитела выбран группы, состоящей из Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv, scFv, dsFv и dAb.

16. Антитело к RANKL по любому из пп. 11-15, где:

указанное антитело связывается с RANKL человека со значением KD менее 5 нМ; и/или

указанное антитело блокирует связывание RANKL с RANK со значением IC<sub>50</sub> менее 0,5 нМ.

17. Биспецифическое антитело, содержащее антитело к RANKL по любому из пп. 11-16.

18. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антигенсвязывающую молекулу по любому из пп. 1-10, или антитело к RANKL по любому из пп. 11-16, или биспецифическое антитело по п. 17.

19. Вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по п. 18.

20. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 19.

21. Способ получения антигенсвязывающей молекулы, антитела к RANKL или биспецифического антитела, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 20 в условиях, подходящих для экспрессии антигенсвязывающей молекулы или антитела.

22. Фармацевтическая композиция, содержащая:

терапевтически эффективное количество антигенсвязывающей молекулы по любому из пп. 1-10 или антитела к RANKL по любому из пп. 11-16, или биспецифического антитела по п. 17; и

один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей, буферов или вспомогательных веществ.

23. Способ лечения или предупреждения заболевания, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества антигенсвязывающей молекулы по любому из пп. 1-10 или антитела к RANKL по любому из пп. 11-16, или биспецифического антитела по п. 17, или фармацевтической композиции по п. 22;

предпочтительно заболевание представляет собой боль, тугоподвижность суставов или потерю костной массы;

более предпочтительно, боль выбрана из группы, состоящей из костно-суставной боли, боли при ревматоидном артрите, подагры, боли при раке кости, боли при переломах, послеоперационной боли, боли при раке, синдрома болезненного мочевого пузыря, скелетно-мышечной боли, простатита, тазовой боли, интерстициального цистита, боли в пояснице, дисменореи, боли, ассоциированной с заболеванием костей, невралгии тройничного нерва, постгерпетической невралгии, опоясывающего лишая, ишиаса, мигрени, диабетической невропатии и боли, ассоциированной с периферическими нервами;

при этом потеря костной массы ассоциирована по меньшей мере с одним состоянием, выбранным из группы, состоящей из остеопороза, болезни Педжета, остеомиелита, гиперкальциемии, остеопении, остеопороза, остеонекроза, повреждения костей, резорбции кости, несовершенного остеогенеза, воспаления, аутоиммунного

заболевания, энтерита, ревматоидного артрита, системной красной волчанки, болезни Крона, резорбции пародонтальной кости, остеолитических метастазов и рака.

24. Способ по п. 23, где рак выбран из группы, состоящей из рака молочной железы, рака предстательной железы, рака щитовидной железы, рака почки, рака легкого, рака пищевода, рака прямой кишки, рака мочевого пузыря, рака шейки матки, рака яичников, рака печени, рака желудочно-кишечного тракта, меланомы, множественной миеломы, остеосаркомы, лимфомы, немелкоклеточного рака легкого, опухоли кости и болезни Ходжкина.

25. Способ лечения или предупреждения заболевания, ассоциированного с NGF или RANKL, включающий введение субъекту профилактически или терапевтически эффективного количества антигенсвязывающей молекулы по любому из пп. 1-10 или антитела к RANKL по любому из пп. 11-16, или биспецифического антитела по п. 17, или фармацевтической композиции по п. 22;

предпочтительно заболевание, ассоциированное с NGF или RANKL, представляет собой боль, тугоподвижность суставов или потерю костной массы;

более предпочтительно, боль выбрана из группы, состоящей из костно-суставной боли, боли при ревматоидном артрите, подагры, боли при раке кости, боли при переломах, послеоперационной боли, боли при раке, синдрома болезненного мочевого пузыря, скелетно-мышечной боли, простатита, тазовой боли, интерстициального цистита, боли в пояснице, дисменореи, боли, ассоциированной с заболеванием костей, невралгии тройничного нерва, постгерпетической невралгии, опоясывающего лишая, ишиаса, мигрени, диабетической невропатии и боли, ассоциированной с периферическими нервами;

при этом потеря костной массы ассоциирована по меньшей мере с одним состоянием, выбранным из группы, состоящей из остеопороза, болезни Педжета, остеомиелита, гиперкальциемии, остеопении, остеопороза, остеонекроза, повреждения костей, резорбции кости, несовершенного остеогенеза, воспаления, аутоиммунного заболевания, энтерита, ревматоидного артрита, системной красной волчанки, болезни Крона, резорбции пародонтальной кости, остеолитических метастазов и рака.

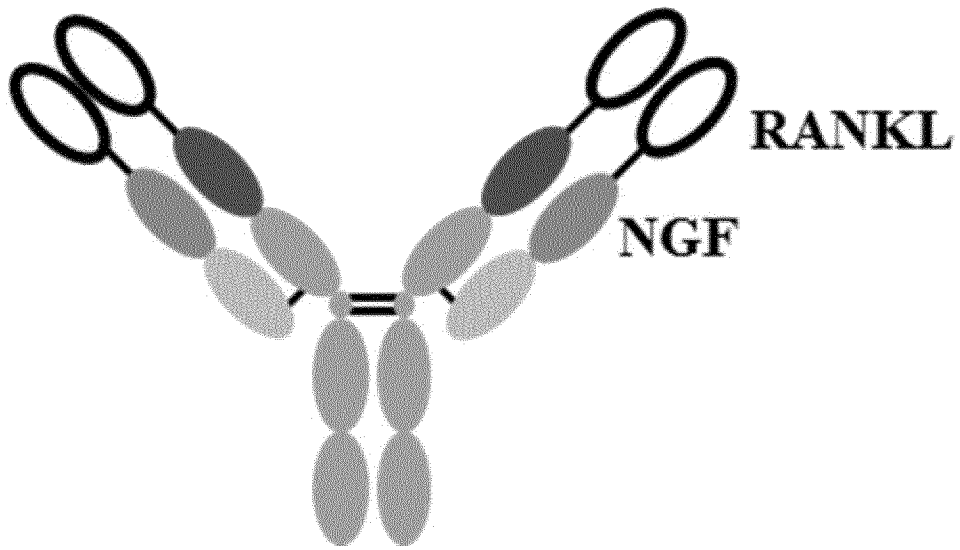
26. Способ лечения боли или ингибирования потери костной массы, включающий введение индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества антагониста NGF и антагониста RANKL; при этом антагонист NGF и антагонист RANKL вводят одновременно или последовательно;

предпочтительно антагонист NGF представляет собой антитело к NGF и/или антагонист RANKL представляет собой антитело к RANKL.



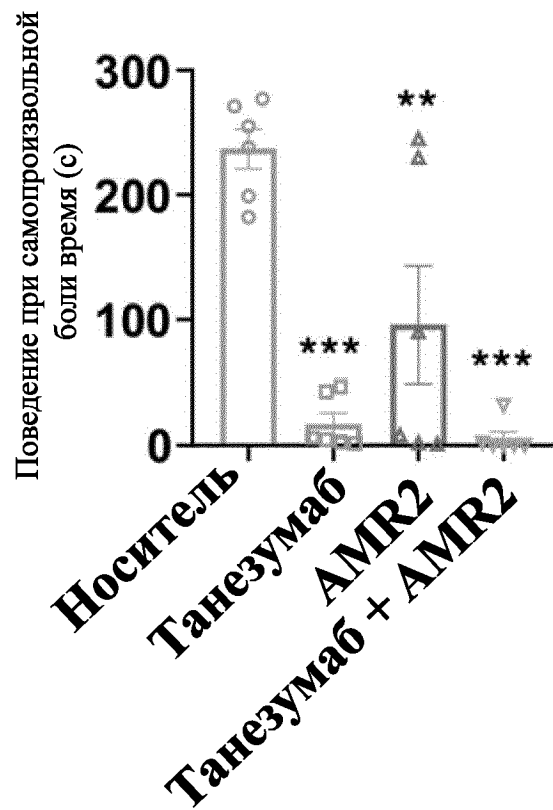
27. Способ по п. 26, где:

антитело к NGF представляет собой танезумаб и/или  
антитело к RANKL представляет собой деносумаб.

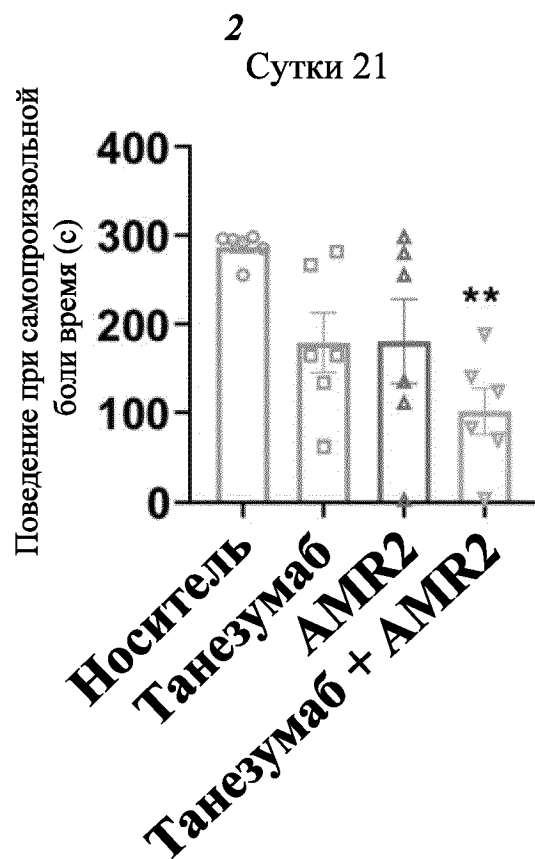


ФИГ. 1

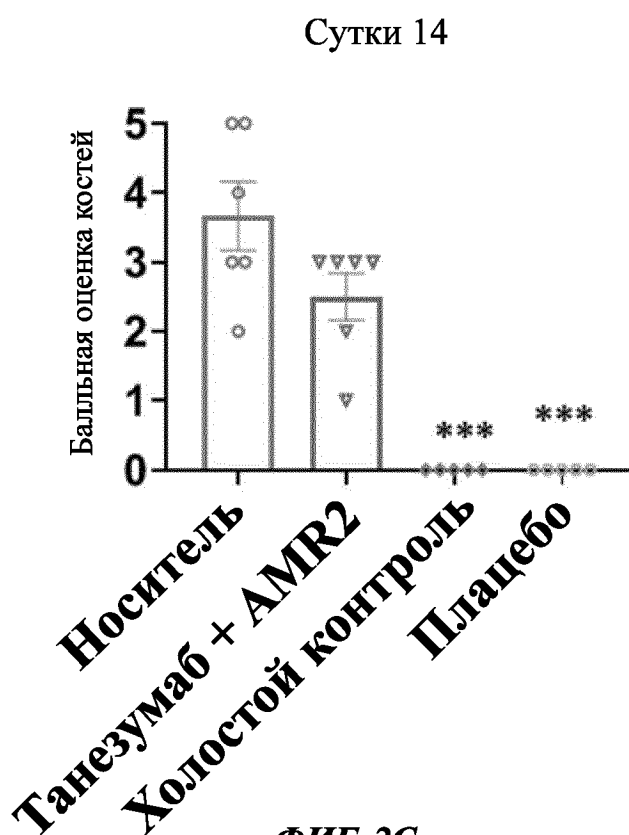
Сутки 14



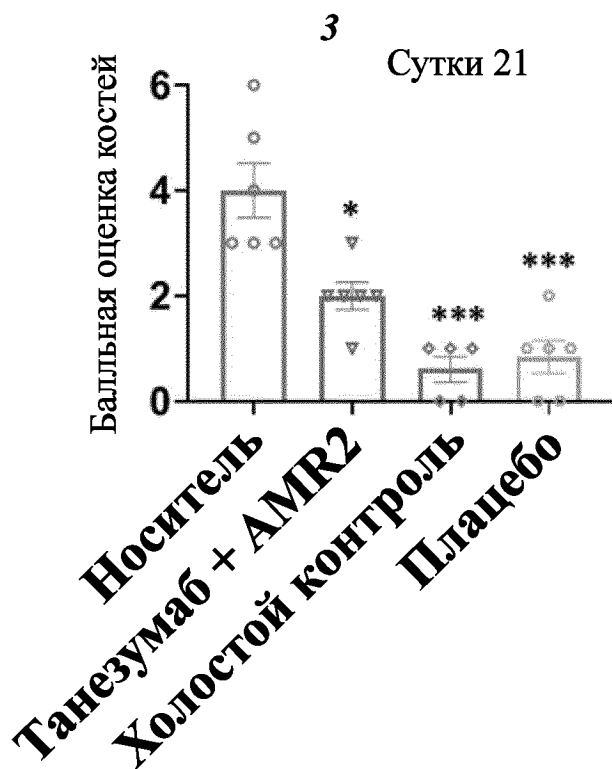
ФИГ. 2А



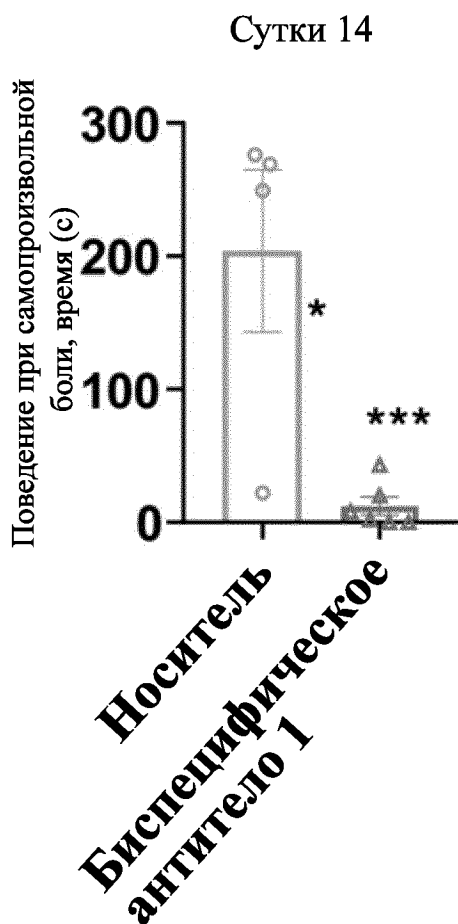
ФИГ. 2В



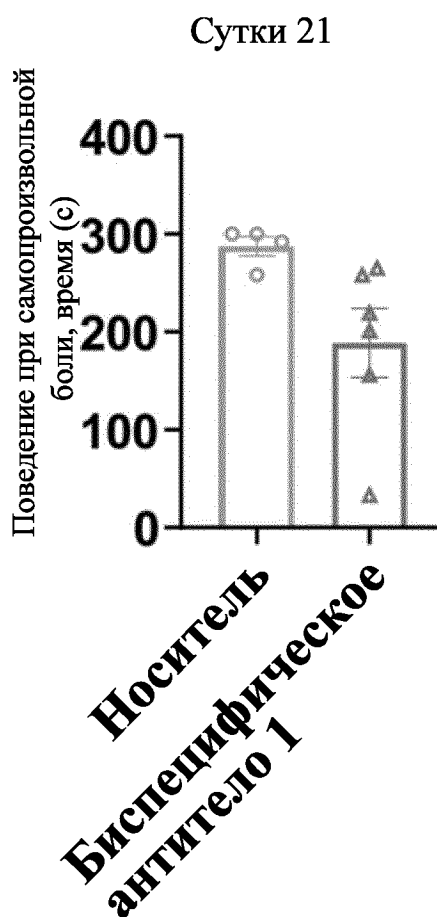
ФИГ. 2С



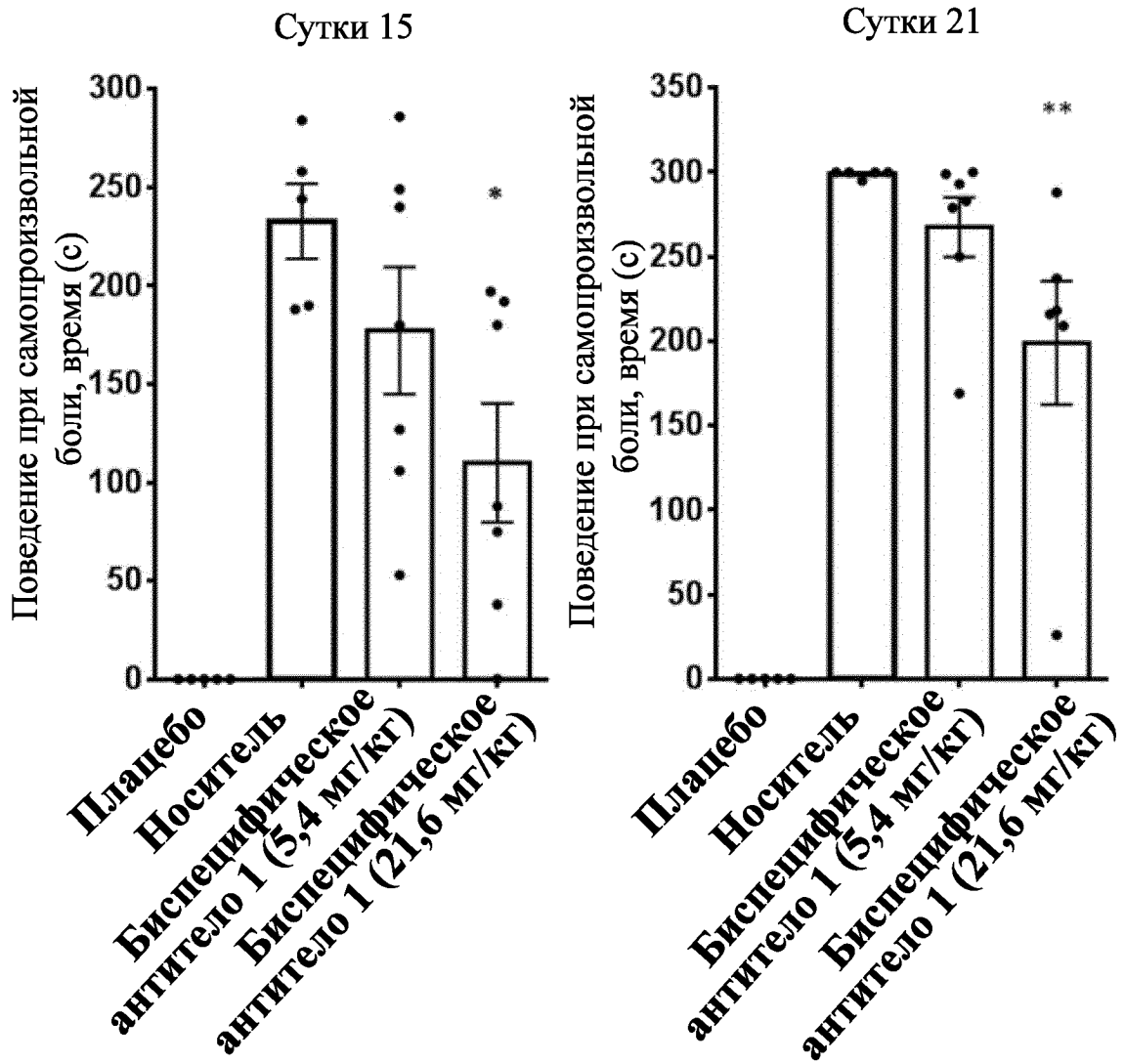
ФИГ. 2D



ФИГ. 3A

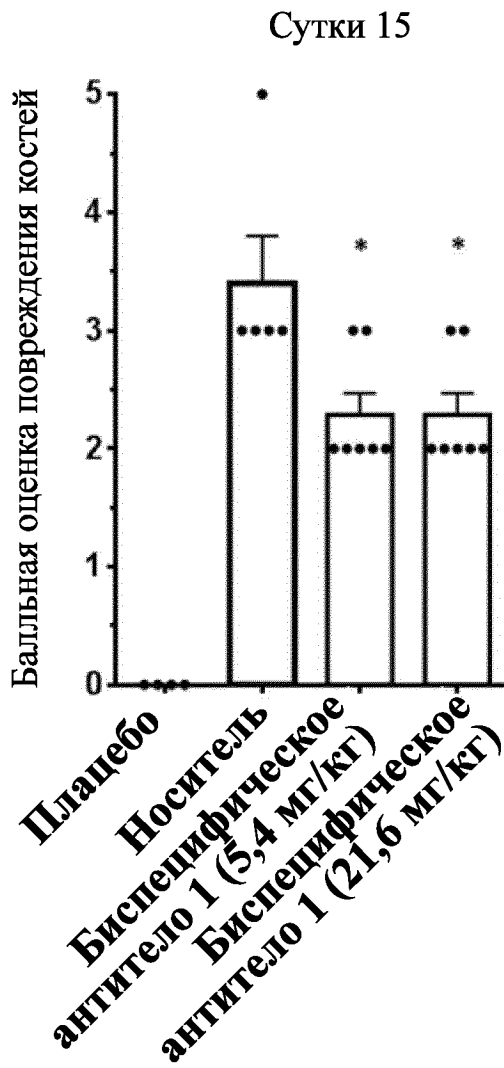


ФИГ. 3B

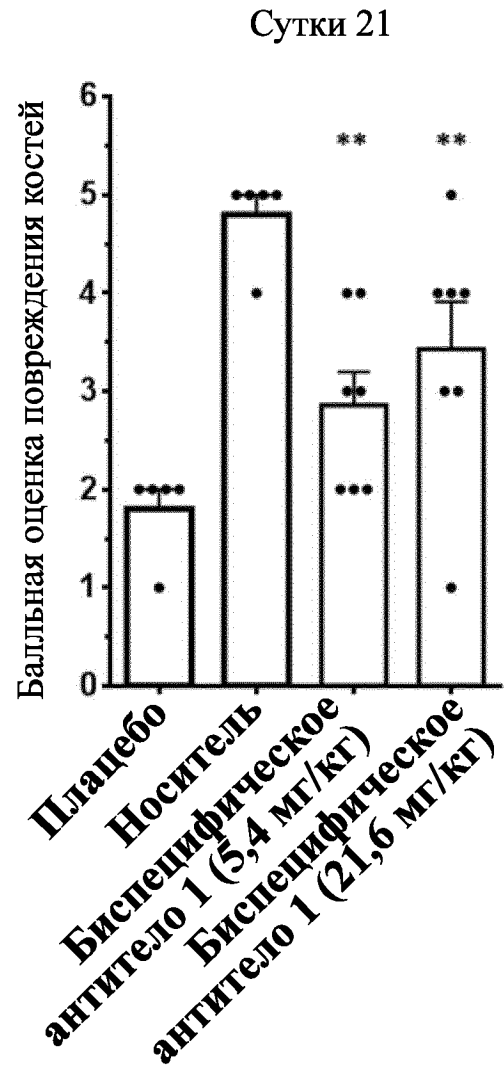


ФИГ. 4А

ФИГ 4В



ФИГ. 4С



ФИГ. 4D