



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010129549/10, 16.12.2008

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
16.12.2008

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
21.12.2007 EP 07024864.6

(43) Дата публикации заявки: 27.01.2012 Бюл. № 3

(45) Опубликовано: 20.06.2016 Бюл. № 17

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **MERCHANT AM et.al. An efficient route to human bispecific IgG, Nat Biotechnol. 1998 Jul;16(7):677-81. CHAN LA et.al. Variable region domain exchange in human IgGs promotes antibody complex formation with accompanying structural changes and altered effector functions, Mol Immunol. 2004 Jul;41(5):527-38. WO96/27011 A, 06.09.1996. RU 2295537 C2, 20.03.2007.**

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 21.07.2010

(86) Заявка РСТ:  
EP 2008/010703 (16.12.2008)(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2009/080252 (02.07.2009)

Адрес для переписки:

105082, Москва, Спартаковский пер., д. 2, стр. 1,  
секция 1, этаж 3, "ЕВРОМАРКПАТ"

(72) Автор(ы):

**Кристиан КЛАЙН (CH),  
Вольфганг ШЭФЕР (DE)**

(73) Патентообладатель(и):

**Ф.ХОФФМАНН-ЛЯ РОШ АГ (CH)**

## (54) ДВУХВАЛЕНТНЫЕ БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА

(57) Реферат:

Изобретение относится к иммунологии и представляет собой способ получения двухвалентного биспецифического антитела, где указанное антитело содержит первую легкую цепь и первую тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с первым антигеном; и вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося со вторым антигеном, в котором переменные домены VL и VH второй легкой цепи и второй тяжелой цепи

заменены друг на друга, где CH3-домен одной тяжелой цепи и CH3-домен другой тяжелой цепи соприкасаются друг с другом поверхностями, которые изменены для активации формирования двухвалентного биспецифического антитела. Способ включает следующие этапы: трансформацию клетки-хозяина экспрессионными векторами и культивирование клетки-хозяина в условиях, которые позволяют синтезировать указанное двухвалентное биспецифическое

антитело, и выделение указанного двухвалентного биспецифического антитела из культуры. Изобретение позволяет эффективно

получать биспецифические антитела к двум антигенам. 1 з.п. ф-лы, 15 ил., 4 пр.

R U 2 5 8 7 6 1 6 C 2

R U 2 5 8 7 6 1 6 C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2010129549/10, 16.12.2008**(24) Effective date for property rights:  
**16.12.2008**

Priority:

(30) Convention priority:  
**21.12.2007 EP 07024864.6**(43) Application published: **27.01.2012 Bull. № 3**(45) Date of publication: **20.06.2016 Bull. № 17**(85) Commencement of national phase: **21.07.2010**(86) PCT application:  
**EP 2008/010703 (16.12.2008)**(87) PCT publication:  
**WO 2009/080252 (02.07.2009)**

Mail address:

**105082, Moskva, Spartakovskij per., d. 2, str. 1,  
sektcija 1, etazh 3, "EVROMARKPAT"**

(72) Inventor(s):

**Kristian KLAJN (CH),  
Wolfgang SHEFER (DE)**

(73) Proprietor(s):

**F.KHOFFMANN-LYA ROSH AG (CH)**(54) **BIVALENT BISPECIFIC ANTIBODIES**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to immunology and provides a method of producing a bivalent bispecific antibody, wherein said antibody contains a first light chain and a first heavy chain of an antibody specifically bound to a first antigen; and a second light chain and a second heavy chain of an antibody specifically bound to second antigen, in which variable domains VL and VH of second light chain and a second heavy chain are replaced by each other, where CH3 domain of one heavy chain and CH3 domain other

heavy chain are in contact with each other by surfaces that are modified to activate formation of a bivalent bispecific antibody. Method involves following steps: transformation of host cell with expression vectors and host cell cultivation in conditions which enable synthesis of said bivalent bispecific antibody, and recovery of bivalent bispecific antibody from culture.

EFFECT: invention provides efficient production of bispecific antibodies to two antigens.

2 cl, 15 dwg, 4 ex

Настоящее изобретение относится к новым двухвалентным биспецифическим антителам, их получению и применению.

#### Предпосылки создания изобретения

В данной области известны сконструированные белки, такие как би- и мультиспецифические антитела, которые могут связываться с двумя или большим количеством антигенов. Указанные мультиспецифические связывающие белки можно создавать на основе методов клеточного слияния, химической конъюгации или рекомбинантной ДНК.

В последние годы создано широкое разнообразие форматов рекомбинантных биспецифических антител, например, четырехвалентные биспецифические антитела, полученные путем слияния, например, антитела IgG-формата и одноцепочечных доменов (см., например, Morrison S.L. и др., *Nature Biotech* 15, 1997, сс.159-163; WO 2001/077342; и Coloma M.J., *Nature Biotech* 25, 2007, сс.1233-1234).

Разработано также несколько других новых форматов, в которых уже не сохранялась основная структура антитела (IgA, IgD, IgE, IgG или IgM), таких как диа-, триа- или тетратела, минитела, несколько одноцепочечных форматов (scFv, бис-scFv), которые могут связывать два или большее количество антигенов (Holliger P. и др., *Nature Biotech* 23, 2005, сс.1126-1136; Fischer N., Leger O., *Pathobiology* 74, 2007, сс.3-14; Shen J и др., *Journal of Immunological Methods* 318, 2007, сс.65-74; Wu C. и др., *Nature Biotech* 25, 2007, сс.1290-1297)

Во всех указанных форматах используют линкеры либо для слияния основной структуры антитела (IgA, IgD, IgE, IgG или IgM) с дополнительным связывающим белком (например, scFv), либо для слияния, например, двух Fab-фрагментов или scFv (Fischer N., Leger O., *Pathobiology* 74, 2007, сс.3-14). Хотя очевидно, что линкеры имеют преимущество при создании биспецифических антител, с ними могут быть связаны также проблемы терапевтического плана. Фактически эти чужеродные пептиды могут вызывать иммунный ответ против самого линкера или области стыка между белком и линкером. Кроме того, гибкая природа этих пептидов делает их более чувствительными к протеолитическому расщеплению, что может приводить к плохой стабильности, агрегации и повышению иммуногенности антитела. Кроме того, может существовать необходимость в поддержании эффекторных функций, таких как комплементзависимая цитотоксичность (CDC) или антитело-обусловленная клеточнозависимая цитотоксичность (ADCC), которые опосредуются Fc-областью, путем сохранения высокой степени сходства с встречающимися в естественных условиях антителами.

Таким образом, в идеальном варианте необходимо создавать биспецифические антитела, которые обладают очень сходной общей структурой с встречающимися в естественных условиях антителами (типа IgA, IgD, IgE, IgG или IgM), с минимальным отклонением от человеческих последовательностей.

В соответствии с одним из подходов биспецифические антитела с высокой степенью сходства с встречающимися в естественных условиях антителами создавали с помощью технологии квадром (квадрогбридом) (см. Milstein S. и A.C.Cuello, *Nature*, 305, 1983, сс.537-540) на основе соматического слияния двух различных клеточных линий гибридом, экспрессирующих мышинные моноклональные антитела с требуемыми специфичностями биспецифического антитела. В результате случайного спаривания тяжелых и легких цепей двух различных антител в образующейся линии клеток гибрида гибридомы (или квадромы) получают вплоть до 10 различных видов антител, из которых только одно представляет собой требуемое функциональное биспецифическое антитело. Из-за присутствия ошибочно спаренных побочных продуктов и в значительной степени

сниженного выхода продукта, требуются более сложные процедуры очистки (см., например, Morrison S.L., Nature Biotech 25, 2007, сс.1233-1234). В целом, эта же проблема, связанная с ошибочно спаренными побочными продуктами, сохраняется при применении методов рекомбинантной экспрессии.

5       Подход, с помощью которого можно обойти проблему, связанную с имеющимися  
ошибочные спаривания побочными продуктами, известный под названием «knobs-into-  
holes» (взаимодействие по типу «выступ-впадина»), направлен на усиление спаривания  
двух различных тяжелых цепей антитела путем интродукции мутаций в СНЗ-домены  
10       для модификации поверхности раздела в области контакта. На одной цепи имеющие  
большие размеры аминокислоты заменяли на аминокислоты с короткими боковыми  
цепями для создания «впадины». И, наоборот, аминокислоты с более крупными  
боковыми цепями интродуцировали в другой СНЗ-домен, создавая «выступ». Путем  
совместной экспрессии этих двух тяжелых цепей (и двух идентичных легких цепей,  
15       которые должны соответствовать обеим тяжелым цепям), получали высокий выход  
гетеродимерной формации («выступ-впадина») относительно гомодимерной формации  
(«впадина-впадина» или «выступ-выступ») (Ridgway J. B., Presta L.G., Carter P. и WO  
1996/027011). Процентное содержание гетеродимера можно дополнительно повышать  
путем ремоделирования поверхностей раздела двух СНЗ-доменов с помощью технологии  
20       фагового дисплея и интродукции дисульфидного мостика для стабилизации  
гетеродимеров (Merchant A.M. и др., Nature Biotech 16, 1998, сс.677-681; Atwell S., Ridgway  
J.B., Wells J.A., Carter P., J Mol Biol 270, 1997, сс.26-35). Новые подходы к технологии  
«knobs-into-holes» описаны, например, в EP 1870459A1. Хотя указанный формат,  
вероятно, является очень привлекательным, в настоящее время отсутствуют данные о  
его развитии в направлении клинического применения. Одним из важных ограничений  
25       этой стратегии является то, что легкие цепи двух родительских антител должны быть  
идентичными для предупреждения ошибочных спариваний и формирования неактивных  
молекул. Таким образом, эта технология не пригодна для более легкого создания  
рекомбинантных двухвалентных биспецифических антител к двум антигенам с  
использованием в качестве исходных двух антител к первому и второму антигену,  
30       поскольку должны быть оптимизированы или тяжелые цепи этих антител, и/или  
идентичные легкие цепи.

У Xie Z., и др., J Immunol Methods 286, 2005, сс.95-101 описан новый формат  
биспецифического антитела на основе использования scFv в комбинации с технологией  
«knobs-into-holes» для получения Fc-области.

35       Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к двухвалентному биспецифическому антителу,  
содержащему:

- а) легкую цепь и тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с первым антигеном; и
- 40       б) легкую цепь и тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося со вторым антигеном, в котором переменные домены VL и VH заменены друг на друга.

Следующим вариантом осуществления изобретения является способ получения  
двухвалентного биспецифического антитела, предлагаемого в изобретении,  
закрывающийся в том, что

- 45       а) трансформируют клетку-хозяина
  - векторами, которые содержат молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие легкую цепь и тяжелую цепь антитела, которое специфически связывается с первым антигеном,
  - векторами, которые содержат молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие легкую

цепь и тяжелую цепь антитела, которое специфически связывается со вторым антигеном, в котором вариабельные домены VL и VH заменены друг на друга;

б) культивируют клетку-хозяина в условиях, которые позволяют синтезировать указанную молекулу антитела; и

5 в) выделяют молекулу антитела из культуры.

Следующим вариантом осуществления изобретения является клетка-хозяин, содержащая

- векторы, которые содержат молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие легкую цепь и тяжелую цепь антитела, которое специфически связывается с первым антигеном,

10 - векторы, которые содержат молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие легкую цепь и тяжелую цепь антитела, которое специфически связывается со вторым антигеном, в котором вариабельные домены VL и VH заменены друг на друга.

Следующим вариантом осуществления изобретения является композиция, предпочтительно фармацевтическая или диагностическая композиция антитела, предлагаемого в изобретении.

15 Следующим вариантом осуществления изобретения является фармацевтическая композиция, которая содержит антитело, предлагаемое в изобретении, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент.

Следующим вариантом осуществления изобретения является способ лечения пациента, 20 который нуждается в терапии, отличающийся тем, что вводят пациенту в терапевтически эффективном количестве антитело, предлагаемое в изобретении.

Подробное описание изобретения

Изобретение относится к двухвалентному биспецифическому антителу, содержащему:

25 а) легкую цепь и тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с первым антигеном; и

б) легкую цепь и тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося со вторым антигеном, в котором вариабельные домены VL и VH заменены друг на друга.

Таким образом, двухвалентное биспецифическое антитело содержит:

30 а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с первым антигеном; и

б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося со вторым антигеном, в котором вариабельные домены VL и VH второй легкой цепи и второй тяжелой цепи заменены друг на друга.

35 Таким образом, для создания антитела, специфически связывающегося со вторым антигеном, применяют следующие процессы:

в легкой цепи

вариабельный домен VL легкой цепи заменяют на вариабельный домен VH тяжелой цепи указанного антитела;

и в тяжелой цепи

40 вариабельный домен VH тяжелой цепи заменяют на вариабельный домен VL легкой цепи указанного антитела.

Понятие «антитело» к контексте настоящего описания относится к полным моноклональным антителам. Такие полные антитела состоят из двух пар, каждая из которых включает «легкую цепь» (LC) и «тяжелую цепь» (HC) (указанные пары легкая цепь (LC)/тяжелая цепь сокращенно обозначают в контексте настоящего описания как LC/HC). Легкие цепи и тяжелые цепи указанных антител представляют собой полипептиды, состоящие из нескольких доменов (областей). В полном антителе каждая 45 тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи (сокращенно обозначена

в контексте настоящего описания как HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит константные CH1-, CH2- и CH3-домены тяжелой цепи (в антителе, которое относится к классам IgA, IgD и IgG) и необязательно константный CH4-домен тяжелой цепи (в антителе, которое относится к классам IgE и IgM). Каждая легкая цепь содержит переменный домен легкой цепи VL и константный домен легкой цепи CL. Структура одного из классов встречающихся в естественных условиях антител, а именно антитела класса IgG, показана, например, на фиг.1. Переменные домены VH и VL можно дополнительно подразделять на области гипервариабельности, обозначенные как гипервариабельные участки (CDR), перемежающиеся более консервативными областями, которые называют каркасными участками (FR). Каждая VH- и VL-область состоит из трех CDR и четырех FR, которые расположены в направлении от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 ((Janeway C.A., Jr. и др., Immunobiology., 5-ое изд., изд-во Garland Publishing, 2001; и Woof J., Burton D., Nat Rev Immunol 4, 2004, сс.89-99). Две пары, каждая из которых включает тяжелую цепь и легкую цепь (HC/LC), обладают способностью специфически связываться с одним и тем же антигеном. Таким образом, полное антитело представляет собой двухвалентное моноспецифическое антитело. Указанные «антитела» представляют собой, например, мышинные антитела, человеческие антитела, химерные антитела, гуманизированные антитела и созданные с помощью генной инженерии антитела (варианты антител или мутантные антитела), если они сохраняют свои характерные свойства. Наиболее предпочтительными являются человеческие или гуманизированные антитела, прежде всего в виде рекомбинантных человеческих или гуманизированных антител.

Известно пять типов тяжелых цепей антител млекопитающих, которые обозначают греческими буквами:  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  и  $\mu$  (Janeway C.A., Jr. и др., Immunobiology., 5-ое изд., изд-во Garland Publishing, 2001). Присутствующий тип тяжелой цепи определяет класс антитела; указанные цепи обнаружены в антителах типа IgA, IgD, IgE, IgG и IgM соответственно (Rhoades R.A., Pflanzner R.G., Human Physiology, 4-ое изд., изд-во Thomson Learning, 2002). Различные тяжелые цепи отличаются по размеру и составу;  $\alpha$  и  $\gamma$  содержат примерно 450 аминокислот, а  $\mu$  и  $\epsilon$  состоят примерно из 550 аминокислот.

Каждая тяжелая цепь содержит две области, т.е. константную область и переменную область. Константная область является идентичной во всех антителах одного и того же изотипа, но отличается в антителах различного изотипа. Тяжелые цепи  $\gamma$ ,  $\alpha$  и  $\delta$  содержат константную область, которая состоит из трех константных доменов CH1, CH2 и CH3 (выстроены в ряд) и шарнирной области, которая придает гибкость (Woof J., Burton D., Nat Rev Immunol 4, 2004, сс.89-99); тяжелые цепи  $\mu$  и  $\epsilon$  содержат константную область, которая состоит из четырех константных доменов CH1, CH2, CH3 и CH4 (Janeway C.A., Jr. и др., Immunobiology., 5-ое изд., изд-во Garland Publishing, 2001). Переменная область тяжелой цепи отличается у антител, которые продуцируются различными В-клетками, но является одинаковой у всех антител, продуцируемых индивидуальной В-клеткой или В-клеточным клоном. Переменная область каждой тяжелой цепи антитела содержит примерно 110 аминокислот и состоит из одного домена.

У млекопитающих известно только два типа легких цепей, которые обозначают как лямбда ( $\lambda$ ) и каппа ( $\kappa$ ). Легкая цепь состоит из двух последовательно расположенных доменов: один константный домен CL и один переменный домен VL. Примерная длина легкой цепи составляет 211-217 аминокислот. Предпочтительно легкая цепь представляет собой легкую каппа ( $\kappa$ )-цепь, а константный домен CL предпочтительно выводят из легкой каппа ( $\kappa$ )-цепи (константный домен C $\kappa$ )

Понятия «моноклональное антитело» или «композиция моноклонального антитела» в контексте настоящего описания относятся к препарату молекул антител одинакового аминокислотного состава.

«Антитела» согласно изобретению могут представлять собой антитела любого класса (например, IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, предпочтительно IgG или IgE) или подкласса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2, предпочтительно IgG1), при этом оба антитела, из которых выводят двухвалентное биспецифическое антитело, предлагаемое в изобретение, имеют Fc-область одного и того же подкласса (например, IgG1, IgG4 и т.п., предпочтительно IgG1), предпочтительно одного и того же аллотипа (например, кавказского).

Понятие «Fc-область (фрагмент) антитела» хорошо известно специалистам в данной области и ее определяют на основе расщепления антител папаином. Антитела, предлагаемые в изобретении, содержат в качестве Fc-области предпочтительно Fc-область, полученную из человеческого антитела, и предпочтительно все другие части человеческих константных областей. Fc-область антитела непосредственно участвует в активации комплемента, C1q-связывании, C3-активации и связывании Fc-рецептора. В то время как влияние антитела на систему комплемента зависит от определенных условий, связывание с C1q обусловлено определенными сайтами связывания в Fc-области. Указанные сайты связывания известны в данной области и описаны, например, у Lukas T.J. и др., J. Immunol. 127, 1981, сс.2555-2560; Brunhouse R. и Cebra J.J., Mol. Immunol. 16, 1979, сс.907-917; Burton D.R. и др., Nature 288, 1980, сс.338-344; Thommesen J.E. и др., Mol. Immunol. 37, 2000, сс.995-1004; Idusogie E.E. и др., J. Immunol. 164, 2000, сс.4178-4184; Hezareh M. и др., J. Virol. 75, 2001, сс.12161-12168; Morgan A. и др., Immunology 86, 1995, сс.319-324; и EP 0307434. Указанные сайты связывания представляют собой, например, L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 и P329 (нумерация дана согласно нумерации EU Кэбота, см. ниже). Антитела подклассов IgG1, IgG2 и IgG3, как правило, характеризуются способностью к активации комплемента, C1q-связыванию и C3-активации, в то время как IgG4 не активируют систему комплемента, не связываются с C1q и не активируют C3. Предпочтительно Fc-область представляет собой человеческую Fc-область.

Понятие «химерное антитело» относится к антителу, содержащему вариабельную область, т.е. связывающую область, полученную из одного источника или из одних и тех же видов, и по меньшей мере часть константной области, полученную из другого источника или других видов, и его, как правило, получают с использованием методов рекомбинантной ДНК. Предпочтительными являются химерные антитела, которые содержат мышиную вариабельную область и человеческую константную область. Другими предпочтительными формами «химерных антител», подпадающих под объем настоящего изобретения, являются антитела, константная область которых модифицирована или изменена по сравнению с исходным антителом с целью получения свойств, предлагаемых в изобретении, прежде всего касательно связывания C1q и/или связывания Fc-рецептора (FcR). Такие химерные антитела обозначают также как «антитела переключенного класса». Химерные антитела являются продуктом экспрессии генов иммуноглобулинов, содержащих сегменты ДНК, которые кодируют вариабельные области иммуноглобулинов, и сегменты ДНК, которые кодируют константные области иммуноглобулинов. Методы получения химерных антител включают обычные методы рекомбинантной ДНК и генной трансфекции, которые хорошо известны в данной области (см., например, Morrison S.L. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1984, сс.6851-6855; US 5202238 и US 5204244).



Понятие «гуманизированное антитело» относится к антителам, в которых каркасные или «гипервариабельные участки» (CDR) модифицированы так, что они содержат CDR иммуноглобулина другой специфичности по сравнению со специфичностью родительского иммуноглобулина. В предпочтительном варианте осуществления изобретения для получения «гуманизированного антитела» мышиный CDR трансплантируют в каркасный участок человеческого антитела (см., например, Riechmann L. и др., *Nature* 332, 1988, сс.323-327; и Neuberger M.S. и др., *Nature* 314, 1985, сс.268-270). Особенно предпочтительные CDR соответствуют CDR, которые представляют собой последовательности, распознающие антигены, указанные выше для химерных антител. Другими формами «гуманизированных антител», подпадающих под объем настоящего изобретения, являются антитела, константная область которых дополнительно модифицирована или изменена по сравнению с исходным антителом с целью получения свойств, предлагаемых в изобретении, прежде всего касательно связывания C1q и/или связывания Fc-рецептора (FcR).

Понятие «человеческое антитело» в контексте настоящего описания относится к антителам, переменные и константные области которых выведены из последовательностей иммуноглобулина человеческой зародышевой линии. Человеческие антитела хорошо известны в данной области (van Dijk M.A. и van de Winkel J.G., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5, 2001, сс.368-374). Человеческие антитела можно получать также в трансгенных животных (например, мышах), которые в результате иммунизации могут продуцировать полный спектр или определенную часть человеческих антител при отсутствии производства эндогенного иммуноглобулина. Перенос набора генов иммуноглобулинов человеческой зародышевой линии в такую мутантную зародышевую линию мышей должен приводить к производству человеческих антител после антигенной стимуляции (см., например, Jakobovits A., и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1993, сс.2551-2555; Jakobovits A. и др., *Nature* 362, 1993, сс.255-258; Bruggemann M. и др., *Year Immunol.* 7, 1993, сс.33-40). Человеческие антитела можно получать также с помощью фаговых дисплейных библиотек (Hoogenboom H.R. и Winter, G., *J. Mol. Biol.* 227, 1992, сс.381-388; Marks J.D. и др., *J. Mol. Biol.* 222, 1991, сс.581-597). Для получения человеческих моноклональных антител можно использовать также методы Cole с соавторами и Boerner с соавторами (Cole и др., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, под ред. Alan R. Liss, 1985, с.77; и Boerner P., и др., *J. Immunol.* 147, 1991, сс.86-95). Как уже было отмечено для химерных и гуманизированных антител, предлагаемых в изобретении, понятие «человеческое антитело» включает также такие антитела, константная область которых модифицирована с целью получения свойств, предлагаемых в изобретении, прежде всего касательно связывания C1q и/или связывания FcR, например, путем «переключения класса», т.е. замены или мутации Fc-областей (например, IgG1 на IgG4 и/или IgG1/IgG4-мутация).

Понятие «рекомбинантное человеческое антитело» в контексте настоящего описания относится ко всем человеческим антителам, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют с помощью методов рекомбинации, например, к антителам, выделенным из клетки-хозяина, такой как NSO- или CHO- клетка, или из животного (например, мыши), которое является трансгенным из-за присутствия человеческих генов иммуноглобулинов или антител, экспрессируемых с использованием рекомбинантного экспрессионного вектора, которым трансфектирована клетка-хозяин. Такие рекомбинантные человеческие антитела имеют переменную и константную области, которые находятся в преобразованной форме. Рекомбинантные человеческие антитела, предлагаемые в изобретении, подвергают соматической гипермутации *in vivo*. Таким

образом, аминокислотные последовательности VH- и VL-областей рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя и выведены из последовательностей VH и VL человеческой зародышевой линии и родственных им линий, могут не существовать в естественных условиях в спектре зародышевой линии человеческих антител *in vivo*.

Понятие «вариабельная область (домен)» (вариабельный домен легкой цепи (VL), вариабельная область тяжелой цепи (VH)) в контексте настоящего описания относится к областям каждой из пары легких и тяжелой цепей, которые участвуют непосредственно в связывании антитела с антигеном. Домены вариабельных человеческих легких и тяжелых цепей имеют одинаковую общую структуру, и каждый домен содержит четыре каркасных участка (FR), последовательности которых являются весьма консервативными, связанных тремя «гипервариабельными участками» (или определяющими комплементарность участками, CDR). Каркасные участки адаптированы к  $\beta$ -складчатой конформации, а CDR могут образовывать петли, соединяющие  $\beta$ -складчатую структуру. CDR в каждой цепи сохраняют их трехмерную структуру с помощью каркасных участков и образуют вместе с CDR из других цепей антигенсвязывающий центр. CDRS-участки тяжелой и легкой цепей антитела играют особенно важную роль в специфичности связывания/аффинности антител, предлагаемых в изобретении, и поэтому являются дополнительным объектом изобретения.

Понятия «гипервариабельный участок» или «антигенсвязывающий центр антитела» в контексте настоящего описания относятся к аминокислотным остаткам антитела, которые ответственны за связывания антигена. Гипервариабельный участок содержит аминокислотные остатки из «определяющих комплементарность участков» или «CDR». «Каркасные» или «РК»-участки представляют собой участки вариабельной области, отличные от указанных в настоящем описании остатков гипервариабельного участка. Таким образом, легкие и тяжелые цепи антитела содержат в направлении от N- к C-концу участки FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. CDR каждой цепи разделены аминокислотами указанного каркасного участка. В частности, CDR3 тяжелой цепи представляют собой участок, который вносит наибольший вклад в связывание с антигеном. CDR- и FR-участки определяют с помощью стандартной номенклатуры Кэбота (Kabat и др., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)).

«Константные области (домены)» тяжелой цепи и легкой цепи не принимают непосредственного участия в связывании антитела с антигеном, но обладают различными эффекторными функциями. В зависимости от аминокислотной последовательности константной области их тяжелых цепей антитела или иммуноглобулины подразделяют на указанные выше классы.

Понятие «двухвалентное биспецифическое антитело» в контексте настоящего описания относится к антителу, как оно описано выше, в котором каждая из двух пар, включающая тяжелую цепь и легкую цепь (HC/LC), специфически связывается с различным антигеном, т.е. первая тяжелая и первая легкая цепь (полученные из антитела к первому антигену) специфически связываются обе с первым антигеном, а вторая тяжелая и вторая легкая цепь (полученные из антитела ко второму антигену) специфически связываются обе со вторым антигеном (как показано на фиг.2); указанные двухвалентные биспецифические антитела обладают способностью специфически связываться одновременно с двумя различными антигенами и не более чем с двумя антигенами, в отличие, во-первых, от моноспецифического антитела, которое обладает способностью связываться только с одним антигеном, и, во-вторых, от

четырёхвалентного тетраспецифического антитела, которое обладает способностью связываться одновременно с четырьмя молекулами антигенов.

Согласно изобретению соотношение между требуемым двухвалентным биспецифическим антителом и нежелательными побочными продуктами можно

5 улучшать путем замены некоторых доменов только в одной паре, включающей тяжелую цепь и легкую цепь (НС/LC). Хотя первая из двух НС/LC-пар, полученная из антитела, которое специфически связывается с первым антигеном, остается практически не измененной, вторую из двух НС/LC-пар, полученную из антитела, которое специфически связывается со вторым антигеном, изменяют с помощью следующей замены:

10 легкая цепь: замена переменного домена VL легкой цепи на переменный домен VH тяжелой цепи указанного антитела, которое специфически связывается со вторым антигеном, и

тяжелая цепь: замена переменного домена VH тяжелой цепи на переменный домен VL легкой цепи указанного антитела, которое специфически связывается со

15 вторым антигеном.

Таким образом, образовавшиеся двухвалентные биспецифические антитела представляют собой искусственные антитела, которые содержат

а) легкую цепь и тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с первым антигеном; и

20 б) легкую цепь и тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося со вторым антигеном,

где указанная легкая цепь (антитела, специфически связывающегося со вторым антигеном) содержит переменный домен VH вместо VL, и где указанная тяжелая цепь (антитела, специфически связывающегося со вторым антигеном) содержит переменный

25 домен VL вместо VH.

Согласно еще одному объекту изобретения указанное улучшенное соотношение между требуемым двухвалентным биспецифическим антителом и нежелательными побочными продуктами можно дополнительно улучшать с помощью одного из

указанных ниже двух альтернативных подходов:

30 А) Первый альтернативный подход (см. фиг.3):

СНЗ-домены указанного двухвалентного биспецифического антитела, предлагаемого в изобретении, можно изменять с помощью технологии «knob-into-holes», которая описана подробно на нескольких примерах, например, в WO 96/027011, Ridgway J.B. и др., Protein Eng 9, 1996, сс.617-621; и у Merchant A.M. и др., Nat Biotechnol 16, 1998, сс.677-681. При использовании этого метода взаимодействующие поверхности двух СНЗ-

35 доменов изменяют с целью повышения гетеродимеризации обеих тяжелых цепей, содержащих эти два СНЗ-домена. Каждый из двух СНЗ-доменов (двух тяжелых цепей) может представлять собой «выступ», а другой представлять собой «впадину». Введение дисульфидного мостика стабилизирует гетеродимеры (Merchant A.M. и др., Nature Biotech 16, 1998, сс.677-681; Atwell S., Ridgway J.B., Wells J.A., Carter P., J Mol Biol 270, 1997, сс.26-

40 35) и повышает выход продукта.

Таким образом, согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения СНЗ-домены двухвалентного биспецифического антитела, в котором первый СНЗ-домен и второй СНЗ-домен каждый соприкасается друг с другом на поверхности

45 раздела, которая представляет собой исходную поверхность раздела между СНЗ-доменами антитела, изменяют с помощью технологии «knob-into-holes», включая дополнительную стабилизацию путем интродукции дисульфидного мостика в СНЗ-домены (как описано в WO 96/027011, Ridgway J.B. и др., Protein Eng 9, 1996, сс.617-621;

Merchant A.M и др., Nature Biotech 16, 1998, сс.677-681; и Atwell S, Ridgway J.B., Wells J.A., Carter P, J Mol Biol 270, 1997, сс.26-35) для активации формирования двухвалентного биспецифического антитела.

Таким образом, согласно одному из объектов изобретения двухвалентное биспецифическое антитело отличается тем, что СНЗ-домен одной тяжелой цепи и СНЗ-домен другой тяжелой цепи каждый соприкасается друг с другом на поверхности раздела, которая представляет собой исходную поверхность раздела между СНЗ-доменами антитела; при этом поверхность раздела изменяют для активации формирования двухвалентного биспецифического антитела, где изменение отличается тем, что:

а) изменяют СНЗ-домен одной тяжелой цепи так, что на исходной поверхности раздела СНЗ-домена одной тяжелой цепи, которая соприкасается с исходной поверхностью раздела СНЗ-домена второй тяжелой цепи в двухвалентном биспецифическом антителе, аминокислотный остаток заменяют на аминокислотный остаток, который имеет большую по объему боковую цепь, создавая тем самым выпуклость на поверхности раздела СНЗ-домена одной тяжелой цепи, которая может помещаться в полость на поверхности раздела СНЗ-домена другой тяжелой цепи, и

б) изменяют СНЗ-домен другой тяжелой цепи так, что на исходной поверхности раздела второго СНЗ-домена, которая соприкасается с исходной поверхностью раздела первого СНЗ-домена в двухвалентном биспецифическом антителе, аминокислотный остаток заменяют на аминокислотный остаток, который имеет меньшую по объему боковую цепь, создавая тем самым полость на поверхности раздела второго СНЗ-домена, в которую может помещаться выпуклость на поверхности раздела первого СНЗ-домена.

Предпочтительно указанный аминокислотный остаток, который имеет большую по объему боковую цепь, выбирают из группы, включающей аргинин (R), фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W).

Предпочтительно указанный аминокислотный остаток, который имеет меньшую по объему боковую цепь, выбирают из группы, включающей аланин (A), серин (S), треонин (T), валин (V).

Согласно одному из объектов изобретения оба СНЗ-домена дополнительно изменяют путем интродукции цистеина (C) в качестве аминокислоты в соответствующих положениях каждого СНЗ-домена так, чтобы мог образоваться дисульфидный мостик между обоими СНЗ-доменами.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения оба СНЗ-домена изменяют, используя остатки R409D; K370E (K409D) в качестве образующих «выступ» остатков и D399K; E357K в качестве образующих «впадину» остатков, как описано, например, в EP 1870459A1.

Или

Б) Второй альтернативный подход (см. фиг.4):

Этот подход предусматривает замену СНЗ-домена константной области одной тяжелой цепи на СН1-домен константной области тяжелой цепи; и замену СНЗ-домена константной области другой тяжелой цепи на CL-домен константной области легкой цепи. СН1-домен константной области тяжелой цепи, на который заменяют СНЗ-домен тяжелой цепи, может представлять собой домен любого Ig-класса (например, IgA, IgD, IgE, IgG и IgM) или подкласса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2).

CL-домен константной области легкой цепи, на который заменяют СНЗ-домен тяжелой цепи, может быть лямбда- ( $\lambda$ ) или каппа- ( $\kappa$ ) типа, предпочтительно каппа- ( $\kappa$ )

типа.

Таким образом, одним из предпочтительных вариантов осуществления изобретения является двухвалентное биспецифическое антитело, которое содержит:

- а) легкую цепь и тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с первым антигеном; и
- б) легкую цепь и тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося со вторым антигеном, в котором переменные домены VL и VH заменены друг на друга, и необязательно
- в) СН3-домен одной тяжелой цепи и СН3-домен другой тяжелой цепи, каждый из которых соприкасается друг с другом на поверхности раздела, которая представляет собой исходную поверхность раздела между СН3-доменами антитела; при этом поверхность раздела изменяют для активации формирования двухвалентного биспецифического антитела, где изменение отличается тем, что:
  - ва) изменяют СН3-домен одной тяжелой цепи так, что на исходной поверхности раздела СН3-домена одной тяжелой цепи, которая соприкасается с исходной поверхностью раздела СН3-домена второй тяжелой цепи в двухвалентном биспецифическом антителе, аминокислотный остаток заменяют на аминокислотный остаток, который имеет большую по объему боковую цепь, создавая тем самым выпуклость на поверхности раздела СН3-домена одной тяжелой цепи, которая может помещаться в полость на поверхности раздела СН3-домена другой тяжелой цепи, и
  - вб) изменяют СН3-домен другой тяжелой цепи так, что на исходной поверхности раздела второго СН3-домена, которая соприкасается с исходной поверхностью раздела первого СН3-домена в двухвалентном биспецифическом антителе, аминокислотный остаток заменяют на аминокислотный остаток, который имеет меньшую по объему боковую цепь, создавая тем самым полость на поверхности раздела второго СН3-домена, в которую может помещаться выпуклость на поверхности раздела первого СН3-домена; или
  - г) СН3-домен константной области одной тяжелой цепи заменяют на СН1-домен константной области тяжелой цепи; и СН3-домен константной области другой тяжелой цепи заменяют на СL-домен константной области легкой цепи.

Понятия «антиген» или «молекула антигена» в контексте настоящего описания применяют взаимозаменяемо, и они относятся ко всем молекулам, которые могут специфически связываться антителом. Двухвалентное биспецифическое антитело специфически связывается с первым антигеном и вторым отличным от первого антигеном. Понятие «антигены» в контексте настоящего описания включают, например, белки, различные эпитопы белков (в качестве различных антигенов согласно изобретению) и полисахариды. Они главным образом включают части (покрытия, капсулы, клеточные оболочки, жгутики, фимбри и токсины) бактерий, вирусов и других микроорганизмов. Липиды и нуклеиновые кислоты являются антигенами только при их объединении с белками и полисахаридами. Не относящиеся к микробам экзогенные (чужеродные) антигены могут включать пыльцу, белок яиц и белки из трансплантированных тканей или органов или антигены, находящиеся на поверхности трансфузируемых кровяных клеток. Предпочтительно антиген выбирают из группы, включающей цитокины, белки клеточной поверхности, ферменты и рецепторы цитокинов, белков клеточной поверхности, ферментов и другие рецепторы.

Опухолевые антигены представляют собой антигены, которые презентуются

молекулами ГКГ I или ГКГ II на поверхности опухолевых клеток. Иногда эти антигены презентуются опухолевыми клетками и никогда здоровыми клетками. В этом случае их называют специфическими для опухоли антигенами (TSA), и они, как правило, являются результатом специфической для опухоли мутации. Более распространенными являются антигены, которые презентуются опухолевыми клетками и здоровыми клетками, и их называют ассоциированными с опухолью антигенами (ТАА). Цитотоксические Т-лимфоциты, которые распознают эти антигены, могут обладать способностью разрушать опухолевые клетки до их пролиферации или метастазирования. Опухолевые антигены могут находиться также на поверхности опухоли в форме, измененного в результате мутации рецептора, в этом случае они должны распознаваться В-клетками.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения по меньшей мере один из двух различных антигенов (первый и второй антиген), с которым двухвалентное биспецифическое антитело специфически связывается, представляет собой опухолевый антиген.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения оба различных антигена (первый и второй антиген), с которыми двухвалентное биспецифическое антитело специфически связывается, представляют собой опухолевые антигены; в этом случае первый и второй антиген могут представлять собой также два различных эпитопа одного и того же специфического для опухоли белка.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения по меньшей мере один из двух различных антигенов (первый и второй антиген), с которым двухвалентное биспецифическое антитело специфически связывается, представляет собой опухолевый антиген, а другой представляет собой антиген эффекторной клетки, такой, например, как Т-клеточный рецептор, CD3, CD16 и т.п.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения по меньшей мере один из двух различных антигенов (первый и второй антиген), с которым двухвалентное биспецифическое антитело специфически связывается, представляет собой опухолевый антиген, а другой представляет собой противораковую субстанцию, такую как токсин или ингибитор киназы.

В контексте настоящего описания понятие «специфически связывается» или «связывается специфически с» относится к антителу, специфически связывающемуся с антигеном. Предпочтительно аффинность к связыванию антитела, специфически связывающегося с указанным антигеном, характеризуется значением  $KD 10^{-9}$  молей/л или ниже (например,  $10^{-10}$  молей/л), предпочтительно значением  $KD 10^{-10}$  молей/л или ниже (например,  $10^{-12}$  молей/л). Аффинность к связыванию определяют с помощью стандартного анализа связывания, такого как поверхностный плазменный резонанс (Biacore®).

Понятие «эпитоп» включает любую полипептидную детерминанту, обладающую способностью специфически связываться с антителом. В некоторых вариантах осуществления изобретения эпитопная детерминанта включает химически активные поверхностные группы молекул, такие как аминокислоты, боковые цепи Сахаров, фосфорил или сульфонил, и в некоторых вариантах осуществления изобретения могут иметь специфические трехмерные структурные характеристики и/или специфические характеристики заряда. Эпитоп представляет собой область антигена, которая связывается антителом. В некоторых вариантах осуществления изобретения считается, что антитело специфически связывается с антигеном, когда оно преимущественно

распознает его антиген-мишень в сложной смеси белков и/или макромолекул.

Еще одним вариантом осуществления изобретения является способ получения двухвалентного биспецифического антитела, предлагаемого в изобретении, заключающийся в том, что

- 5 а) трансформируют клетку-хозяина
- векторами, которые содержат молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие легкую цепь и тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с первым антигеном,
  - векторами, которые содержат молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие легкую цепь и тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося со вторым антигеном,
- 10 в котором вариабельные домены VL и VH заменены друг на друга;
- б) культивируют клетку-хозяина в условиях, которые позволяют синтезировать указанную молекулу антитела; и
- в) выделяют молекулу антитела из культуры.

В целом, применяют два вектора, кодирующих легкую цепь и тяжелую цепь антитела, 15 которое специфически связывается с первым антигеном, и еще два вектора, кодирующих легкую цепь и тяжелую цепь антитела, которое специфически связывается со вторым антигеном. Один из двух векторов кодирует соответствующую легкую цепь, а другой из двух векторов кодирует соответствующую тяжелую цепь. Однако в альтернативном варианте способа получения двухвалентного биспецифического антитела, предлагаемого 20 в изобретении, можно применять для трансформации клетки-хозяина только один первый вектор, кодирующий легкую цепь и тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с первым антигеном, и только один второй вектор, кодирующий легкую цепь и тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося со вторым антигеном.

25 Изобретение относится также к способу получения антител, заключающемуся в том, что культивируют соответствующие клетки-хозяева в условиях, которые позволяют синтезировать молекулы антител, и выделяют антитела из культуры, например, предусматривающему экспрессию

- первой нуклеотидной последовательности, которая кодирует легкую цепь антитела, 30 специфически связывающегося с первым антигеном,
- второй нуклеотидной последовательности, которая кодирует тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с первым антигеном,
- третьей нуклеотидной последовательности, которая кодирует легкую цепь антитела, специфически связывающегося со вторым антигеном, в котором вариабельный домен 35 VL легкой цепи заменен на вариабельный домен VH тяжелой цепи, и
- четвертой нуклеотидной последовательности, которая кодирует тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося со вторым антигеном, в котором вариабельный домен VH тяжелой цепи заменен на вариабельный домен VL легкой цепи.

Еще одним вариантом осуществления изобретения является клетка-хозяин, 40 содержащая

- векторы, которые содержат молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие легкую цепь и тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с первым антигеном,
- векторы, которые содержат молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие легкую цепь и тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося со вторым антигеном, 45 в котором вариабельные домены VL и VH заменены друг на друга.

Еще одним вариантом осуществления изобретения является клетка-хозяин, которая содержит

- а) вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует легкую

цепь, и вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с первым антигеном,

б) вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует легкую цепь, и вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует тяжелую цепь, антитела специфически связывающегося со вторым антигеном, в котором 5  
вариабельные домены VL и VH заменены друг на друга.

Еще одним вариантом осуществления изобретения является композиция, предпочтительно фармацевтическая или диагностическая композиция двухвалентного биспецифического антитела, предлагаемого в изобретении.

10 Еще одним вариантом осуществления изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая двухвалентное биспецифическое антитело, предлагаемое в изобретении, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент.

Еще одним вариантом осуществления изобретения является способ лечения пациента, который нуждается в терапии, отличающийся тем, что вводят пациенту в терапевтически 15  
эффективном количестве двухвалентное биспецифическое антитело, предлагаемое в изобретении.

Понятие «нуклеиновая кислота или молекула нуклеиновой кислоты» в контексте настоящего описания относится к молекулам ДНК и молекулам РНК. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двухцепочечной, но 20  
предпочтительно представляет собой двухцепочечную ДНК.

В контексте настоящего описания понятия «клетка», «клеточная линия» и «клеточная культура» используются взаимозаменяемо, и все такие определения включают потомство. Так, понятия «трансформанты» и «трансформированные клетки» относятся к первичной рассматриваемой клетке и полученным из нее культурам безотносительно 25  
к количеству переносов. Следует понимать также, что все потомство может не быть полностью идентичным по составу ДНК из-за преднамеренных или случайных мутаций. Под объем изобретения подпадает вариант потомства, имеющего такую же функцию или биологическую активность, которая обнаружена у исходной трансформированной клетки. Если используются другие определения, то это будет очевидно из контекста.

30 Понятие «трансформация» в контексте настоящего описания относится к процессу переноса вектора/нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина. Если в качестве клеток-хозяев применяют клетки без труднопреодолимых барьеров клеточных оболочек, то трансфекцию осуществляют, например, с помощью метода осаждения фосфатом кальция, который описан у Graham и Van der Eh, Virology 52, 1978, сс.546 и далее. Однако можно 35  
применять также другие методы интродукции ДНК в клетки, такие как инъекция ядер или слияние протопластов. Если применяют прокариотические клетки или клетки, которые содержат выраженные конструкции клеточных оболочек, можно применять, например, метод трансфекции, основанной на обработке кальцием, с использованием хлорида кальция, который описан у Cohen F. N, и др., PNAS. 69, 1972, сс.7110 и далее.

40 Рекомбинантное получение антител с помощью трансформации хорошо известно в данной области и описано, например, в обзорных статьях Makrides S.C., Protein Expr. Purif. 17, 1999, сс.183-202; Geisse S. и др., Protein Expr. Purif. 8, 1996, сс.271-282; Kaufman R.J., Mol. Biotechnol. 16, 2000, сс.151-161; Werner R.G. и др., Arzneimittelforschung 48, 1998, сс.870-880, а также в US 6331415 и US 4816567.

45 В контексте настоящего описания понятие «экспрессия» относится к процессу, при котором нуклеиновая кислота транскрибируется в мРНК, и/или к процессу, при котором транскрибируемая мРНК (которую обозначают также как транскрипт) затем может транслироваться в пептиды, полипептиды или белки. И транскрипты, и кодируемые



полипептиды обозначают в целом как генный продукт. Если полинуклеотид выводят из геномной ДНК, то экспрессия в эукариотической клетке может включать сплайсинг мРНК.

«Вектор» представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, в частности самореплицирующуюся, которая переносит встроенную молекулу нуклеиновой кислоты в клетки-хозяева и/или между клетками-хозяевами. Понятие включает векторы, функция которых прежде всего состоит во встраивании ДНК или РНК в клетку (например, хромосомная интеграция), в репликационные векторы, функция которых прежде всего состоит в репликации ДНК или РНК, и в экспрессионные векторы, функция которых прежде всего состоит в транскрипции и/или трансляции ДНК или РНК. Под понятие подпадают также векторы, которые обладают несколькими указанными функциями.

«Экспрессионный вектор» представляет собой полинуклеотид, который при интродукции в соответствующую клетку-хозяина может транскрибироваться и транслироваться в полипептид. Понятие «экспрессионная система», как правило, относится к приемлемой клетке-хозяину, содержащей экспрессионный вектор, функцией которой может быть выход требуемого продукта экспрессии.

Двухвалентные биспецифические антитела, предлагаемые в изобретении, предпочтительно получают методами рекомбинации. Указанные методы хорошо известны в данной области и предусматривают экспрессию белка в прокариотических и эукариотических клетках с последующим выделением полипептида антитела и, как правило, очисткой до фармацевтически приемлемой чистоты. Для экспрессии белка нуклеиновые кислоты, кодирующие легкие и тяжелые цепи или их фрагменты, встраивают в экспрессионные векторы с помощью стандартных методов. Экспрессию осуществляют в приемлемых прокариотических или эукариотических клетках-хозяевах типа СНО-клеток, NS0-клеток, SP2/0-клеток, НЕК293-клеток, COS-клеток, дрожжей или клеток *E.coli*, и антитело выделяют из клеток (из супернатанта или клеток после лизиса). Двухвалентные биспецифические антитела могут присутствовать в целых клетках, в клеточном лизате или в частично очищенной или практически очищенной форме. Очистку осуществляют для удаления других клеточных компонентов или других загрязнителей, например, других клеточных нуклеиновых кислот или белков, стандартными методами, которые включают обработку щелочью/ДСН, хроматографию на колонках и другие методы, хорошо известные в данной области (см. в *Current Protocols in Molecular Biology*, под ред. Ausubel F., и др., изд-во Greene Publishing and Wiley Interscience, New York, 1987).

Экспрессия в NS0-клетках описана, например, у Barnes L.M. и др., *Cytotechnology* 32, 2000, сс.109-123; и Barnes L.M. и др., *Biotech. Bioeng.* 73, 2001, сс.261-270. Кратковременная экспрессия описана, например, у Durocher Y. и др., *Nucl. Acids. Res.* 30, 2002, с. E9. Клонирование переменных областей описано у Orlandi R. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1989, сс.3833-3837; Carter P. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1992, сс.4285-4289; и Norderhaug L. и др., *J. Immunol. Methods* 204, 1997, сс.77-87. Предпочтительная система кратковременной экспрессии (НЕК 293) описана у Schlaeger E.-J. и Christensen K., в *Cytotechnology* 30, 1999, сс.71-83 и у Schlaeger E.-J. в *J. Immunol. Methods* 194, 1996, сс.191-199.

Контролирующие последовательности, которые можно применять для прокариот, представляют собой, например, промотор, необязательно последовательность оператора и сайт связывания рибосом. Известно, что эукариотические клетки могут использовать промоторы, энхансеры и сигналы полиаденилирования.

Нуклеиновая кислота «функционально связана», когда она помещена под

функциональный контроль другой нуклеотидной последовательности. Например, ДНК предпоследовательности или лидера секрети функционально связана с ДНК, кодирующей полипептид, если она экспрессируется в виде предбелка, который участвует в секрети полипептида; промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью, если он оказывает воздействие на транскрипцию последовательности; или сайт связывания рибосом функционально связан с кодирующей последовательностью, если он помещен так, чтобы он облегчал трансляцию. Как правило, «функционально связаны» означает, что последовательности ДНК, будучи связаны, являются смежными, а в случае лидера секрети, смежными в рамке считывания. Однако не требуется, чтобы энхансеры были смежными. Связывание осуществляют путем лигирования в пригодных сайтах рестрикции. Если такие сайты не существуют, то согласно общепринятой практике используют синтетические олигонуклеотидные адаптеры или линкеры.

Двухвалентные биспецифические антитела можно отделять от культуральной среды с помощью общепринятых методов очистки иммуноглобулинов, таких, например, как хроматография на протеин А-сепарозе, хроматография на гидроксилатапате, геле-электрофорез, диализ или аффинная хроматография. ДНК или РНК, которые кодируют моноклональные антитела, легко выделять и секвенировать с помощью общепринятых методов. Источником таких ДНК и РНК могут служить клетки гибридом. После выделения ДНК можно встраивать в экспрессионные векторы, которыми затем трансфектируют клетки-хозяева, такие как клетки НЕК 293, СНО-клетки или клетки миеломы, которые иначе не могут продуцировать белок иммуноглобулина, для синтеза рекомбинантных моноклональных антител в клетках-хозяевах.

Варианты аминокислотной последовательности (или мутанты) двухвалентного биспецифического антитела получают путем интродукции соответствующих нуклеотидных замен в ДНК антитела или путем синтеза нуклеотидов. Однако такие модификации можно осуществлять только в очень ограниченном диапазоне, например, как описано выше. Например, модификации не должны изменять вышеуказанные характеристики антитела, такие как изотип IgG и связывание с антигеном, но могут повышать выход продукта рекомбинации, стабильность белка или облегчать очистку.

Следующие примеры, перечень последовательностей и чертежи даны с целью лучшего понимания настоящего изобретения, полный объем которого представлен в приведенной ниже формуле изобретения. Очевидно, что могут быть сделаны модификации в изложенных процедурах без отклонения от сути изобретения.

Перечень последовательностей

SEQ ID NO:1 аминокислотная последовательность тяжелой цепи антитела <IGF-1R> дикого типа.

SEQ ID NO:2 аминокислотная последовательность легкой цепи антитела <IGF-1R> дикого типа.

SEQ ID NO:3 аминокислотная последовательность тяжелой цепи \*\*\* (HC\*\*\*) антитела <IGF-1R>, несущего замену VL-VH, в котором VH-домен тяжелой цепи заменен на VL-домен легкой цепи - вариант А.

SEQ ID NO:4 аминокислотная последовательность легкой цепи \*\*\* (LC\*\*\*) антитела <IGF-1R>, несущего замену VL-VH, в котором VL-домен легкой цепи заменен на VH-домен тяжелой цепи - вариант А.

SEQ ID NO:5 аминокислотная последовательность эктодомена (ECD) IGF-1R, несущего метку, которая представляет собой His-стрептавидин-связывающий пептид (ECD IGF-1R-His-SBP).

SEQ ID NO:6 аминокислотная последовательность тяжелой цепи антитела к ангиопоэтину-2 <ANGPT2> дикого типа.

SEQ ID NO:7 аминокислотная последовательность легкой цепи антитела к ангиопоэтину-2 <ANGPT2> дикого типа.

5 SEQ ID NO:8 аминокислотная последовательность СН3-домена («выступы») с заменой T366W для применения в технологии «knobs-into-holes».

SEQ ID NO:9 аминокислотная последовательность СН3-домена («впадина») с заменой T366S, L368A, Y407V для применения в технологии «knobs-into-holes».

10 SEQ ID NO:10 аминокислотная последовательность тяжелой цепи \*\*\* (НС\*\*\*) антитела <IGF-1R>, несущего замену VL-VH, в котором VH- домен тяжелой цепи заменен на VL-домен легкой цепи - вариант Б.

SEQ ID NO:11 аминокислотная последовательность легкой цепи \*\*\* (LC\*\*\*) антитела <IGF-1R>, несущего замену VL-VH, в котором VL- домен легкой цепи заменена на VH- домен тяжелой цепи - вариант Б.

15 SEQ ID NO:12 аминокислотная последовательность эктодомена IGF-1R, несущего метку, которая представляет собой His-стрептавидин-связывающий пептид (ECD IGF-1R-His-SBP).

Описание чертежей

На чертежах показано:

20 на фиг.1 - схематическое изображение встречающегося в естественных условиях полного антитела типа IgG, специфического в отношении одного антигена, с двумя парами тяжелых и легких цепей, каждая из которых содержит расположенные в общепринятом порядке переменные и константные домены;

на фиг.2 - схематическое изображение двухвалентного биспецифического антитела, содержащего: а) легкую цепь и тяжелую цепь антитела, которое специфически связывается с первым антигеном; и б) легкую цепь и тяжелую цепь антитела, которое специфически связывается со вторым антигеном, в котором переменные домены VL и VH заменены друг на друга;

на фиг.3 - схематическое изображение двухвалентного биспецифического антитела, содержащего: а) легкую цепь и тяжелую цепь антитела, которое специфически связывается с первым антигеном; и б) легкую цепь и тяжелую цепь антитела, которое специфически связывается со вторым антигеном, в котором переменные домены VL и VH заменены друг на друга и в котором СН3-домены обеих тяжелых цепей изменены с помощью технологии «knobs-into-holes»;

35 на фиг.4 - схематическое изображение двухвалентного биспецифического антитела, содержащего: а) легкую цепь и тяжелую цепь антитела, которое специфически связывается с первым антигеном; и б) легкую цепь и тяжелую цепь антитела, которое специфически связывается со вторым антигеном, в котором переменные домены VL и VH заменены друг на друга и в котором один из СН3-доменов константной области 40 обеих тяжелых цепей заменен на СН1-домен константной области тяжелой цепи; а другой СН3-домен константной области тяжелой цепи заменен на CL-домен константной области легкой цепи;

на фиг.5 - схематическое изображение белковой последовательности тяжелой цепи \*\*\*<IGF-1R> НС\*\*\* антитела <IGF-1R>, несущего замену VL-VH;

45 на фиг.6 - схематическое изображение белковой последовательности легкой цепи \*\*\* <IGF-1R> LC\*\*\* антитела <IGF-1R>, несущего замену VL-VH (с CL-доменом константной области легкой каппа-цепи);

на фиг.7 - плазмидная карта экспрессионного вектора pUC-НС\*\*\*-IGF-1R тяжелой

цепи \*\*\* <IGF-1R> HC\*\*\*;

на фиг.8 - плазмидная карта экспрессионного вектора pUC-LC\*\*\*-IGF-1R легкой цепи \*\*\* <IGF-1R> LC\*\*\*;

на фиг.9 - плазмидная карта экспрессионного вектора 4700-Hyg-Orig;

5 на фиг.10 - принцип осуществления клеточного FACS-анализа, позволяющего выявлять образование мостиковой связи типа IGF-1R-ANGPT2 с использованием клеток линии I24, экспрессирующих IGF-1R, с целью выявления присутствия функционального биспецифического антитела <ANGPT2-IGF-1R>, несущего замену VL-VH;

на фиг.11 - схематическое изображение принципа осуществления Viacore-анализа с использованием ECD IGF-1R;

на фиг.12 - результаты, полученные с помощью ДСН-ПААГ и гель фильтрации, для очищенного моноспецифического двухвалентного антитела <IGF-1R>, несущего замену VL-VH (IgG1\*), у которого HC\* и LC\* выделены из супернатантов клеточных культур после кратковременной трансфекции клеток линии HEK293-F;

15 на фиг.13 - данные о связывании моноспецифического антитела <IGF-1R>, несущего замену VL-VH, и антитела дикого типа <IGF-1R> с ECD IGF-1R, полученные на основе оценки связывания с помощью ELISA;

на фиг.14 - результаты, полученные с помощью ДСН-ПААГ, для смеси, которая содержит антитело <ANGPT2-IGF-1R>, несущее замену VL-VH, очищенной из супернатантов клеточных культур после кратковременной трансфекции клеток линии HEK293-F;

на фиг.15 - результаты, полученные для образцов А-Е, с помощью FACS-анализа, позволяющего выявлять образование мостиковой связи типа IGF-1R-ANGPT2 с использованием клеток линии I24, экспрессирующих IGF-1R, с целью выявления присутствия функционального биспецифического антитела <ANGPT2-IGF-1R>, несущего замену VL-VH, в очищенной смеси антител.

Очищенные белки образцов А-Е:

А = клетки линии I24, необработанные,

Б = I24+2 мкг/мл hANGPT2 + изотип hIgG,

30 Г = I24+2 мкг/мл hANGPT2 + смесь, полученная в результате совместной экспрессии антитела <IGF-1R>, несущего замену VL-VH, и антитела <ANGPT2> дикого типа, содержащая биспецифическое антитело <ANGPT2-IGF-1R>, несущее замену VL-VH,

Д = I24+2 мкг/мл hANGPT2 + антитело <ANGPT2> дикого типа,

Е = I24+2 мкг/мл hANGPT2 + антитело <IGF-1R> дикого типа.

35 Примеры

Материалы и общие методы

Общая информация, касающаяся нуклеотидных последовательностей легких и тяжелых цепей человеческого иммуноглобулина, представлена у: Kabat E.A. и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991. Аминокислоты цепей антител пронумерованы согласно нумерации EU (Edelman G.M. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63, 1969, ee. 78-85; Kabat E.A. и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991).

Методы рекомбинантной ДНК

45 Для манипуляций с ДНК использовали стандартные методы, описанные у Sambrook J. и др., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Реагенты для молекулярной биологии использовали согласно инструкциям производителей.

## Синтез генов

Требуемые сегменты генов получали из олигонуклеотидов, созданных путем химического синтеза. Генные сегменты длиной 600-1800 т.п.н., которые фланкированы уникальными сайтами рестрикции, собирали путем отжига и лигирования олигонуклеотидов, включая ПЦР-амплификацию и последующее клонирование через указанные сайты рестрикции, например, KpnI/SacI или AscI/PacI в клонирующем векторе pGA4, основой которого является плазмида pPCRScript (фирма Stratagene). Последовательности ДНК субклонированных генных фрагментов подтверждали путем секвенирования ДНК. Синтез генных фрагментов осуществляли в порядке, представленном в спецификации фирмы Geneart (Регенсбург, Германия).

### Определение последовательностей ДНК

Последовательности ДНК определяли путем секвенирования двух цепей на фирме MediGenomix GmbH (Мартинсрид, Германия) или фирме Sequiserve GmbH (Фатерштеттен, Германия).

Анализ последовательностей ДНК и белков и обработка данных о последовательностях

Применяли пакет программ фирмы GCG (Genetics Computer Group, Мэдисон, шт. Висконсин), версия 10.2 и Infomax's Vector NT1 Advance suite, версия 8.0 для создания, картирования, анализа, аннотирования и иллюстрации последовательностей.

Экспрессионные векторы

Для экспрессии описанных антител применяли варианты экспрессионных плазмид, предназначенных для кратковременной экспрессии (например, в клетках HEK293 EBNA или HEK293-F), либо на основе кДНК-конструкции с использованием промотора CMV-интрона А, либо на основе геномной конструкции с использованием промотора CMV.

Помимо кассеты экспрессии антитела векторы содержали:

- сайт инициации репликации, обеспечивающий репликацию указанной плазмиды в E.coli, и

- ген  $\beta$ -лактамазы, который придает устойчивость в E.coli к ампициллину.

Транскрипционная единица гена антитела состояла из следующих элементов:

- уникальный(ые) сайт(ы) рестрикции на 5'-конце,
  - немедленно-ранний энхансер и промотор из человеческого цитомегаловируса,
  - расположенная за ним последовательность интрона А в случае экспрессии на основе кДНК-конструкции,
  - 5'-нетранслируемая область гена человеческого антитела,
  - сигнальная последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина,
  - цепь человеческого антитела (дикого типа или с заменой доменов) либо в виде кДНК-конструкции, либо в виде геномной конструкции с экзон-интронной конструкцией иммуноглобулина,
  - 3'-нетранслируемая область с сигнальной последовательностью полиаденилирования
- и
- уникальный(ые) сайт(ы) рестрикции на 3'-конце.

Слияние генов, содержащих описанные цепи антитела, как указано ниже, осуществляли с помощью ПЦР и/или синтеза и сборки генов с использованием известных методов и процедур рекомбинации путем соединения соответствующих сегментов нуклеиновых кислот, например, с использованием уникальных сайтов рестрикции в соответствующих векторах. Субклонированные нуклеотидные последовательности подтверждали секвенированием ДНК. Для кратковременных трансфекций создавали большие количества плазмид посредством получения плазмид из трансформированных

культур *E.coli* (набор Nucleobond AX, фирма Macherey-Nagel).

#### Методики культивирования клеток

Применяли стандартные методики культивирования клеток, описанные в *Current Protocols in Cell Biology*, под ред. Bonifacino J.S., Dasso M., Harford J.B., Lippincott-Schwartz J. и Yamada K.M., изд-во John Wiley & Sons, Inc., 2000. Биспецифические антитела экспрессировали путем кратковременной котрансфекции соответствующими экспрессионными плазмидами выращенных в виде прикрепленных культур клеток НЕК293-EBNA или выращенных в виде суспензионных культур клеток НЕК29-F, как будет описано ниже.

#### 10 Кратковременные трансфекции в системе НЕК293-EBNA

Биспецифические антитела экспрессировали путем кратковременной котрансфекции соответствующими экспрессионными плазмидами (например, кодирующими тяжелую цепь и модифицированную тяжелую цепь, а также соответствующую легкую цепь и модифицированную легкую цепь) выращенных в виде прикрепленных культур клеток 15 НЕК293-EBNA (линия клеток почки человеческого эмбриона 293, экспрессирующая ядерный антиген вируса Эпштейна-Барра; Американская коллекция типовых культур, депонирована под номером ATCC № CRL-10852, партия 959 218), которые культивировали в среде DMEM (модифицированная по методу Дульбекко среда Игла, фирма Gibco), дополненной 10% FCS (фетальная телячья сыворотка, фирма Gibco) с 20 ультра низким содержанием IgG (Ultra Low IgG FCS), 2 мМ L-глутамином (фирма Gibco) и 250 мкг/мл генетицина (фирма Gibco). Для трансфекции применяли реагент для трансфекции типа FuGENE™ 6 (фирма Roche Molecular Biochemicals), используя соотношение реагента FuGENE™ (мкл) и ДНК (мкг) 4:1 (диапазон от 3:1 до 6:1). Белки экспрессировали, применяя соответствующие плазмиды, с использованием молярного 25 соотношения плазмид, кодирующих (модифицированные и дикого типа) легкую цепь и тяжелую цепь, 1:1 (эквимоларное соотношение), в диапазоне от 1:2 до 2:1 соответственно. Клетки подпитывали в день 3 L-глутамином до концентрации 4 мМ, глюкозой (фирма Sigma) и NAA (амид никотиновой кислоты) (фирма Gibco). Собирали супернатанты клеточных культур, содержащие биспецифическое антитело, в дни с 5 30 по 11 после трансфекции путем центрифугирования и хранили при -20°C. Общую информацию, касающуюся рекомбинантной экспрессии человеческих иммуноглобулинов, например, в НЕК293-клетках, см. у Meissner P. и др., *Biotechnol. Bioeng.* 75, 2001, сс.197-203.

#### Кратковременные трансфекции в системе НЕК293-F

Биспецифические антитела получали путем кратковременной трансфекции 35 соответствующими плазмидами (например, кодирующими тяжелую цепь и модифицированную тяжелую цепь, а также соответствующую легкую цепь и модифицированную легкую цепь), используя систему НЕК293-F (фирма Invitrogen) согласно инструкции производителя. В целом, метод состоял в следующем: НЕК293-F- 40 клетки (фирма Invitrogen), выращенные в виде суспензионной культуры либо во встряхиваемой колбе, либо в ферментере с мешалкой в бессывороточной среде для экспрессии типа FreeStyle 293 (фирма Invitrogen), трансфектировали смесью четырех экспрессионных плазмид и 293-фектином или фектином (фирма Invitrogen). В 2-литровую встряхиваемую колбу (фирма Corning) высевали клетки НЕК293-F с плотностью  $1,0 \times 10^6$  45 клеток/мл в 600 мл и инкубировали при 120 об/мин, 8% CO<sub>2</sub>. Через 1 день клетки трансфектировали при плотности клеток примерно  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл с помощью примерно 42 мл смеси А), содержащей 20 мл Opti-MEM (фирма Invitrogen) с 600 мкг

общей плазмидной ДНК (1 мкг/мл), которая кодирует тяжелую цепь или модифицированную тяжелую цепь соответственно и соответствующую легкую цепь, в эквимольном соотношении, и смеси Б), содержащей 20 мл Opti-MEM+1,2 мл 293-фектина или фектина (2 мкл/мл). В зависимости от поглощения глюкозы в процессе ферментации добавляли раствор глюкозы. Через 5-10 дней собирали супернатант, содержащий секретированное антитело, и либо из супернатанта непосредственно очищали антитела, либо супернатант замораживали и хранили.

#### Определение белка

Концентрацию белков очищенных антител и их производных определяли на основе оптической плотности (ОП) при 280 нм, используя коэффициент молярной экстинкции, рассчитанный на основе аминокислотной последовательности согласно методу, который описан у Pace и др., Protein Science, 1995, 4, сс.2411-1423.

#### Определение концентрации антител в супернатантах

Концентрацию антител и их производных в супернатантах клеточных культур определяли путем иммунопреципитации с белок А-агарозными гранулами (фирма Roche). 60 мкл белок А-агарозных гранул отмывали трижды в TBS-NP40 (50 мМ Трис, рН 7,5, 150 мМ NaCl, 1% Nonidet-P40). Затем 1-15 мл супернатанта клеточной культуры наносили на белок А-агарозные гранулы, предварительно уравновешенные в TBS-NP40. После инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре гранулы отмывали на фильтрующей колонке типа Ultrafree-MC (фирма Amicon), используя однократно 0,5 мл TBS-NP40, дважды 0,5 мл двукратного (2×) забуференного фосфатом физиологического раствора (2×3ФР, фирма Roche) и быстро четыре раза 0,5 мл 100 мМ Na-цитратным буфером, рН 5,0. Связанное антитело элюировали, добавляя 35 мкл буфера для образцов NuPAGE® LDS (фирма Invitrogen). Половину образца объединяли с восстановителем для образцов NuPAGE® или оставляли в невосстановленной форме соответственно и выдерживали в течение 10 мин при 70°C. Затем по 5-30 мкл применяли для осуществления ДСН-ПААГ с использованием 4-12% бис-Трис-гелей NuPAGE® (фирма Invitrogen) (применяя буфер MOPS для осуществления ДСН-ПААГ в невосстанавливающих условиях и буфер MES в виде подвижного буфера с антиоксидантной добавкой NuPAGE® (фирма Invitrogen) для осуществления ДСН-ПААГ в восстанавливающих условиях) и окрашивали кумасси бриллиантовым голубым.

Концентрацию антител и их производных в супернатантах клеточных культур оценивали количественно с помощью аффинной ЖХВР-хроматографии. В целом, метод состоял в следующем: супернатанты, содержащие антитела и их производные, которые связывались с белком А, вносили на колонку Applied Biosystems Poros A/20 в 200 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 100 мМ натрий-цитратный буфер, рН 7,4 и элюировали из матрикса с помощью 200 мМ NaCl, 100 мМ лимонной кислоты, рН 2,5 с использованием системы Agilent HPLC 1100. Элюированный белок оценивали количественно с помощью УФ-абсорбции и интегрирования площадей пиков. Очищенное стандартное антитело в виде IgG1 служило в качестве стандарта.

В альтернативном варианте концентрацию антител и их производных в супернатантах клеточных культур оценивали с помощью «сэндвич»-IgG-ELISA. В целом, метод состоял в следующем: 96-луночные титрационные микропланшеты, обладающие высокой способностью связывать стрептавидин А (планшеты типа StreptaWell High Bind Streptavidin А (фирма Roche)), сенсibilizировали из расчета 100 мкл/луночку биотинилированным античеловеческим IgG F(ab')<sub>2</sub>-FcγBI, применяемым в качестве иммобилизованной молекулы (фирма Dianova), в концентрации 0,1 мкг/мл в течение 1 ч при комнатной температуре или в другом варианте в течение ночи при 4°C и затем

отмывали трижды, используя 200 мкл/лунку ЗФР, 0,05% Твин (ЗФРТ, фирма Sigma). Добавляли в лунки по 100 мкл/лунку серийных разведений в ЗФР (фирма Sigma), содержащих соответствующее антитело супернатантов клеточных культур, и инкубировали в течение 1-2 ч на шейкере для титрационных микропланшетов при комнатной температуре. Лунки отмывали трижды, используя 200 мкл/лунку ЗФРТ, и связанное антитело выявляли с помощью 100 мкл F(ab')<sub>2</sub>-hFcγ<math>POD</math> (фирма Dianova) в концентрации 0,1 мкг/мл в качестве идентифицирующего антитела в течение 1-2 ч на шейкере для титрационных микропланшетов при комнатной температуре. Несвязанное идентифицирующее антитело отмывали трижды, используя 200 мкл/лунку ЗФРТ, и связанное идентифицирующее антитело выявляли, добавляя 100 мкл АВТС/лунку. Определение абсорбции осуществляли на спектрометре типа Tecan Fluor при длине волны 405 нм (длина референс волны 492 нм).

#### Очистка белков

Белки очищали из профильтрованных супернатанов клеточных культур согласно стандартным протоколам. В целом, метод состоял в следующем: белки наносили на колонку, заполненную белок А-сефарозой (фирма GE Healthcare), и отмывали ЗФР. Элюцию антител осуществляли при pH 2,8 с последующей немедленной нейтрализацией образца. Агрегированный белок отделяли от мономерных антител гель-фильтрацией (Superdex 200, фирма GE Healthcare) в ЗФР или в 20 мМ гистидине, 150 мМ NaCl, pH 6,0. Фракции мономерных антител объединяли, при необходимости концентрировали, используя, например, центрифужный концентратор типа MILLIPORE Amicon Ultra (30 MWCO (молекулярновесовой предел), замораживали и хранили при -20°C или -80°C. Часть образцов оставляли для последующего аналитического изучения белка и его аналитической характеристики, например, с помощью ДСН-ПААГ, гель-фильтрации или масс-спектрометрии.

#### ДСН-ПААГ

Применяли систему геля NuPAGE® Pre-Cast (фирма Invitrogen) согласно инструкции производителя. В частности использовали 10% или 4-12% бис-Трис Pre-Cast-гели NuPAGE®, Novex® (pH 6,4) и подвижные буферы, такие как NuPAGE® MES (гели, применяемые в восстанавливающих условиях, подвижный буфер с антиоксидантной добавкой NuPAGE®) или MOPS (гели, применяемые в невосстанавливающих условиях).

#### Аналитическая гель-фильтрация

В качестве гель-фильтрации, предназначенной для определения агрегированного и олигомерного состояния антител, применяли ЖХВР-хроматографию. В целом, метод состоял в следующем: очищенные на белке А антитела вносили в колонку типа Tosoh TSKgel G3000SW в 300 мМ NaCl, 50 мМ KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,5 в системе Agilent HPLC 1100, или в колонку Superdex 200 (фирма GE Healthcare) в 2 xЗФР в ЖХВР-системе Dionex. Количество элюированного белка определяли на основе УФ-абсорбции и интегрирования площадей пиков. В качестве стандарта применяли стандарт для гель-фильтрации фирмы BioRad (Gel Filtration Standard 151-1901).

#### Масс-спектрометрия

Общую дегликозилированную массу антител, полученных в результате кроссингвера, определяли и подтверждали с помощью масс-спектрометрии с ионизацией электроспреем (ESI-МС). В целом, метод состоял в следующем: 100 мкг очищенных антител дегликозилировали с помощью 50 мед. N-гликозидазы F (PNGaseF, фирма ProZyme) в 100 мМ KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7 при 37°C в течение 12-24 ч при концентрации белка вплоть до 2 мг/мл и затем обессоливали с помощью ЖХВР на колонке Sephadex G25 (фирма GE Healthcare). Массу соответствующих тяжелых и легких цепей определяли с



помощью ESI-МС после дегликозилирования и восстановления. В целом, метод состоял в следующем: 50 мкг антитела в 115 мкл инкубировали с 60 мкл 1М ТСЕР и 50 мкл 8М гидрохлорида гуанидида после обессоливания. Общую массу и массу восстановленных тяжелых и легких цепей определяли с помощью ESI-МС с использованием МС-системы Q-Star Elite, снабженной источником NanoMate.

ELISA для оценки связывания ECD IGF-1R

Особенности связывания созданных антител с внеклеточным доменом (ECD) IGF-1R анализировали с помощью ELISA. Для этой цели внеклеточный домен IGF-1R (остатки 1-462), содержащий встречающуюся в естественных условиях лидерную

последовательность и 12 богатых LI-цистеином доменов эктодомена альфа-цепи человеческого IGF-1R (согласно McKern и др., 1997; Ward и др., 2001), слитый с N-концевой меткой, представляющей собой His-стрептавидин-связывающий пептид (His-SBP), клонировали в производном вектора pcDNA3 и кратковременно экспрессировали в HEK293F-клетках. Белковая последовательность ECD IGF-1R-His-SBP представлена в SEQ ID NO:12. 96-луночные титрационные микропланшеты, обладающие высокой способностью связывать стрептавидин А (планшеты типа StreptaWell High Bind Streptavidin А (фирма Roche)), сенсibilизировали, используя 100 мкл/лунку супернатанта клеточной культуры, содержащего растворимый слитый белок IGF-1R-ECD-SBP, в течение ночи при 4°C и отмывали трижды, используя 200 мкл/лунку ЗФР, 0,05% Твин (ЗФРТ, фирма Sigma). Затем добавляли в лунки из расчета 100 мкл/лунку серийные разведения соответствующего антитела и в качестве референс-антитела антитело дикого типа <IGF-1R> в ЗФР (фирма Sigma), который включал 1% БСА (фракция V, фирма Roche), и инкубировали в течение 1-2 ч на шейкере для титрационных микропланшетов при комнатной температуре. При осуществлении серийных разведений в лунки вносили одинаковое количество очищенного антитела. Лунки отмывали трижды, используя 200 мкл/лунку ЗФРТ, и связанное антитело выявляли, используя 100 мкл/лунку F(ab')<sub>2</sub>-hFcγ<sub>2</sub>POD (фирма Dianova) в концентрации 0,1 мкг/мл (1:8000) в качестве идентифицирующего антитела, в течение 1-2 ч на шейкере для титрационных микропланшетов при комнатной температуре. Несвязанное идентифицирующее антитело отмывали трижды, используя 200 мкл/лунку ЗФРТ, и связанное идентифицирующее антитело выявляли, добавляя 100 мкл АВТС/лунку. Определение абсорбции осуществляли на спектрометре Tecan Fluor при длине волны 405 нм (длина референс волны 492 нм).

Віасcore-анализ с использованием ECD IGF-1R (IGF-1R-ECD)

Связывание созданных антител с человеческим IGF-1R-ECD исследовали также с помощью поверхностного плазмонного резонанса, используя устройство типа VIACORE T100 (фирма GE Healthcare Biosciences AB, Упсала, Швеция). В целом, метод состоял в следующем: для оценки аффинности козьи античеловеческие антитела типа IgG JIR 109-005-098 иммобилизовывали на CM5-чипе посредством аминного сочетания для презентации антител к человеческому IGF-1R-ECD, несущих Fc. Связывание оценивали в HBS-буфере (HBS-P (10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 0,005% Твин 20, рН 7,4) при 25°C. IGF-1R-ECD (фирма R&D Systems или полученный при создании изобретения) добавляли в раствор в различных концентрациях. Ассоциацию оценивали путем инъекции IGF-1R-ECD в течение промежутка времени от 80 с до 3 мин; диссоциацию оценивали путем отмывки поверхности чипа HBS-буфером в течение 3-10 мин и значение KD определяли, используя модель связывания Ленгмюра при соотношении 1:1. Из-за низкой плотности загрузки и уровня захвата антител <IGF-1R> получали данные о связывании одновалентного IGF-1R-ECD. Данные, полученные для отрицательного контроля (например, кривые, полученные только для буфера) вычитали из кривых, полученных

для образца, для коррекции присущего системе сдвига основного уровня и для снижения шумовых сигналов. Применяли программу Biacore T100 Evaluation, версия 1.1.1 для анализа сенсограмм и для расчета данных, касающихся аффинности. На фиг.11 представлено схематическое изображение Biacore-анализа.

#### 5 Примеры 1

Получение, экспрессия, очистка и характеристика моноспецифического двухвалентного антитела <IGF-1R>, в котором переменные домены VL и VH заменены друг на друга (сокращенно обозначено в контексте настоящего описания как антитело <IGF-1R>, несущее замену VL-VH)

#### 10 Пример 1А

Создание экспрессионных плазмид для моноспецифического двухвалентного антитела <IGF-1R>, несущего замену VL-VH

Последовательности переменных доменов тяжелой и легкой цепи моноспецифического двухвалентного антитела <IGF-1R>, несущего замену VL-VH, включая соответствующие лидерные последовательности, описанные в данном примере, выводили из тяжелой цепи человеческого антитела <IGF-1R> (SEQ ID NO:1, плазида 4843-pUC-NC-IGF-1R) и его легкой цепи (SEQ ID NO:2, плазида 4842-pUC-LC-IGF-1R), которые описаны в WO 2005/005635, и константные домены тяжелой и легкой цепи выводили из человеческого антитела (С-каппа и IgG1).

20 Генные сегменты, кодирующие лидерную последовательность, переменный домен легкой цепи (VL) и домен 1 константной области человеческой тяжелой цепи (CH1) антитела <IGF-1R> сцепляли и сливали с 5'-концом Fc-доменов константных областей человеческой тяжелой  $\gamma$ 1-цепи (шарнир-CH2-CH3). ДНК, кодирующую соответствующий слитый белок, полученный в результате замены VH-домена на VL-домен (замена VH-  
25 VL), создавали путем синтеза гена и обозначали далее как <IGF-1R> HC\*\*\* (SEQ ID NO:10). Первоначально VL-CH1-домены сливали с несущей небольшие изменения последовательностью (SEQ ID NO:3); из-за снижения вследствие этого выхода продуктов экспрессии, была выбрана SEQ ID NO:10, для которой обнаружен выход продуктов экспрессии, сопоставимый с выходом антител дикого типа.

30 Генные сегменты, кодирующие лидерную последовательность, переменный домен тяжелой цепи (VH) и константный домен человеческой легкой цепи (CL) антитела <IGF-1R> сцепляли в виде независимой цепи. ДНК, кодирующую соответствующий слитый белок, полученный в результате замены VL-домена на VH-домен (замена VL-VH), создавали путем синтеза гена и обозначали далее как <IGF-1R> LC\*\*\* (тяжелая цепь\*\*\*)  
35 (SEQ ID NO:11). Первоначально VH-CL-домены сливали с несущей небольшие изменения последовательностью (SEQ ID NO:4); из-за снижения вследствие этого выхода продуктов экспрессии, была выбрана SEQ ID NO:11, для которой обнаружен выход продуктов экспрессии, сопоставимый с выходом антител дикого типа.

На фиг.5 и фиг.6 представлено схематическое изображение белковой  
40 последовательности модифицированной тяжелой цепи <IGF-1R> HC\*\*\* и модифицированной легкой цепи <IGF-1R> LC\*\*\*.

Ниже кратко описаны соответствующие экспрессионные векторы:

Вектор pUC-NC\*\*\*-IGF-1R

45 Вектор pUC-NC\*\*\*-IGF-1R представляет собой экспрессионную плазмиду, например, предназначенную для кратковременной экспрессии несущей замену VL-VH тяжелой цепи <IGF-1R> HC\*\*\* (кассета экспрессии на основе кДНК-конструкции; с CMV-интроном А), в клетках линии НЕК293 (EBNA) или стабильной экспрессии в CHO-клетках.

Помимо экспрессионной кассеты <IGF-1R> HC\*\*\* этот вектор содержал:

- сайт инициации репликации из pUC18, обеспечивающий репликацию указанной плазмиды в E.coli, и

- ген  $\beta$ -лактамазы, который придает устойчивость в E.coli к ампициллину.

5 Транскрипционная единица гена <IGF-1R> HC\*\*\* содержала следующие элементы:

- сайт рестрикции AscI на 5'-конце,

- немедленно-ранний энхансер и промотор из человеческого цитомегаловируса,

- расположенную за ним последовательность интрона A,

- 5'-нетранслируемую область гена человеческого антитела,

10 - сигнальную последовательность легкой цепи иммуноглобулина,

- ген человеческой зрелой HC\*\*\*-цепи <IGF-1R>, который кодирует слияние переменного домена человеческой тяжелой цепи (VH) и константного домена человеческой легкой каппа-цепи (CL), слитый на 5'-конце Fc-доменов константных доменов человеческой тяжелой  $\gamma$ 1-цепи (шарнир-CH2-CH3),

15 - 3'-нетранслируемую область с сигнальной последовательностью полиаденилирования и

- сайт рестрикции SgrAI на 3'-конце.

Плазмидная карта экспрессионного вектора pUC-HC\*\*\*-IGF-1R, предназначенного для несущей замену VL-VH тяжелой цепи \*\*\* <IGF-1R> HC\*\*\*, представлена на фиг.7.

20 Аминокислотная последовательность <IGF-1R> HC\*\*\* (включая сигнальную последовательность) представлена в SEQ ID NO:10.

Вектор pUC-LC\*\*\*-IGF-1R

Вектор pUC-LC\*\*\*-IGF-1R представляет собой экспрессионную плазмиду, например, предназначенную для кратковременной экспрессии несущей замену VL-VH легкой цепи

25 <IGF-1R> LC\*\*\* ((кассета экспрессии на основе кДНК-конструкции; с CMV-интроном A), в клетках линии HEK293 (EBNA) или стабильной экспрессии в CHO-клетках.

Помимо экспрессионной кассеты <IGF-1R> LC\*\*\* этот вектор содержал:

- сайт инициации репликации из pUC18, обеспечивающий репликацию указанной плазмиды в E.coli, и

30 - ген  $\beta$ -лактамазы, который придает устойчивость в E.coli к ампициллину.

Транскрипционная единица гена <IGF-1R> LC\*\*\* содержала следующие элементы:

- сайт рестрикции Sse8387I на 5'-конце,

- немедленно-ранний энхансер и промотор из человеческого цитомегаловируса,

- расположенную за ним последовательность интрона A,

35 - 5'-нетранслируемую область гена человеческого антитела,

- сигнальную последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина,

- ген человеческой зрелой LC\*\*\*-цепи <IGF-1R>, который кодирует слияние переменного домена человеческой легкой цепи (VL) и константных доменов человеческой тяжелой  $\gamma$ 1-цепи (CH1),

40 - 3'-нетранслируемую область с сигнальной последовательностью полиаденилирования и

- сайты рестрикции Sall и FseI на 3'-конце.

Плазмидная карта экспрессионного вектора pUC-LC\*\*\*-IGF-1R, предназначенного для несущей замену VL-VH легкой цепи \*\*\* <IGF-1R> LC\*\*\*, представлена на фиг.8.

45 Аминокислотная последовательность <IGF-1R> LC\*\*\* (включая сигнальную последовательность) представлена в SEQ ID NO:11.

Плазмиды pUC-HC\*\*\*-IGF-1R и pUC-LC\*\*\*-IGF-1R можно применять для кратковременных или стабильных котрансфекций, например, клеток HEK293, HEK293

EBNA или CHO (2-векторная система). С целью сравнения осуществляли кратковременную экспрессию антитела <IGF-1R> дикого типа из плазмид 4842-pUC-LC-IGF-1R (SEQ ID NO:2) и 4843-pUC-NC-IGF-1R (SEQ ID NO:1), аналогично методу, описанному в этом примере.

- 5 Для достижения более высоких уровней экспрессии при кратковременных экспрессиях в клетках HEK293 EBNA экспрессионную кассету <IGF-1R> HC\*\*\* можно субклонировать с использованием сайтов AscI, SgrAI, а экспрессионную кассету <IGF-1R> LC\*\*\* можно субклонировать с использованием сайтов Sse8387I и FseI в экспрессионном векторе 4700-pUC-Hyg\_OriP, который содержит
- 10 - элемент OriP и  
- ген, обуславливающий устойчивость к гигромицину, в качестве селектируемого маркера.

- Транскрипционные единицы тяжелой и легкой цепи можно либо субклонировать в двух независимых векторах 4700-pUC-Hyg-OriP с целью котрансфекций (2-векторная система), либо их можно клонировать в одном общем векторе 4700-pUC-Hyg-OriP (1-векторная система) для последующих кратковременных или стабильных трансфекций с использованием образовавшихся векторов. На фиг.9 показана плазмидная карта основного вектора 4700-pUC-OriP.
- 15

#### Пример 1Б

- 20 Создание экспрессионных плазмид для моноспецифического двухвалентного антитела <IGF-1R>, несущего замену VL-VH

- Слитые гены <IGF-1R> (слитые гены HC\*\*\* и LC\*\*\*), содержащие измененные Fab-последовательности относительно антитела <IGF-1R> дикого типа, собирали с помощью известных методов и процессов рекомбинации путем соединения соответствующих
- 25 сегментов нуклеиновых кислот.

- Каждую из нуклеотидных последовательностей, кодирующих HC\*\*\* и LC\*\*\* IGF-1R, синтезировали путем химического синтеза и затем клонировали в клонирующем векторе pGA4, основой которого является плазида pPCRScripT (фирма Stratagene), на фирме Geneart (Регенсбург, Германия). Кассету экспрессии, кодирующую IGF-1R HC\*\*\*, встраивали путем лигирования в пригодную для E.coli плазмиду, используя сайты рестрикции PvuII и BmgBI, с получением конечного вектора pUC-NC\*\*\*-IGF-1R; кассету экспрессии, кодирующую соответствующую IGF-1R LC\*\*\*, встраивали путем лигирования в пригодную для E.coli плазмиду, используя сайты рестрикции PvuII и SalI, с получением конечного вектора pUC-LC\*\*\*-IGF-1R. Субклонированные нуклеотидные
- 30 последовательности подтверждали путем секвенирования ДНК. Для кратковременных и стабильных трансфекций использовали большие количества плазмид, которые получали из трансформированных культур E.coli (набор Nucleobond AX, фирма Macherey-Nagel).
- 35

#### Пример 1В

- 40 Кратковременная экспрессия моноспецифического двухвалентного антитела <IGF-1R>, несущего замену VL-VH, его очистка и подтверждение идентичности с помощью масс-спектрометрии

- Рекомбинантное антитело <IGF-1R>, несущее замену VL-VH, экспрессировали путем кратковременной котрансфекции плазмидами pUC-NC\*\*\*-IGF-1R и pUC-LC\*\*\*-IGF-1R
- 45 находящихся в суспензии клеток линии HEK293-F согласно описанному выше методу.

Экспрессированное и секретированное моноспецифическое двухвалентное антитело <IGF-1R>, несущее замену VL-VH, очищали из профильтрованных супернатантов клеточной культуры с помощью аффинной хроматографии на белке А согласно

описанному выше методу. В целом, метод состоял в следующем: содержащие антитело <IGF-1R>, несущее замену VL-VH, супернатанты клеточной культуры после кратковременных трансфекций осветляли центрифугированием и фильтрацией и вносили на содержащую белок А колонку HiTrap MabSelect Xtra (фирма GE Healthcare),  
 5 уравновешенную ЗФР-буфером (10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 мМ NaCl и 2,7 мМ KCl, pH 7,4). Несвязанные белки отмывали уравновешивающим ЗФР-буфером, а затем 0,1М натрий-цитратным буфером, pH 5,5 и отмывали ЗФР. Для элюции антитела применяли 100 мМ натрий-цитратный буфер, pH 2,8, после чего образцы немедленно  
 10 нейтрализовали, добавляя 300 мкл 2М Трис, pH 9,0 на 2-миллилитровую фракцию. Агрегированный белок отделяли от мономерных антител с помощью гель-фильтрации на колонке HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade (фирма GE Healthcare) в 20 мМ гистидине, 150 мМ NaCl, pH 6,0, а фракцию мономерных антител затем концентрировали с помощью центрифужного концентратора MILLIPORE Amicon Ultra-15. Антитело <IGF-1R>, несущее замену VL-VH, замораживали и хранили при -20°C или -80°C. Целостность антитела  
 15 <IGF-1R>, несущего замену VL-VH, анализировали с помощью ДСН-ПААГ в присутствии восстановителя или без него и затем окрашивали кумасси бриллиантовым голубым согласно описанному выше методу. Мономерное состояние антитела <IGF-1R>, несущего замену VL-VH, подтверждали аналитической гель-фильтрацией (фиг. 12). Охарактеризованные образцы использовали для дальнейшего аналитического  
 20 исследования белка и изучения функциональных характеристик. С помощью ESI-масс-спектрометрии подтверждали теоретическую молекулярную массу полностью дегликолизированного антитела <IGF-1R>, несущего замену VL-VH.

#### Пример 1Г

Анализ способности моноспецифического двухвалентного антитела <IGF-1R>, несущего замену VL-VH, связывать IGF-1R с помощью применяемого для оценки связывания IGF-1R-ECD ELISA и Biacore-анализа

Связывающие способности моноспецифического двухвалентного антитела <IGF-1R>, несущего замену VL-VH, оценивали с помощью ELISA с использованием  
 30 внеклеточного домена (ECD) IGF-1R согласно описанному выше методу. Для этой цели внеклеточный домен IGF-1R (остатки 1-462), содержащий встречающуюся в естественных условиях лидерную последовательность и 12 богатых LI-цистеином доменов эктодомена альфа-цепи человеческого IGF-1R (согласно McKern и др., 1997; Ward и др., 2001), слитый с N-концевой меткой, представляющей собой His-стрептавидин-связывающий пептид (His-SBP), клонировали в производном вектора pcDNA3 и кратковременно  
 35 экспрессировали в HEK293F-клетках. Белковая последовательность ECD IGF-1R-His-SBP представлена выше. Из полученной титрационной кривой видно, что антитело <IGF-1R>, несущее замену VL-VH, обладало функциональной активностью и для него выявлены характеристики связывания и кинетические характеристики, сопоставимые с характеристиками антитела <IGF-1R> дикого типа в пределах ошибки метода, и  
 40 поэтому оно является полностью функциональным (фиг. 13).

Эти данные подтверждены с помощью Biacore-анализа, для которого использовали соответствующие очищенные антитела.

#### Пример 1Д

Анализ способности моноспецифического двухвалентного антитела <IGF-1R>, несущего замену VL-VH, связывать IGF-1R с помощью FACS с использованием  
 45 сверхэкспрессирующих IGF-1R I24-клеток

Для подтверждения активности связывания антитела <IGF-1R>, несущего замену VL-VH, с IGF-1R, сверхэкспрессируемым на поверхности I24-клеток (NIN3T3-клетки,

экспрессирующие рекомбинантный человеческий IGF-1R, фирма Roche), использовали FACS-анализ. В целом, метод состоял в следующем:  $5 \times 10^5$  I24-клеток на каждую трубку, предназначенную для осуществления FACS, инкубировали с разведением очищенного антитела <IGF-1R>, несущего замену VL-VH, и антитела <IGF-1R> дикого типа в качестве референс-антитела и инкубировали на льду в течение 1 ч. Несвязанный белок отмывали с помощью 4 мл охлажденного на льду ЗФР (фирма Gibco)+2% FCS (фирма Gibco). Затем клетки центрифугировали (5 мин при 400 g) и связанное антитело выявляли с помощью конъюгата F(ab')<sub>2</sub><hFcγ>PE (фирма Dianova) на льду в течение 1 ч, защищая от действия света. Выявленное несвязанное антитело отмывали с помощью 4 мл охлажденного на льду ЗФР + 2% FCS. Затем клетки центрифугировали (5 мин при 400 g), ресуспендировали в 300-500 мкл ЗФР и выявленное связанное антитело оценивали количественно с помощью устройства FACSCalibur или FACS Canto (фирма BD (FL2-канал, 10000 клеток на процесс)). В эксперимент включали в качестве контролей антитела соответствующего изотипа для исключения любых неспецифических случаев связывания. Связывание антитела <IGF-1R>, несущего замену VL-VH, и антитела <IGF-1R> дикого типа с IGF-1R на поверхности I24-клеток характеризовалось сопоставимым зависящим от концентрации сдвигом средней интенсивности флуоресценции.

#### Примеры 2

Описание моноспецифического двухвалентного антитела <ANGPT2> дикого типа

#### Пример 2А

Создание экспрессионных плазмид для моноспецифического двухвалентного антитела <ANGPT2> дикого типа

Последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепи моноспецифического двухвалентного антитела к ANGPT2 (<ANGPT2>) дикого типа, включая соответствующие лидерные последовательности, описанные в данном примере, выводили из тяжелой цепи человеческого антитела <ANGPT2> (SEQ ID NO:6) и его легкой цепи (SEQ ID NO:7), которые описаны в WO 2006/045049, а константные домены тяжелой и легкой цепи выводили из человеческого антитела (С-каппа и IgG1).

Антитело <ANGPT2> дикого типа клонировали в плаزمиде SB04-pUC-NC-ANGPT2 (SEQ ID NO:6) и SB06-pUC-LC-ANGPT2 (SEQ ID NO:7), которые являются аналогами векторов, описанных выше в примере 1А.

С целью сравнения и для осуществления экспериментов по совместной экспрессии (см. пример 3) антитело <ANGPT2> дикого типа временно (ко-)экспрессировали с использованием плазмид SB04-pUC-NC-ANGPT2 и SB06-pUC-LC-ANGPT2.

#### Пример 2Б

Создание экспрессионных плазмид для моноспецифического двухвалентного антитела <ANGPT2> дикого типа

Каждую из нуклеотидных последовательностей, кодирующих NC и LC <ANGPT2>, синтезировали с помощью химического синтеза и затем клонировали в клонирующем векторе pGA4, основой которого является плазида pPCRScripT (фирма Stratagene), на фирме Geneart (Регенсбург, Германия). Экспрессионную кассету, кодирующую NC <ANGPT2>, клонировали в пригодной для E.coli плазмиде, получая конечный вектор SB04-pUC-NC-ANGPT2; экспрессионную плазмиду, кодирующую соответствующую LC <ANGPT2>, клонировали в пригодной для E.coli плазмиде, получая конечный вектор SB06-pUC-LC-ANGPT2. Субклонированные нуклеотидные последовательности подтверждали путем секвенирования ДНК. Для кратковременных и стабильных трансфекций использовали большие количества плазмид, которые получали из трансформированных культур E.coli (набор Nucleobond AX, фирма Macherey-Nagel).

### Примеры 3

Экспрессия биспецифического двухвалентного антитела <ANGPT2-IGF-1R>, в котором тяжелая и легкая цепь специфически связывается с IGF-1R, переменные домены VL и VH заменены друг на друга (сокращенно обозначено в контексте настоящего описания как антитело <ANGPT2-IGF-1R>, несущее замену VL-VH)

#### Пример 3А

Кратковременная совместная экспрессия и очистка антитела <IGF-1R>, несущего замену VL-VH, и антитела <ANGPT2> дикого типа в клетках линии HEK293 EBNA с получением биспецифического антитела <ANGPT2-IGF-1R>, несущего замену VL-VH

Для создания функционального биспецифического антитела, распознающего IGF-1R, на основе Fab-фрагмента антитела <IGF-1R>, несущего замену VL-VH, с одной стороны, и распознающего ANGPT2 на основе Fab-фрагмента антитела <ANGPT2> дикого типа, с другой стороны, две экспрессионные плазмиды, кодирующие антитело <IGF-1R>, несущее замену VL-VH (пример 1А), совместно экспрессировали с двумя экспрессионными плазмидами, кодирующими антитело <ANGPT2> дикого типа (пример 2А). С учетом подтвержденной статистикой ассоциации тяжелых цепей (НС) дикого типа и несущих замену тяжелых цепей VL-VH НС\*\*\* это приводило к получению биспецифического и двухвалентного антитела <IGF-1R-ANGPT2>, несущего замену VL-VH. Учитывая, что оба антитела одинаково хорошо экспрессировались и при этом не образовывались побочные продукты в количестве, которое может повлиять на результат, можно ожидать, что этот процесс должен приводить к получению ниже указанных трех основных продуктов в соотношении 1:2:1: А) антитело <IGF-1R>, несущее замену VL-VH, Б) биспецифическое антитело <IGF-1R-ANGPT2>, несущее замену VL-VH, и В) антитело <ANGPT2> дикого типа. Можно было ожидать присутствия нескольких побочных продуктов. Однако из-за замены только VL-VH-доменов частота встречаемости побочных продуктов должна быть снижена по сравнению с Fab, полученными в результате полного кроссинговера. Следует отметить, что для антитела <ANGPT2> дикого типа обнаружен более высокий выход продукта кратковременной экспрессии по сравнению с антителом <IGF-1R> дикого типа и антителом <IGF-1R>, несущим замену VL-VH, соотношение плазмид, кодирующих антитело <ANGPT2> дикого типа, и плазмид, кодирующих антитело <IGF-1R>, несущее замену VL-VH, сдвигалось в сторону экспрессии антитела <ANGPT2> дикого типа.

Для создания смеси основных продуктов, таких как: А) антитело <IGF-1R>, несущее замену VL-VH, Б) биспецифическое антитело <IGF-1R-ANGPT2>, несущее замену VL-VH, и В) антитело <ANGPT2> дикого типа, четырьмя плазмидами pUC-НС\*\*\*-IGF-1R и pUC-LC\*\*\*-IGF-1R и плазмидами SB04-pUC-НС-ANGPT2 и SB06-pUC-LC-ANGPT2 кратковременно котрансфектировали находящиеся в виде суспензионной культуры HEK293-F-клетки согласно описанному выше методу. Собранный супернатант, содержащий смесь основных продуктов: А) антитело <IGF-1R>, несущее замену VL-VH, Б) биспецифическое антитело <IGF-1R-ANGPT2>, несущее замену VL-VH, и В) антитело <ANGPT2> дикого типа, обозначили как «смесь, содержащая биспецифическое антитело, несущее замену VL-VH». Супернатанты клеточной культуры, которые включали смесь, содержащую биспецифическое антитело, несущее замену VL-VH, собирали центрифугированием и затем очищали согласно описанному выше методу.

Целостность смеси антител анализировали с помощью ДСН-ПААГ в присутствии восстановителя или без него и затем окрашивали кумасси бриллиантовым голубым и подвергали гель-фильтрации согласно описанному выше методу. Полученные с помощью ДСН-ПААГ результаты свидетельствуют о том, что, как и ожидалось, в

препарате присутствовали 2 различные тяжелые и легкие цепи (гель в присутствии восстановителя) (фиг.14). Охарактеризованные образцы использовали для дальнейшего аналитического исследования белка и изучения его функциональных характеристик.

#### Пример 3Б

5 Выявление функционального биспецифического антитела <ANGPT2-IGF-1R>, несущего замену VL-VH, с помощью клеточного FACS-анализа, позволяющего выявлять образование мостиковой связи, с использованием экспрессирующих IGF-1R клеток линии I24

10 Для подтверждения присутствия функционального биспецифического антитела <ANGPT2-IGF-1R>, несущего замену VL-VH, в очищенной смеси, которая содержала: биспецифическое антитело, несущее замену VL-VH, включающую следующие основные продукты: А) антитело <IGF-1R>, несущее замену VL-VH, Б) биспецифическое антитело <IGF-1R-ANGPT2>, несущее замену VL-VH, и В) антитело <ANGPT2> дикого типа, полученной после кратковременной совместной экспрессии согласно методу, 15 описанному в примере 3А, проводили клеточный FACS-анализ, позволяющий выявлять образование мостиковой связи, такой как IGF-1R-ANGPT2, с использованием клеток линии I24 (NIH3T3-клетки, экспрессирующих рекомбинантный человеческий IGF-1R, фирма Roche). Принцип анализа показан на фиг.10. Биспецифическое антитело <ANGPT2-IGF-1R>, несущее замену VL-VH, которое присутствовало в очищенной смеси антител, 20 обладало способностью связываться с IGF-1R на поверхности I24-клеток и одновременно с ANGPT2; и таким образом обладало способностью соединять мостиковой связью два его антигена-мишени с двумя противоположными Fab-фрагментами.

В целом, метод состоял в следующем:  $5 \times 10^5$  клеток линии I24 на трубку, 25 предназначенную для осуществления FACS, инкубировали с общей смесью очищенных антител на льду в течение 1 ч (титрация 160 мкг/мл смеси). Соответствующие очищенные антитела дикого типа <IGF-1R> и <ANGPT2> наносили на I24-клетки в качестве контролей. Несвязанное антитело отмывали 4 мл охлажденного на льду ЗФР (фирма Gibco)+2% FCS (фирма Gibco), клетки центрифугировали (5 мин при 400 g) и связанное биспецифическое антитело выявляли с помощью 50 мкл (2 мкг/мл) человеческого 30 ANGPT2 (фирма R&D Systems) в течение 1 ч на льду. Затем несвязанный ANGPT2 отмывали один или два раза 4 мл охлажденного на льду ЗФР (фирма Gibco)+2% FCS (фирма Gibco), клетки центрифугировали (5 мин при 400 g) и связанный ANGPT2 выявляли с помощью 50 мкл (5 мкг/мл) антитела <ANGPT2> mIgG1-биотин (BAM0981, фирма R&D Systems) в течение 45 мин на льду; в альтернативном варианте клетки 35 инкубировали с 50 мкл (5 мкг/мл) конъюгата mIgG1-биотин в качестве контроля изотипа (фирма R&D Systems). Несвязанное идентифицирующее антитело отмывали 4 мл охлажденного на льду ЗФР (фирма Gibco)+2% PCS (фирма Gibco), клетки центрифугировали (5 мин при 400 g) и связанное идентифицирующее антитело выявляли с помощью 50 мкл конъюгата 1:400 стрептавидин-PE (SA-PE) (фирма Invitrogen/Zymed) 40 в течение 45 мин на льду, защищая от действия света. Несвязанный конъюгат стрептавидин-PE отмывали 4 мл охлажденного на льду ЗФР+2% FCS. Затем клетки центрифугировали (5 мин при 400 g), ресуспендировали в 300-500 мкл ЗФР и связанный конъюгат стрептавидин-PE оценивали количественно с помощью устройства FACSCalibur (фирма BD (FL2-канал, 10000 клеток на процесс). В эксперимент включали 45 в качестве контролей антитела соответствующего изотипа для исключения любых неспецифических случаев связывания. Кроме того, в качестве контролей включали очищенные моноспецифические двухвалентные антитела типа IgG1, такие как <IGF-1R> и <ANGPT2>.



Результаты, представленные на фиг.15, демонстрируют, что инкубация со смесью, которая содержала очищенное возникшее в результате кроссинговера антитело (<ANGPT2-IGF-1R>, несущее замену VL-VH), полученное после совместной экспрессии возникшего в результате кроссинговера антитела (<IGF-1R>, несущего замену VL-VH) с антителом дикого типа (антитело <ANGPT2> дикого типа), приводила к существенному сдвигу флуоресценции, что свидетельствует о присутствии функционального биспецифического антитела <ANGPT2-IGF-1R>, несущего замену VL-VH, которое обладает способностью связываться одновременно с IGF-1R на поверхности I24-клеток и с ANGPT2; и таким образом обладает способностью соединять мостиковую связью два его антигена-мишени с двумя противоположными Fab-фрагментами. В отличие от этого соответствующие контрольные антитела <IGF-1R> и <Ang-2> не приводили к сдвигу флуоресценции при FACS-анализе, позволяющем выявлять образование мостиковой связи.

В сочетании эти данные свидетельствуют о том, что путем совместной экспрессии соответствующих плазмид дикого типа и полученных в результате кроссинговера плазмид можно создавать функциональные биспецифические антитела. Выход правильного биспецифического антитела можно повышать, увеличивая правильную гетеродимеризацию тяжелых цепей дикого типа и модифицированных полученных в результате кроссинговера тяжелых цепей, например, используя технологию «knobs-into-holes», а также стабилизацию с помощью дисульфидного мостика (см. пример 4).

#### Пример 4

Экспрессия двухвалентного биспецифического антитела <ANGPT2-IGF-1R>, несущего замену VL-VH, с модифицированными СНЗ-доменами (технология «knobs-into-holes»)

Для дополнительного повышения выхода биспецифического антитела <ANGPT2-IGF-1R>, несущего замену VL-VH, применяли технологию «knobs-into-holes» для совместной экспрессии антитела <IGF-1R>, несущего замену VL-VH, и антитела дикого типа <ANGPT2> для получения препарата гомогенного и функционального биспецифического антитела. Для этой цели СНЗ-домен в тяжелой цепи\* НС\* антитела <IGF-1R>, несущего замену VL-VH, заменяли на СНЗ-домен («выступы»), имеющий последовательность SEQ ID NO:8 с заменой Т366W, а СНЗ-домен в тяжелой цепи антитела дикого типа <ANGPT2> заменяли на СНЗ-домен («впадина»), имеющий последовательность SEQ ID NO:9 с заменами Т366S, L368A, Y407V, или наоборот. Кроме того, можно интродуцировать дисульфидный мостик для повышения стабильности и выхода, а также в качестве дополнительных остатков, формирующих ионные связи и повышающих выход продукта гетеродимеризации (EP 1870459A1).

Кратковременную совместную экспрессию и очистку образовавшегося двухвалентного биспецифического антитела <ANGPT2-IGF-1R>, несущего замену VL-VH, с модифицированными СНЗ-доменами (технология «knobs-into-holes») осуществляли согласно методу, описанному в примере 3.

Следует отметить, что для оптимизации гетеродимеризации можно применять, например, различные технологии «knobs-in-holes», такие как интродукция дополнительного дисульфидного мостика в СНЗ-домен, например, Y349C в несущую «выступ» цепь и D356C в несущую «впадину» цепь, и/или их объединение с применением остатков R409D; K370E (K409D) в качестве образующих «выступы» остатков и D399K; E357K в качестве образующих «впадину» остатков, которые описаны в EP 1870459A1.

Аналогично методу, описанному в примере 4, можно получать другие двухвалентные биспецифические антитела, несущие замену VL-VH, с модифицированными СНЗ-доменами (технология «knobs-into-holes»), мишенью которых является ANGPT2 и другой

антиген-мишень (используя описанные выше тяжелую и легкую цепь антитела к ANGPT2 и тяжелую и легкую цепь\*\* HC\*\* и LC\*\* антитела, несущего замену VL-VH, к указанной другой мишени, посредством чего обе тяжелые цепи модифицировали с помощью технологии «knobs-into-holes»), или мишенью которых является IGF-1R и другой антиген-мишень (используя тяжелую и легкую цепь антитела к указанной другой мишени и описанные выше тяжелую и легкую цепь\*\* HC\*\* и LC\*\* антитела к IGF-1R, несущего замену VL-VH, посредством чего обе тяжелые цепи модифицировали с помощью технологии «knobs-into-holes»).

#### Формула изобретения

1. Способ получения двухвалентного биспецифического антитела, где указанное антитело содержит:

а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с первым антигеном; и

б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося со вторым антигеном, в котором переменные домены VL и VH второй легкой цепи и второй тяжелой цепи заменены друг на друга

где СНЗ-домен одной тяжелой цепи и СНЗ-домен другой тяжелой цепи соприкасаются друг с другом поверхностями, которые изменены для активации формирования двухвалентного биспецифического антитела;

причем эти изменения отличаются тем, что:

а) СНЗ-домен одной тяжелой цепи изменен

так, что на поверхности СНЗ-домена одной тяжелой цепи, которая соприкасается поверхностью СНЗ-домена второй тяжелой цепи в двухвалентном биспецифическом антителе, аминокислотный остаток заменен на аминокислотный остаток, который имеет большую по объему боковую цепь, что приводит к созданию выпуклости на поверхности СНЗ-домена одной тяжелой цепи, которая может помещаться в полость на поверхности СНЗ-домена другой тяжелой цепи,

и

б) СНЗ-домен другой тяжелой цепи изменен

так, что на поверхности СНЗ-домена второй тяжелой цепи, которая соприкасается с поверхностью СНЗ-домена первой тяжелой в двухвалентном биспецифическом антителе, аминокислотный остаток заменен на аминокислотный остаток, который имеет меньшую по объему боковую цепь, что приводит к созданию полости на поверхности СНЗ-домена второй тяжелой цепи, в которую может помещаться выпуклость на поверхности раздела СНЗ-домена первой тяжелой цепи;

где указанный аминокислотный остаток, который имеет большую по объему боковую цепь, выбран из группы, включающей аргинин (R), фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W),

и где указанный аминокислотный остаток, который имеет меньшую по объему боковую цепь, выбран из группы, включающей аланин (A), серин (S), треонин (T), валин (V),

а способ включает следующие этапы:

а) трансформации клетки-хозяина

- экспрессионными векторами, которые содержат молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие первую легкую цепь и первую тяжелую цепь, причем поверхности СНЗ-доменов тяжелых цепей, которыми они соприкасаются друг с другом при формировании двухвалентного биспецифического антитела, содержат вышеуказанные изменения,

- экспрессионными векторами, которые содержат молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь, причем поверхности СНЗ-доменов тяжелых цепей, которыми они соприкасаются друг с другом при формировании

5 б) культивирования клетки-хозяина в условиях, которые позволяют синтезировать указанное двухвалентное биспецифическое антитело; и

в) выделения указанного двухвалентного биспецифического антитела из культуры.

10 2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что СНЗ-домены антитела дополнительно изменены путем интродукции цистеина (С) в качестве аминокислоты в соответствующие положения каждого СНЗ-домена, так что дисульфидный мостик может образовываться между обоими СНЗ-доменами.

15

20

25

30

35

40

45

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Ф.Хоффманн-Ля Рош АГ

5 <120> Двухвалентные биспецифические антитела

<130> 24678 EP

<150> EP 07024864

10 <151> 2007-12-21

<160> 12

<170> PatentIn версия 3.2

15 <210> 1

<211> 467

<212> PRT

<213> Искусственная

20 <220>

<223> аминокислотная последовательность тяжелой цепи антитела <IGF-1R> дикого типа

25 <400> 1

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly  
 1 5 10 15

30 Val Gln Cys Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln  
 20 25 30

35 Pro Gly Arg Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
 35 40 45

40 Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala  
 65 70 75 80

45 Asp Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn

			85						90					95		
5	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val
			100						105					110		
10	Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Glu	Leu	Gly	Arg	Arg	Tyr	Phe	Asp	Leu	Trp	Gly
			115					120					125			
15	Arg	Gly	Thr	Leu	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser
		130					135					140				
20	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala
	145					150					155					160
25	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val
				165						170					175	
30	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala
			180						185					190		
35	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val
		195						200					205			
40	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His
	210					215						220				
45	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys
	225					230					235					240
50	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly
				245						250					255	
55	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
			260					265					270			

	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His
			275					280					285			
5	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
		290					295					300				
10	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
	305					310					315					320
15	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
					325					330						335
20	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile
				340					345						350	
25	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
			355					360						365		
30	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
		370					375						380			
35	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
	385					390					395					400
40	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
				405					410						415	
45	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val
				420					425					430		
50	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met
		435						440					445			
55	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser
	450						455						460			

Pro Gly Lys  
465

5  
<210> 2  
<211> 235  
<212> PRT  
<213> Искусственная

10  
<220>  
<223> аминокислотная последовательность легкой цепи антитела <IGF-1R>  
дикого типа  
<400> 2

15  
Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro  
1 5 10 15

20  
Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser  
20 25 30

25  
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser  
35 40 45

30  
Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro  
50 55 60

35  
Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala  
65 70 75 80

40  
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
85 90 95

40  
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser  
100 105 110

45  
Lys Trp Pro Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ser Lys  
115 120 125

- 55 -

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
 130 135 140

5 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
 145 150 155 160

10 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 165 170 175

15 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 180 185 190

20 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
 195 200 205

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
 210 215 220

25 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230 235

30 <210> 3  
 <211> 459  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная

35 <220>  
 <223> аминокислотная последовательность тяжелой цепи \*\*\* (HC\*\*\*)  
 антитела <IGF-1R>, несущего замену VL-VH, в котором VH-домен тяжелой  
 цепи заменен на VL- домен легкой цепи - вариант A

40 <400> 3

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro  
 1 5 10 15

45 Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser  
 20 25 30



Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser  
 35 40 45  
 5  
 Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro  
 50 55 60  
 10 Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala  
 65 70 75 80  
 15 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 85 90 95  
 20 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser  
 100 105 110  
 Lys Trp Pro Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Ser Val Ser  
 115 120 125  
 25 Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser  
 130 135 140  
 30 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp  
 145 150 155 160  
 35 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr  
 165 170 175  
 40 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr  
 180 185 190  
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln  
 195 200 205  
 45 Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp  
 210 215 220

5 Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro  
 225 230 235 240  
  
 Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro  
 245 250 255  
  
 10 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr  
 260 265 270  
  
 15 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn  
 275 280 285  
  
 20 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg  
 290 295 300  
  
 25 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val  
 305 310 315 320  
  
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser  
 325 330 335  
  
 30 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys  
 340 345 350  
  
 35 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp  
 355 360 365  
  
 40 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe  
 370 375 380  
  
 45 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu  
 385 390 395 400  
  
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe

	405	410	415
5	Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly 420	425	430
10	Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr 435	440	445
15	Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 450	455	
	<210> 4		
	<211> 243		
	<212> PRT		
	<213> Искусственная		
20	<220>		
	<223> аминокислотная последовательность легкой цепи *** (LC***) антитела <IGF-1R>, несущего замену VL-VH, в котором VL-домен легкой цепи заменен на VH- домен тяжелой цепи - вариант А		
25	<400> 4		
30	Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly 1 5 10 15		
	Val Gln Cys Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln 20 25 30		
35	Pro Gly Arg Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe 35 40 45		
40	Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu 50 55 60		
45	Glu Trp Val Ala Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala 65 70 75 80		

- 59 -

	Asp	Ser	Val	Arg	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn
					85					90					95	
5	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val
				100					105					110		
10	Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Glu	Leu	Gly	Arg	Arg	Tyr	Phe	Asp	Leu	Trp	Gly
			115					120					125			
15	Arg	Gly	Thr	Leu	Val	Glu	Ser	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val
		130						135					140			
20	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser
	145					150					155					160
25	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln
					165					170					175	
30	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu
			195					200						205		
35	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu
		210					215					220				
40	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg
	225					230					235					240
45	Gly Glu Cys															
	<210> 5															
	<211> 557															
	<212> PRT															

- 60 -

<213> Искусственная

<220>

<223> аминокислотная последовательность эктодомена IGF-1R, несущего метку, которая представляет собой His-стрептавидин-связывающий пептид (ECD IGF-1R-His-SBP )

<400> 5

10 Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu  
1 5 10 15

15 Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile  
20 25 30

20 Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg  
35 40 45

Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile  
50 55 60

25 Ser Lys Ala Glu Asp Tyr Arg Ser Tyr Arg Phe Pro Lys Leu Thr Val  
65 70 75 80

30 Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu  
85 90 95

35 Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe  
100 105 110

Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile  
115 120 125

40 Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu  
130 135 140

45 Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile  
145 150 155 160

5 Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys  
 165 170 175  
 10 Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys  
 180 185 190  
 15 Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr  
 195 200 205  
 20 Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys Ser  
 225 230 235 240  
 25 Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr  
 245 250 255  
 30 Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu  
 260 265 270  
 35 Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met  
 290 295 300  
 40 Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr  
 305 310 315 320  
 45 Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys  
 325 330 335  
 Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly

- 62 -

			340					345							350	
5	Cys	Thr	Ile	Phe	Lys	Gly	Asn	Leu	Leu	Ile	Asn	Ile	Arg	Arg	Gly	Asn
			355					360							365	
10	Asn	Ile	Ala	Ser	Glu	Leu	Glu	Asn	Phe	Met	Gly	Leu	Ile	Glu	Val	Val
			370					375						380		
15	Thr	Gly	Tyr	Val	Lys	Ile	Arg	His	Ser	His	Ala	Leu	Val	Ser	Leu	Ser
			385				390					395				400
20	Phe	Leu	Lys	Asn	Leu	Arg	Leu	Ile	Leu	Gly	Glu	Glu	Gln	Leu	Glu	Gly
					405					410						415
25	Asn	Tyr	Ser	Phe	Tyr	Val	Leu	Asp	Asn	Gln	Asn	Leu	Gln	Gln	Leu	Trp
				420						425					430	
30	Asp	Trp	Asp	His	Arg	Asn	Leu	Thr	Ile	Lys	Ala	Gly	Lys	Met	Tyr	Phe
				435						440					445	
35	Ala	Phe	Asn	Pro	Lys	Leu	Cys	Val	Ser	Glu	Ile	Tyr	Arg	Met	Glu	Glu
				450				455							460	
40	Val	Thr	Gly	Thr	Lys	Gly	Arg	Gln	Ser	Lys	Gly	Asp	Ile	Asn	Thr	Arg
				465			470					475				480
45	Asn	Asn	Gly	Glu	Arg	Ala	Ser	Cys	Glu	Ser	Asp	Val	Ala	Ala	Ala	Leu
					485						490					495
50	Glu	Val	Leu	Phe	Gln	Gly	Pro	Gly	Thr	His	His	His	His	His	His	Ser
				500						505						510
55	Gly	Asp	Glu	Lys	Thr	Thr	Gly	Trp	Arg	Gly	Gly	His	Val	Val	Glu	Gly
				515						520						525

- 63 -

Leu Ala Gly Glu Leu Glu Gln Leu Arg Ala Arg Leu Glu His His Pro  
 530 535 540

5 Gln Gly Gln Arg Glu Pro Ser Gly Gly Cys Lys Leu Gly  
 545 550 555

<210> 6  
 10 <211> 471  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная

<220>  
 15 <223> аминокислотная последовательность тяжелой цепи антитела к  
 ангиопоэтину-2 <ANGPT2> дикого типа

<400> 6

20 Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly  
 1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln  
 25 20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
 35 40 45

30 Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60

35 Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala  
 65 70 75 80

40 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn  
 85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
 45 100 105 110



- 64 -

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Leu Leu Asp Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr  
 115 120 125  
 5 Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr  
 130 135 140  
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser  
 10 145 150 155 160  
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu  
 15 165 170 175  
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His  
 180 185 190  
 20 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser  
 195 200 205  
 25 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys  
 210 215 220  
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu  
 30 225 230 235 240  
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 35 245 250 255  
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 260 265 270  
 40 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
 275 280 285  
 45 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 290 295 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr  
 305 310 315 320

5

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
 325 330 335

10

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu  
 340 345 350

15

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
 355 360 365

20

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys  
 370 375 380

25

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
 385 390 395 400

30

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
 405 410 415

35

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
 420 425 430

40

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser  
 435 440 445

45

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
 450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 465 470

<210> 7  
 <211> 219

- 66 -

<212> PRT  
 <213> Искусственная

<220>  
 5 <223> аминокислотная последовательность легкой цепи антитела к ангиопозтину-2 <ANGPT2> дикого типа

<400> 7

10 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
 15 20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 20 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

25 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

30 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly  
 85 90 95

Thr His Trp Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 35 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
 40 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
 130 135 140

45 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 165 170 175  
 5

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
 180 185 190

10  
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
 195 200 205

15 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210 215

<210> 8  
 20 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная

<220>  
 25 <223> аминокислотная последовательность СН3-домена («выступы») с  
 заменой Т366W для применения в технологии «knobs-into-holes»

<400> 8

30 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu  
 1 5 10 15

35 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe  
 20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu  
 35 40 45  
 40

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe  
 50 55 60

45 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly  
 65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr  
 85 90 95  
 5  
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 100 105  
 10  
 <210> 9  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная  
 15  
 <220>  
 <223> аминокислотная последовательность СН3-домена («впадина») с  
 заменой Т366S, L368A, Y407V для применения в технологии «knobs-into-  
 holes»  
 20  
 <400> 9  
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp  
 1 5 10 15  
 25  
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe  
 20 25 30  
 30  
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu  
 35 40 45  
 35  
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe  
 50 55 60  
 40  
 Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly  
 65 70 75 80  
 45  
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr  
 85 90 95  
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

	100	105
	<210> 10	
5	<211> 440	
	<212> PRT	
	<213> Искусственная	
	<220>	
10	<223> аминокислотная последовательность тяжелой цепи *** (НС***)	
	антитела <IGF-1R>, несущего замену VL-VH, в котором VH- домен тяжелой	
	цепи заменен на VL-домен легкой цепи - вариант Б	
	<400> 10	
15		
	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly	
	1 5 10 15	
20		
	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr	
	20 25 30	
25		
	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile	
	35 40 45	
30		
	Tyr Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly	
	50 55 60	
35		
	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro	
	65 70 75 80	
40		
	Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Lys Trp Pro Pro	
	85 90 95	
45		
	Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr	
	115 120 125	

- 70 -

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro  
 130 135 140

5 Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val  
 145 150 155 160

10 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175

15 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile  
 180 185 190

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val  
 195 200 205

20 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala  
 210 215 220

25 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro  
 225 230 235 240

30 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val  
 245 250 255

35 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val  
 260 265 270

40 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln  
 275 280 285

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln  
 290 295 300

45 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala  
 305 310 315 320

- 71 -

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro  
 325 330 335

5  
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr  
 340 345 350

10  
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
 355 360 365

15  
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
 370 375 380

20  
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr  
 385 390 395 400

25  
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe  
 405 410 415

30  
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435 440

35  
 <210> 11  
 <211> 225  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная

40  
 <220>  
 <223> аминокислотная последовательность легкой цепи \*\*\* (LC\*\*\*)  
 антитела <IGF-1R>, несущего замену VL-VH, в котором VL- домен легкой  
 цепи заменена на VH- домен тяжелой цепи - вариант Б

45  
 <400> 11  
 Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15



Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 5  
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 10  
 Ala Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 15  
 Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 20  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 25  
 Ala Arg Glu Leu Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr  
 100 105 110  
 30  
 Leu Val Ser Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile  
 115 120 125  
 35  
 Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val  
 130 135 140  
 40  
 Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys  
 145 150 155 160  
 45  
 Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu  
 165 170 175  
 50  
 Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu  
 180 185 190  
 55  
 Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr

	195		200		205
5	His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu				
	210		215		220
10	Cys				
	225				
	<210> 12				
	<211> 557				
	<212> PRT				
15	<213> Искусственная				
	<220>				
20	<223> аминокислотная последовательность эктодомена IGF-1R, несущего метку, которая представляет собой His-стрептавидин-связывающий пептид (ECD IGF-1R-His-SBP )				
	<400> 12				
25	Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu				
	1	5	10		15
30	Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile				
		20	25		30
35	Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg				
		35	40		45
40	Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile				
		50	55		60
45	Ser Lys Ala Glu Asp Tyr Arg Ser Tyr Arg Phe Pro Lys Leu Thr Val				
		65	70	75	80
50	Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu				
		85	90		95

- 74 -

Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe  
 100 105 110

5 Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile  
 115 120 125

10 Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu  
 130 135 140

15 Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile  
 145 150 155 160

Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys  
 165 170 175

20 Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys  
 180 185 190

25 Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr  
 195 200 205

30 Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Thr Cys Gly Lys Arg Ala Cys  
 210 215 220

35 Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys Ser  
 225 230 235 240

Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr  
 245 250 255

40 Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu  
 260 265 270

45 Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala  
 275 280 285

- 75 -

Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met  
 290 295 300

5

Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr  
 305 310 315 320

10

Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys  
 325 330 335

15

Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly  
 340 345 350

20

Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn  
 355 360 365

25

Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val  
 370 375 380

30

Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser  
 385 390 395 400

35

Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly  
 405 410 415

40

Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu Trp  
 420 425 430

45

Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys Ala Gly Lys Met Tyr Phe  
 435 440 445

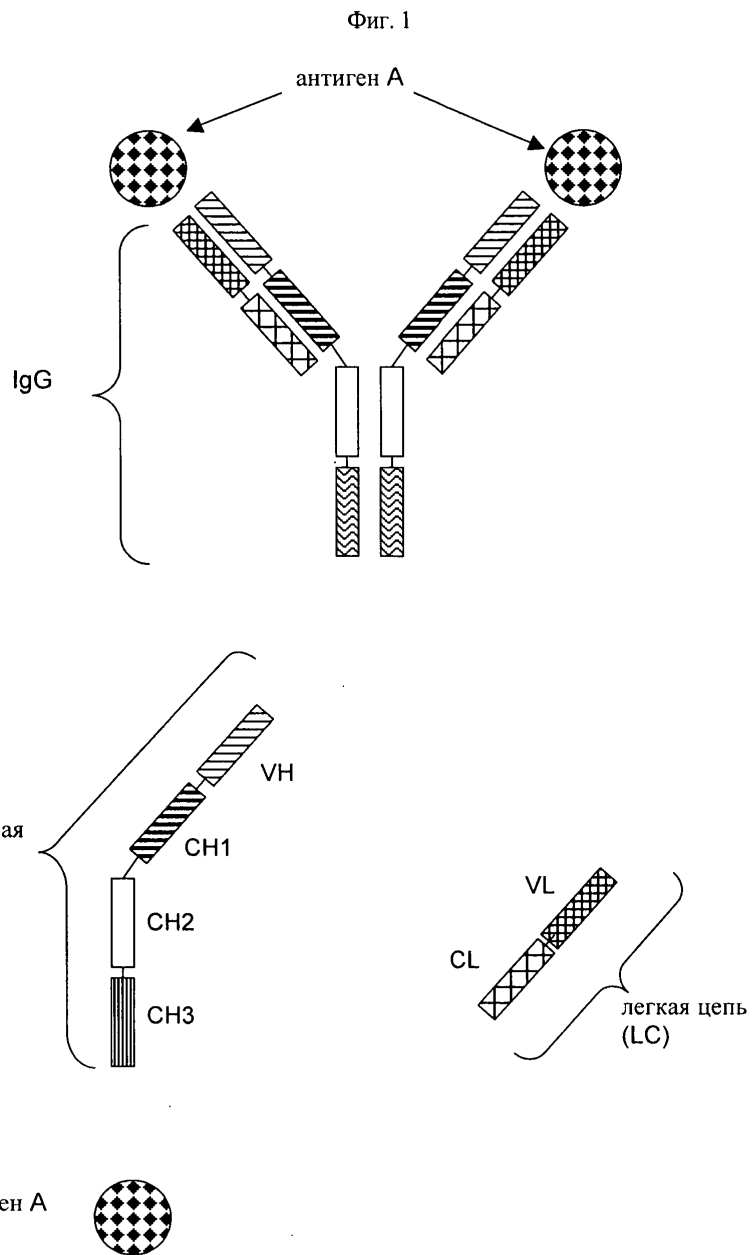
50

Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu  
 450 455 460

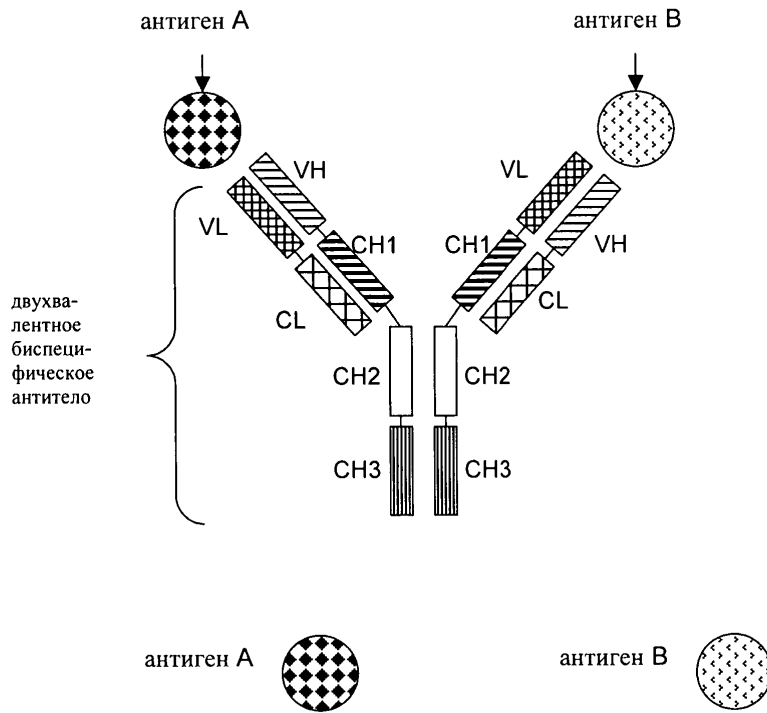
55

Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg  
 465 470 475 480

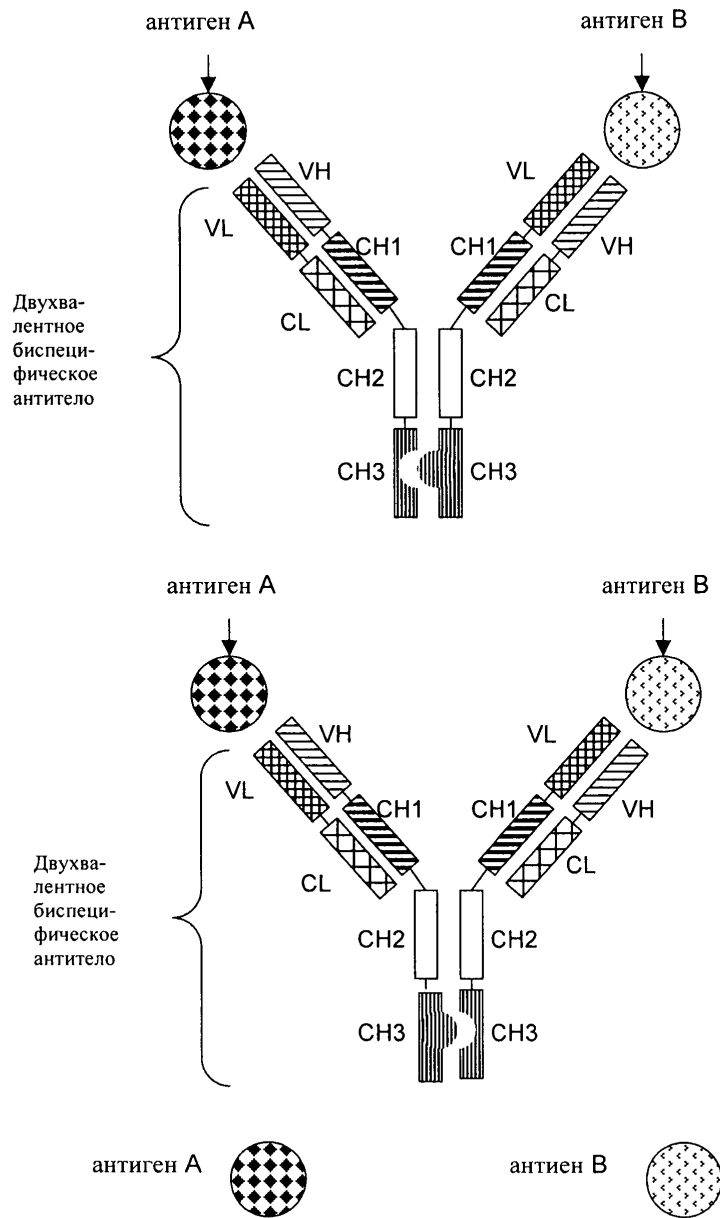
Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Ala Ala Ala Leu  
 485 490 495  
 5  
 Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro Gly Thr His His His His His His Ser  
 500 505 510  
 10  
 Gly Asp Glu Lys Thr Thr Gly Trp Arg Gly Gly His Val Val Glu Gly  
 515 520 525  
 15  
 Leu Ala Gly Glu Leu Glu Gln Leu Arg Ala Arg Leu Glu His His Pro  
 530 535 540  
 20  
 Gln Gly Gln Arg Glu Pro Ser Gly Gly Cys Lys Leu Gly  
 545 550 555



Фиг. 2

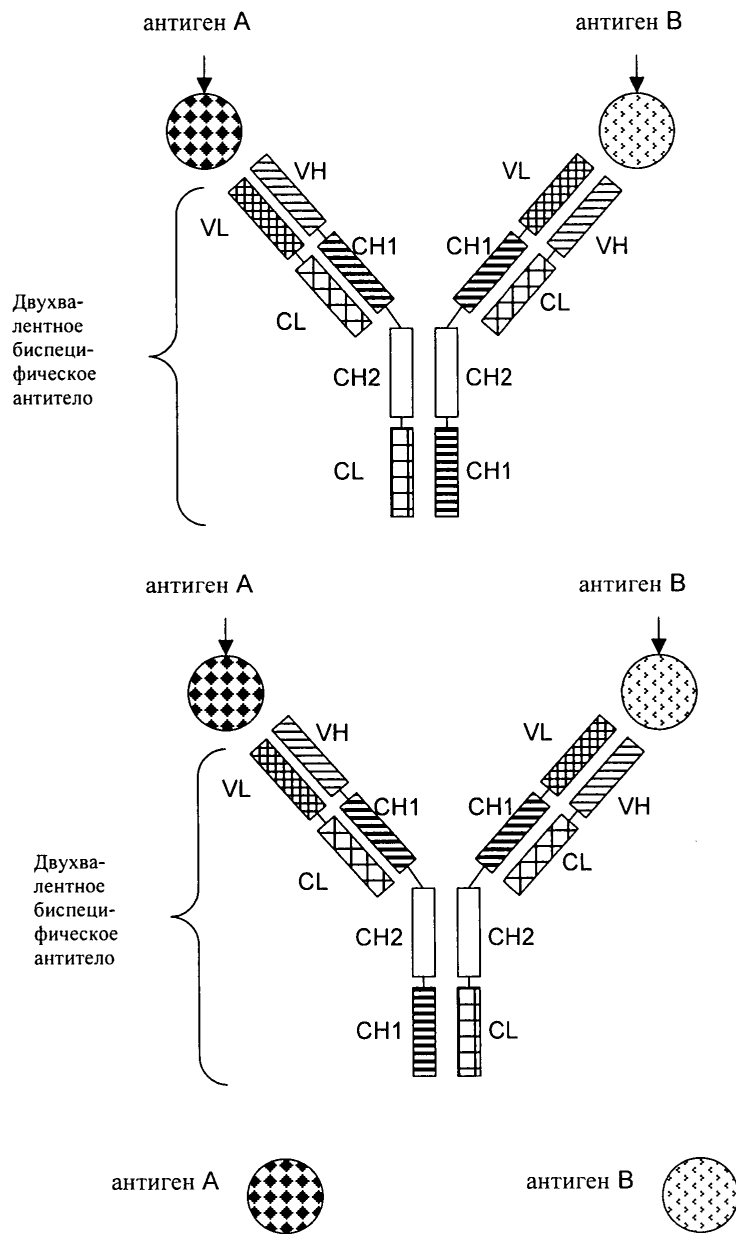


Фиг. 3

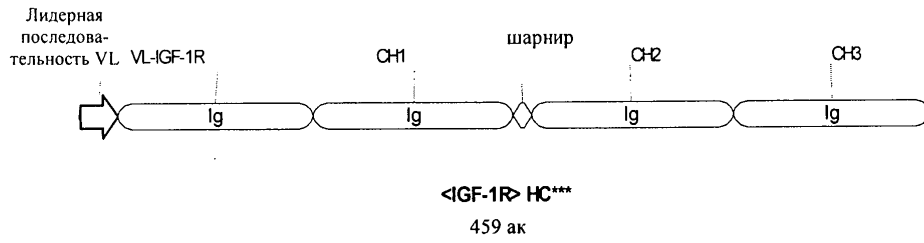




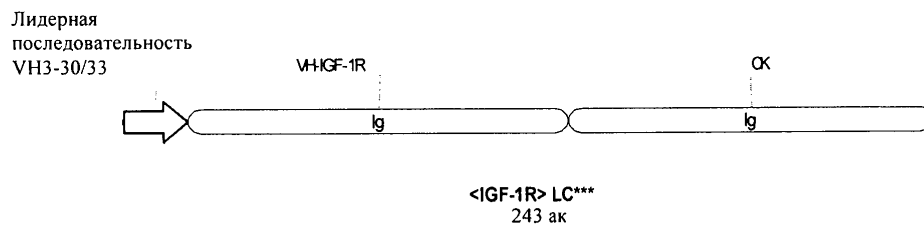
Фиг. 4

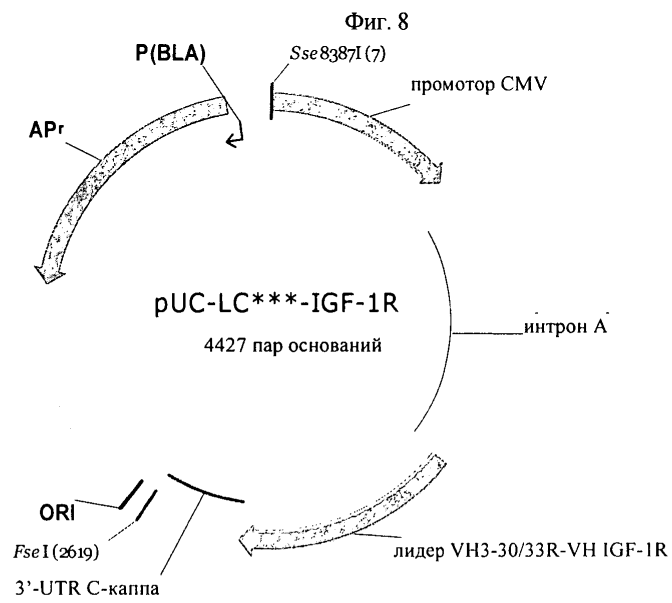
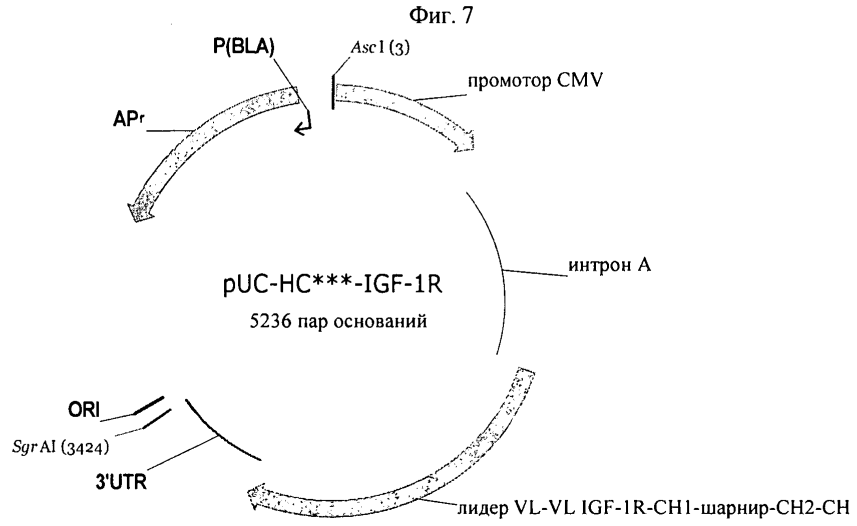


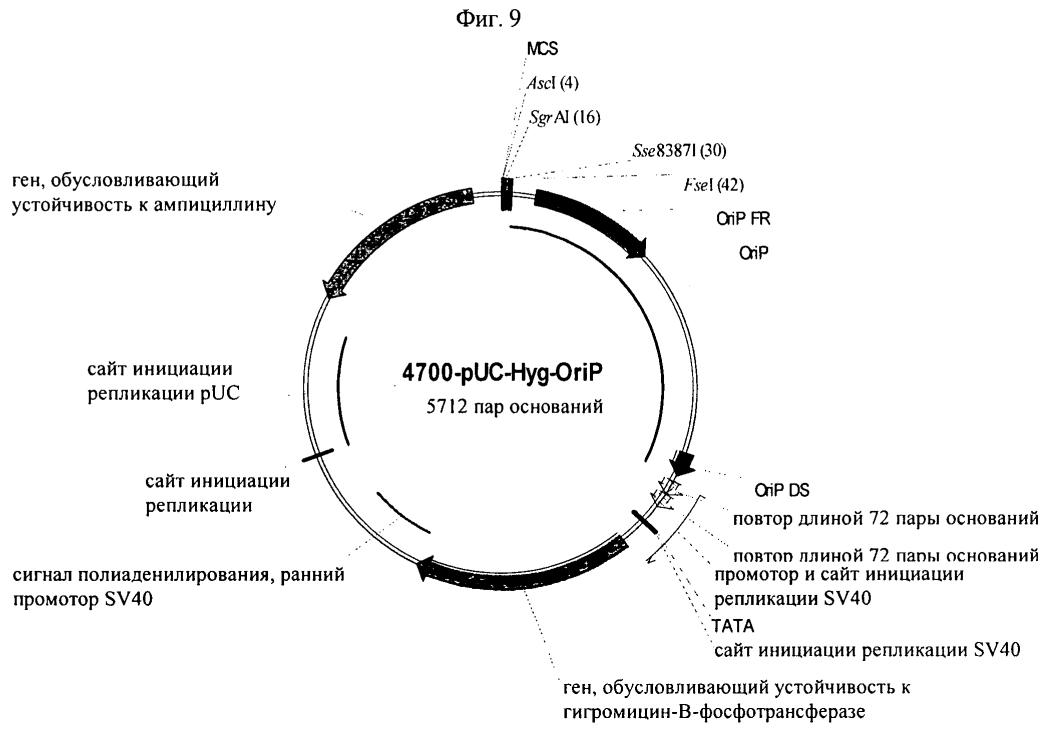
Фиг. 5



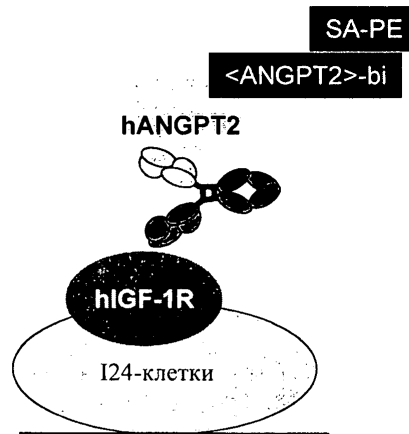
Фиг. 6



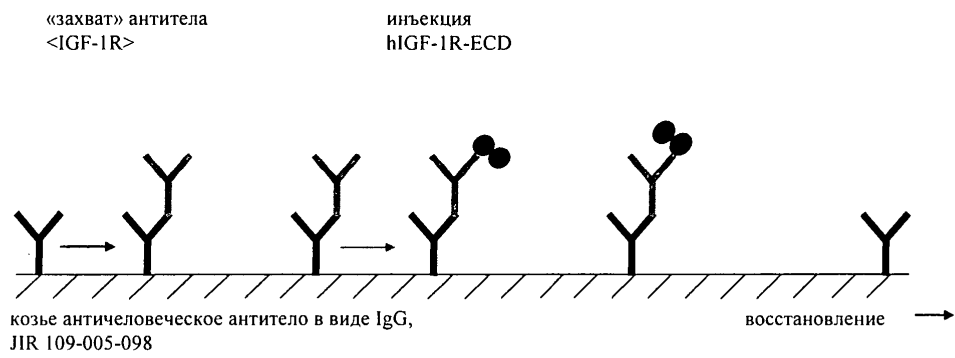




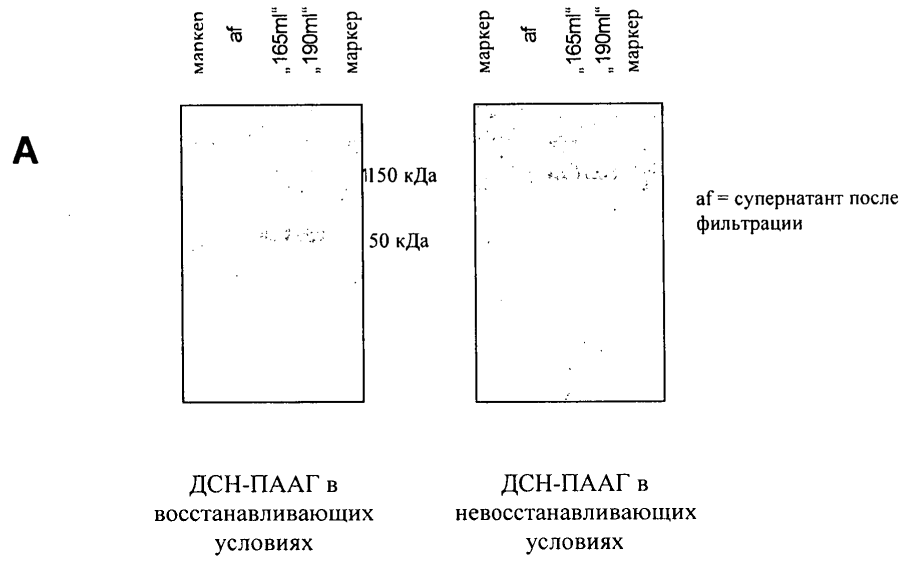
Фиг. 10



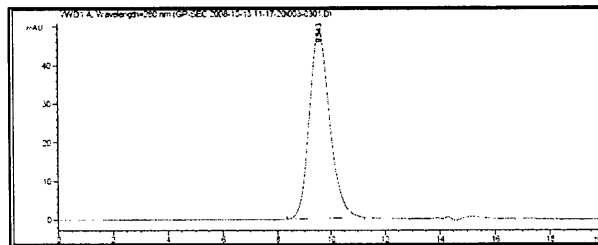
Фиг. 11



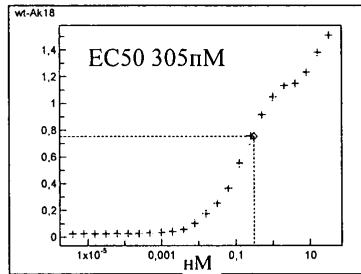
Фиг. 12



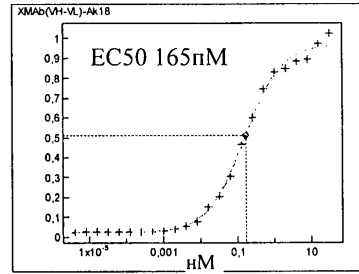
**Б**



Фиг. 13



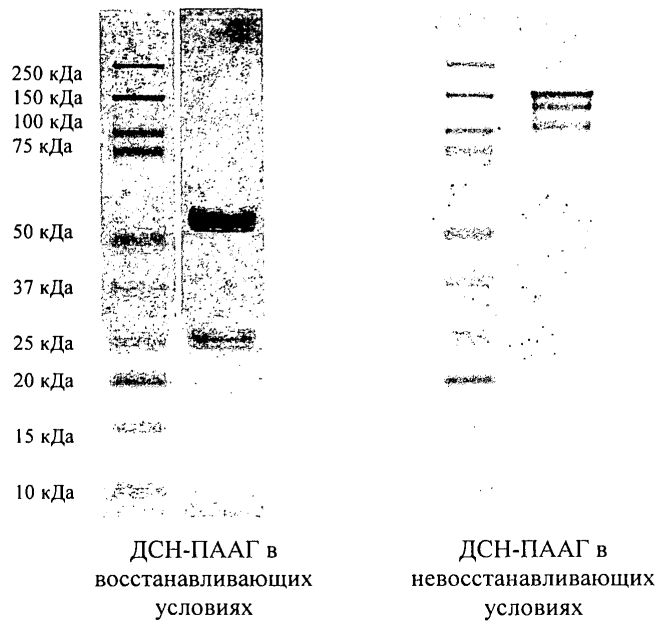
Связывание антитела <IGF-1R> дикого типа с IGF-1R-ECD



Связывание антитела <IGF-1R>, несущего замену VL-VH, с IGF-1R-ECD

Фиг. 14

**A**



Фиг. 15

