УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **111612** (13) **C2**

(51) МПК
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 1/107 (2006.01)
C07K 16/06 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **a 2013 14984**

(22) Дата подання заявки: **16.05.2012**

(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **25.05.2016**

(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **61/488,725**

(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **21.05.2011**

(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US**

(41) Публікація відомостей про заявку: **10.04.2014, Бюл.№ 7**

(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.05.2016, Бюл.№ 10**

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору PCT: **PCT/US2012/038227, 16.05.2012**

(72) Винахідник(и):
Бонвіні Ецио (US),
Барат Бхасваті (US),
Хуан Лін (US),
Джонсон Леслі С. (US)

(73) Власник(и):
МАКРОДЖЕНІКС, ІНК.,
9640 Medical Center Drive, Rockville, MD 20850, United States of America (US)

(74) Представник:
Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115

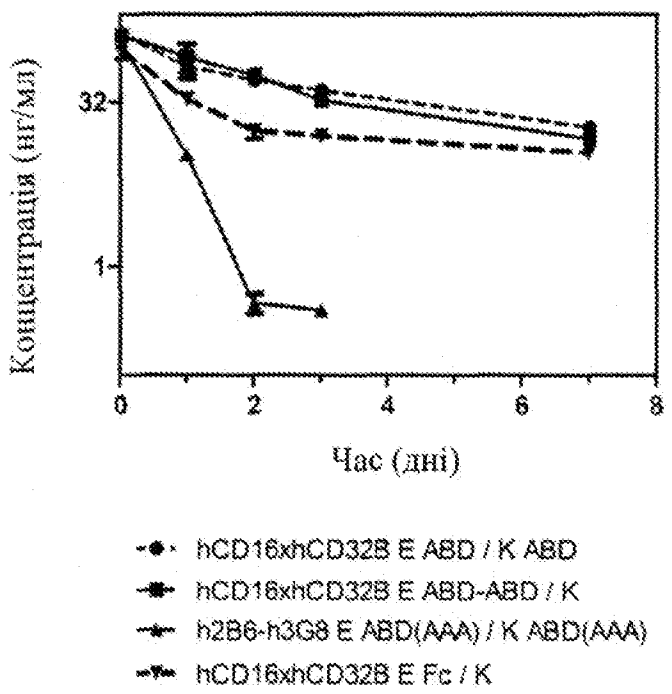
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
Stork R. et al. A novel tri-functional antibody fusion protein with improved pharmacokinetic properties generated by fusing a bispecific single-chain diabody with an albumin-binding domain from streptococcal protein G. Protein Eng Des Sel., Nov. 2007, Vol. 20, no. 11, pages 569-576
US 20080187517 A1, 07.08.2008
US 2008187517 A1, 07.08.2008
US 20100174053 A1, 08.07.2010
LILIANE G. et al. "Identification of B- and T-Cell Epitopes of BB, a Carrier Protein Derived from the G Protein of Streptococcus Strain G148", CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, 01.01.2003, vol. 10, no. 1, pages 125 - 132

UA 111612 C2

(54) ДОМЕНИ, ЯКІ ЗВ'ЯЗУЮТЬСЯ З ДЕІМУНІЗОВАНОЮ СИРОВАТКОЮ, І ЇХНЄ ЗАСТОСУВАННЯ ДЛЯ ЗБІЛЬШЕННЯ ЧАСУ НАПІВЖИТТЯ В СИРОВАТЦІ

(57) Реферат:

Винахід належить до поліпептиду, що містить частину білка, який зв'язується з деімунізованою сироваткою, здатну зв'язуватися з вказаним сироватковим білком, де вказана частина білка, що зв'язується з деімунізованою сироваткою, являє собою варіант деімунізованого альбумін-зв'язувального домену (ABD) дикого типу стрептококового G-білка, способів одержання такого поліпептиду і його застосування.


Концентрація (нг/мл)
32
1
0
2
4
6
8
Час (дні)
hCD16xhCD32B E ABD / K ABD
hCD16xhCD32B E ABD-ABD / K
h2B6-h3G8 E ABD(AAA) / K ABD(AAA)
hCD16xhCD32B E Fc / K

Фіг. 66

Перехресне посилання на споріднені заявки

У даній заявці заявляється перевага заявки на патент США реєстр. № 61/488725 (поданої 21 травня 2011 р.; на розгляді), яка у всій своїй повноті вводиться в даний опис за допомогою посилання.

Посилання на список послідовностей:

Дана заявка включає один або декілька Списків послідовностей відповідно до статті 37 Зводу федеральних правил (C.F.R.) 1.821 і далі, які представлені у вигляді текстового документа і комп'ютерного файлу, і які у всій своїй повноті вводяться в даний опис за допомогою посилання.

Передумови створення винаходу:

1. Галузь, до якої належить винахід

Даний винахід стосується поліпептиду (наприклад, антигензв'язувальної молекули), що включає поліпептидну частину білка, який зв'язується з деімунізованою сироваткою, яка здатна зв'язуватися з вказаним сироватковим білком. Присутність білка, що зв'язується із сироваткою, сприяє збільшенню часу напівжиття поліпептиду в сироватці в порівнянні з часом напівжиття цього поліпептиду, у якому відсутня поліпептидна частина білка, що зв'язується з деімунізованою сироваткою. Даний винахід також стосується способів одержання таких молекул і їх застосування.

Даний винахід, зокрема, стосується молекул діатіл, які іноді називаються "перенацілювальні реагенти з подвійною афінністю" ("DART"), і їхнього застосування для лікування ряду захворювань і розладів, включаючи імунологічні розлади і рак. Молекули діатіл відповідно до винаходу включають щонайменше два поліпептидні ланцюги, зв'язані так, що вони утворюють щонайменше два епітоп-зв'язувальні сайти, що можуть розпізнавати ті самі або різні епітопи. Крім того, ці епітопи можуть походити від тих самих або від різних молекул, або вони можуть знаходитися на тих самих або на різних клітинах. Окремі поліпептидні ланцюги молекул діатіл можуть бути ковалентно зв'язані непептидними ковалентними зв'язками, такими як, але не обмежуються ними, дисульфідні зв'язки з цистеїнових залишків, розташованих на кожному поліпептидному ланцюзі. У конкретних варіантах винаходу молекули діатіл відповідно до винаходу також містять Fc-ділянку, яка має антитіло-подібні функціональні властивості, що підходять для конструювання такої молекули.

2. Опис попереднього рівня техніки

Конструювання ковалентно зв'язаних діатіл здійснюють на основі одноланцюжкової Fv-конструкції (scFv) (Holliger et al. (1993) "Diabodies": Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; ця публікація у всій своїй повноті вводиться в даний опис за допомогою посилання). У інтактному немодифікованому IgG домени VL і VH розташовані на окремих поліпептидних ланцюгах, тобто на легкому ланцюзі і важкому ланцюзі, відповідно. Взаємодія легкого і важкого ланцюгів антитіла, зокрема, взаємодія доменів VL і VH, приводить до утворення одного з епітоп-зв'язувальних сайтів антитіла. На противагу цьому, scFv-конструкція включає VL- і VH-домени антитіла, що містяться в одному поліпептидному ланцюзі, де вказані домени розділені гнучким лінкером, який має довжину, достатню для самозбирання двох доменів в один функціональний епітоп-зв'язувальний сайт. У випадку, коли самозбирання неможливе через недостатню довжину лінкера (приблизно менше ніж 12 амінокислотних залишків), то дві scFv-конструкції піддавали взаємодії одна з одною з утворенням двовалентних молекул, тобто VL одиного ланцюга, зв'язаного з VH іншого ланцюга (див. огляд Marvin et al. (2005) "Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies" Acta Pharmacol. Sin. 26:649-658). Крім того, ймовірно, що додавання цистеїнового залишку до С-кінця конструкції приводить до утворення дисульфідного зв'язку в поліпептидних ланцюгах, що стабілізує отриманий димер і не чинить негативного впливу на зв'язувальні властивості двовалентної молекули (див., наприклад, Olafsen et al. (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications", Prot. Engr. Des. Sel. 17:21-27). Крім того, при відборі VL- і VH-доменів з різною специфічністю може бути сконструйована не тільки двовалентна, але також і біспецифічна молекула.

Двовалентні діатіла знаходять широке застосування, включаючи застосування в терапії й у імунодіагностиці. Двовалентність додає конструкції більшої гнучкості і дозволяє сконструювати діатіло, яке може мати різні застосування, де потрібна підвищена авідність відносно мультимерних антигенів, перехресне зв'язування з різними антигенами і пряма доставка в клітини конкретних типів, залежно від обох присутніх антигенів-мішеней. Фахівцям також відомо, що молекули діатіл, завдяки їхній підвищеній валентності, низькій швидкості дисоціації і швидкому кліренсу з кровотоку (у випадку діатіл невеликого розміру, а саме, ~50 кДа або менше), можуть бути, зокрема, використані для візуалізації ракової пухлини (Fitzgerald et al.

(1997) "Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In Pichia pastoris" Protein Eng. 10:1221). Особливо важливою властивістю є перехресне зв'язування різних клітин, наприклад, перехресне зв'язування цитотоксичних Т-клітин з пухлинними клітинами (Staerz et al. (1985) "Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T Cells", Nature 314:628-631, і Holliger et al. (1996) "Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody", Protein Eng. 9:299-305). Епітоп-зв'язувальні домени діатіл можуть бути також спрямовані проти поверхневої детермінанти будь-яких імунних ефекторних клітин, таких як CD3, CD16, CD32 або CD64, які експресуються на Т-лімфоцитах, природних клітинах-кілерах (NK) або інших мононуклеарних клітинах. У багатьох дослідженнях було також виявлено, що зв'язування діатіла з детермінантами ефекторних клітин, наприклад, з Fcγ-рецепторами (FcγR), приводить до активації ефекторних клітин (Holliger et al. (1996) "Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody", Protein Eng. 9:299-305; Holliger et al. (1999) "Carcinoembryonic Antigen (CEA) -Specific T-cell Activation In Colon Carcinoma Induced By Anti-CD3×Anti-CEA Bispecific Diabodies And B7×Anti-CEA Bispecific Fusion Proteins", Cancer Res. 59:2909-2916). Звичайно, активація ефекторних клітин запускається зв'язуванням антиген-зв'язаного антитіла з ефекторними клітинами за допомогою взаємодії Fc-FcγR; і відповідно до цього молекули діатіл відповідно до винаходу можуть мати Ig-подібні функціональні властивості незалежно від того, чи містять вони Fc-домен чи ні (наприклад, як було визначено в аналізі на будь-яку ефекторну функцію, відомому фахівцям або описаному в даній заявці (наприклад, в аналізі на ADCC)). При перехресному зв'язуванні пухлинних і ефекторних клітин діатіло не тільки переносить ефекторні клітини на ділянку, розташовану поблизу від пухлинних клітин, але також ефективно здійснює знищення пухлини (див., наприклад, публікацію Cao et al. (2003) "Bispecific Antibody Conjugates In Therapeutics", Adv. Drug. Deliv. Rev. 55:171-197, що у всій своїй повноті вводиться в даний опис за допомогою посилання).

2.1 Рецептори ефекторних клітин і їхня роль в імунній системі

При нормальному функціонуванні імунної системи взаємодія комплексів "антитіло-антиген" із клітинами імунної системи приводить до продукування відповідей широкого ряду, а саме, від ефекторних функцій, таких як антитіло-залежна цитотоксичність, дегрануляція тучних клітин і фагоцитоз, до виробляння імуномодулюючих сигналів, таких як сигнали регуляції проліферації лімфоцитів і секреції антитіл. Усі ці взаємодії ініціюються за допомогою зв'язування Fc-домену або антитіл імунних комплексів з поверхневими рецепторами спеціалізованих клітин, розташованими на гемопоетичних клітинах. Розмаїтість клітинних відповідей, що запускаються антитілами й імунними комплексами, обумовлено структурною гетерогенністю Fc-рецепторів. Fc-рецептори мають структурну подібність з антигензв'язувальними доменами, які переважно опосередковують передачу внутрішньоклітинного сигналу.

Fcγ-рецептори, тобто члени суперсімейства білків, які кодуються генами імуноглобулінів, являють собою поверхневі глікопротеїни, які можуть зв'язуватися з Fcγ-частиною молекул імуноглобуліну. Кожен член цього сімейства розпізнає імуноглобуліни одного або більше ізотипів за допомогою домену розпізнавання, який присутній на альфа-ланцюзі Fcγ-рецептора. Fcγ-рецептори визначаються по їхній специфічності до підтипів імуноглобулінів. Fcγ-рецептори для IgG позначаються FcγR, для IgE-FcεR і для IgA-FcαR. Різні допоміжні клітини несуть Fcγ-рецептори для антитіл різних ізотипів, і по ізотипу антитіла визначають, які саме допоміжні клітини беруть участь у вироблянні даної відповіді (див. огляд Ravetch J.V. et al. (1991) "Fc Receptors" Annu. Rev. Immunol. 9:457-92; Gerber J.S. et al. (2001) "Stimulatory And Inhibitory Signals Originating From The Macrophage Fcgamma Receptors", Microbes and Infection, 3:131-139; Billadeau D.D. et al. (2002), "ITAMs Versus ITIMs: Striking A Balance During Cell Regulation", The Journal of Clinical Investigation, 2(109):161-1681; Ravetch J.V. et al. (2000) "Immune Inhibitory Receptors" Science, 290:84-89; Ravetch J.V. et al., (2001) "IgG Fc Receptors" Annu. Rev. Immunol. 19:275-90; Ravetch J.V. (1994) "Fc Receptors: Rubor Redux" Cell, 78(4):553-60). Різні Fcγ-рецептори, клітини, які експресують ці рецептори, і специфічність до їх ізотипів систематизовані в таблиці 1 (взятій з деякими змінами з публікації Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 4th ed. 1999, Elsevier Science Ltd/Garland Publishing, New York).

Fcγ-рецептори

Кожен член цього сімейства являє собою інтегральний мембранний глікопротеїн, що має позаклітинні домени, споріднені С2-серії імуноглобулін-подібних доменів, один трансмембранний домен і один внутрішньоцитоплазматичний домен з довжиною, що варіюється. Фахівцям відомі три FcγR, які позначаються FcγRI(CD64), FcγRII(CD32) і FcγRIII(CD16). Ці три рецептори кодуються окремими генами; однак високий ступінь гомології між цими трьома членами такого сімейства дозволяє припустити, що вони, ймовірно, утворені від спільного попередника в результаті дуплікації генів.

FcγRII(CD32)

Білки FcγRII являють собою інтегральні мембранні глікопротеїни розміром 40 кДа, що зв'язуються тільки з IgG-комплексом, що зумовлено їх низькою афінністю відносно мономерного Ig (10^6 M^{-1}). Цей рецептор являє собою FcγR, який експресується у широкого кола хазяїнів і присутній на всіх гемопоетичних клітинах, включаючи моноцити, макрофаги, В-клітини, NK-клітини, нейтрофіли, гладкі клітини і тромбоцити. FcγRII має тільки дві імуноглобулін-подібні ділянки у своєму імуноглобулін-зв'язувальному ланцюгу, а тому він має набагато меншу афінність відносно IgG, ніж рецептор FcγRI. Існують три людські гени FcγRII (FcγRII-A, FcγRII-B, FcγRII-C), кожний з який зчеплений з IgG у агрегатах або в імунних комплексах.

Характерні розходження між цитоплазматичними доменами FcγRII-A і FcγRII-B продукують дві функціонально гетерогенні відповіді на зв'язування з рецептором. Фундаментальна відмінність полягає в тому, що ізоформа А ініціює внутрішньоклітинну передачу сигналу, що приводить до активації клітин, такої як фагоцитоз і "спалах" дихальної активності клітин, а ізоформа В ініціює передачу інгібуючих сигналів, наприклад, інгібування активації В-клітин.

FcγRIII (CD16)

Через гетерогенність усередині цього класу, розмір FcγRIII у мишей і людини становить від 40 до 80 кДа. Два людські гени кодують два транскрипти, FcγRIIIA, інтегральний мембранний глікопротеїн, і FcγRIIIB, тобто варіант, зв'язаний із глікозилфосфатидил-інозитом (GPI). Один мишачий ген кодує FcγRIII, гомологічний трансмембранному людському FcγRIIIA. FcγRIII має спільні структурні властивості з двома іншими FcγR. Подібно до FcγRII, FcγRIII зв'язується з IgG з низькою афінністю і містить два відповідні позаклітинні Ig-подібні домени. FcγRIIIA експресується в макрофагах і в тучних клітинах, і тільки один FcγR експресується в NK-клітинах. В даний час відомо, що GPI-зв'язаний FcγRIIIB експресується тільки в людських нейтрофілах.

Передача сигналу за допомогою FcγR

Сигнали активації і інгібування передаються за допомогою FcγR після їхнього зв'язування. Ці діаметрально протилежні функції обумовлені структурними розходженнями у рецепторів різних ізоформ. Два окремі домени в доменах, що передають цитоплазматичний сигнал рецептора, називаються імунорецепторними мотивами активації на основі тирозину (ITAM) або імунорецепторними мотивами інгібування на основі тирозину (ITIM) залежно від різних відповідей. Рекрутинг різних цитоплазматичних ферментів у ці структури залежить від типу FcγR-опосередкованих клітинних відповідей. ITAM-вмісні FcγR-комплекси включають FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIIA, а ITIM-вмісні комплекси включають тільки FcγRIIB.

Людські нейтрофіли експресують ген FcγRIIA. Кластеризація FcγRIIA за допомогою перехресного зв'язування з імунними комплексами або зі специфічним антитілом приводить до утворення агрегатів ITAM разом з кіназами, асоційованими з рецептором, що тим самим полегшує фосфорилування ITAM. Фосфорилування ITAM служить для заякорювання сайту кінази Syk, активація якої приводить до активації субстратів для наступного каскаду реакцій (наприклад, PI_3K). Активація клітин приводить до вивільнення медіаторів прозапальної відповіді.

Ген FcγRIIB експресується на В-лімфоцитах; і його позаклітинний домен на 96 % ідентичний FcγRIIA і зв'язується з IgG-комплексами незалежно від умов зв'язування. Присутність ITIM у цитоплазматичному домені FcγRIIB дозволяє визначити, до якого інгібуючого підкласу належить FcγR. Нещодавно був установлений механізм такого інгібування на молекулярному рівні. При зв'язуванні з активуючим FcγR ITIM в FcγRIIB стає фосфорилованим і контактує з SH2-доменом інозитполіфосфат-5'-фосфатази (SHIP), яка гідролізує фосфоінозитні месенджери, які вивільняються в результаті активації тирозинкінази, опосередковуваної ITAM-вмісним FcγR, що, у свою чергу, запобігає припливу внутрішньоклітинного Ca^{++}. Таким чином, перехресне зв'язування FcγRIIB послаблює активуючу відповідь на зв'язування з FcγR і інгібує клітинну чутливість. У результаті цього припиняється активація В-клітин, проліферація В-клітин і секреція антитіл.

Таблиця 1

Рецептори для Fc-ділянок ізотипів імуноглобуліну

Рецептор	Зв'язування	Тип клітин	Ефект лігування
FcγRI(CD64)	IgG1 10^6 M^{-1}	Макрофаги Нейтрофіли Еозинофіли Дендритні клітини	Підвищення стимуляції Активація "респіраторного спалаху" клітин Індукування цитолізу
FcγRII-A (CD32)	IgG1 2×10^6 M^{-1}	Макрофаги Нейтрофіли Еозинофіли Дендритні клітини Тромбоцити Клітини Лангерганса	Підвищення рівня вивільнення гранул
FcγRII-B2 (CD32)	IgG1 2×10^6 M^{-1}	Макрофаги Нейтрофіли Еозинофіли	Підвищення рівня інгібування стимуляції
FcγRII-B1 (CD32)	IgG1 2×10^6 M^{-1}	В-клітини Гладкі клітини	Відсутність підвищення рівня інгібування стимуляції
FcγRIII (CD16)	IgG1 5×10^5 M^{-1}	NK-клітини Еозинофіли Макрофаги Нейтрофіли Гладкі клітини	Індукування цитолізу
FcεRI	IgE 10^{10} M^{-1}	Гладкі клітини Еозинофіли Базофіли	Секреція гранул
FcαRI (CD89)	IgA1, IgA2 10^7 M^{-1}	Макрофаги Нейтрофіли Еозинофіли	Підвищення індукування цитолізу

3. Опис суті винаходу

Даний винахід, зокрема, стосується ковалентно зв'язаних діатіл і/або молекул ковалентно зв'язаних діатіл, і їхнього застосування для лікування ряду захворювань і розладів, включаючи рак, аутоімунні розлади, алергійні розлади й інфекційні захворювання, які викликаються бактеріями, грибами або вірусами. Переважно, діатіло відповідно до винаходу може зв'язуватися з двома різними епітопами на двох різних клітинах, де перший епітоп експресується на клітині, що належить до типу, який відрізняється від типу клітини, на якій експресується другий епітоп, у результаті чого таке діатіло може зв'язувати разом дві клітини.

Більш конкретно, даний винахід стосується поліпептиду (а зокрема, антигензв'язувальної молекули), що містить поліпептидний ланцюг, який включає частину білка, який зв'язується з деімунізованою сироваткою, здатну зв'язуватися з вказаним сироватковим білком, де вказана частина білка, що зв'язується із сироваткою, збільшує час напівжиття вказаного поліпептиду в сироватці в порівнянні з часом напівжиття вказаного поліпептиду в сироватці, у якому відсутня вказана частина вказаного білка, який зв'язується з деімунізованою сироваткою.

Даний винахід також стосується застосування (або способів застосування) такої поліпептидної частини білка, який зв'язується з деімунізованою сироваткою, з метою збільшення часу напівжиття поліпептиду, ковалентно зв'язаного з цим білком, у сироватці, де час напівжиття вказаного поліпептиду в сироватці перевищує час напівжиття антигензв'язувальної молекули в сироватці, у якій відсутній альбумін-зв'язувальний білок.

Крім того, даний винахід стосується варіанта вищеописаного поліпептиду або його застосування, де вказаний поліпептидний ланцюг містить додаткову частину білка, який зв'язується з деімунізованою сироваткою, і де частини білка, який зв'язується з деімунізованою сироваткою, мають здатність зв'язуватися із сироватковим білком.

Даний винахід, зокрема, стосується варіанта вищеописаних поліпептидів або їхнього застосування, де вказана поліпептидна частина білка, який зв'язується з деімунізованою сироваткою, являє собою альбумін-зв'язувальний домен (ABD) стрептококового білка G, або його альбумін-зв'язувальний варіант, а зокрема, де вказаний альбумін-зв'язувальний домен

(ABD) стрептококового білка G являє собою альбумін-зв'язувальний домен 3 (ABD3) білка G стрептококового штаму G148.

Даний винахід, зокрема, стосується варіанта вищеописаних поліпептидів або їхнього застосування, де вказаний альбумін-зв'язувальний домен містить:

(A) заміну валіну на аланін у положенні 71, заміну валіну на аланін у положенні 74 або заміну аспартату на аланін в положенні 79;

(B) заміну лейцину на аланін у положенні 64, заміну ізолейцину на аланін у положенні 65 і заміну валіну на аланін у положенні 71; або

(C) заміну аспарагіну на аспарагінову кислоту в положенні 66, заміну треоніну на серин у положенні 70 і заміну валіну на аланін у положенні 71.

Даний винахід також стосується варіанта вищеописаних поліпептидів або їхнього застосування, де вказаний альбумін-зв'язувальний домен має послідовність SEQ ID NO: 304, SEQ ID NO: 323, SEQ ID NO: 324, SEQ ID NO: 325, SEQ ID NO: 326, SEQ ID NO: 327, SEQ ID NO: 328 або SEQ ID NO: 329.

Даний винахід також стосується варіанта вищеописаних антигензв'язувальних молекул або їхнього застосування, де вказаною антигензв'язувальною молекулою є антигензв'язувальна молекула. Даний винахід також стосується варіанта, у якому антигензв'язувальною молекулою є діатіло, що складається щонайменше з першого і другого поліпептидних ланцюгів, які взаємодіють один з одним з утворенням двох антигензв'язувальних сайтів, де щонайменше один з поліпептидних ланцюгів містить другу поліпептидну частину, що включає частину білка, який зв'язується з деімунізованою сироваткою, здатну зв'язуватися із сироватковим білком. Даний винахід також стосується варіантів таких діатіл, у яких перший і другий поліпептидні ланцюги включають другі поліпептидні частини, що містять частину білка, який зв'язується з деімунізованою сироваткою, здатну зв'язуватися із сироватковим білком, і/або де перший і другий поліпептидні ланцюги ковалентно зв'язані один з одним.

Даний винахід, зокрема, стосується варіанта вищеописаних діатіл або їхнього застосування, де вказане діатіло зв'язується:

(A) з рецептором групи 2D (NKG2D) природних кілерів або з Т-клітинним рецептором (TCR); і

(B) з пухлиноасоційованим антигеном.

Даний винахід, зокрема, стосується варіантів усіх вищеописаних діатіл або їхнього застосування, де вказаним антигеном є антиген раку молочної залози, антиген раку яєчника, антиген раку передміхурової залози, антиген раку шийки матки, антиген карциноми підшлункової залози, антиген раку легень, антиген раку сечового міхура, антиген раку товстої кишки, антиген раку яєчок, антиген гліобластоми, антиген, асоційований зі злоякісною пухлиною В-клітин; антиген, асоційований із множинною мієломою; антиген, асоційований з неходжкінською лімфомою, або антиген, асоційований із хронічним лімфоцитарним лейкозом.

В одному зі своїх варіантів даний винахід стосується ковалентно зв'язаного біспецифічного діатіла, що містить перший і другий поліпептидні ланцюги, де вказаний перший поліпептидний ланцюг включає (i) перший домен, який містить зв'язувальну ділянку варіабельного домену легкого ланцюга першого імуноглобуліну (VL1), специфічного до першого епітопу, (ii) другий домен, який містить зв'язувальну ділянку варіабельного домену важкого ланцюга другого імуноглобуліну (VH2), специфічного до другого епітопу, і необов'язково (iii) третій домен, який містить щонайменше один цистеїновий залишок, де перший і другий домени ковалентно зв'язані один з одним так, що вказані перший і другий домени не утворюють епітоп-зв'язувальний сайт; а вказаний другий поліпептидний ланцюг включає (i) четвертий домен, який містить зв'язувальну ділянку варіабельного домену легкого ланцюга другого імуноглобуліну (VL2), (ii) п'ятий домен, який містить зв'язувальну ділянку варіабельного домену важкого ланцюга першого імуноглобуліну (VH1), і необов'язково (iii) шостий домен, який містить щонайменше один цистеїновий залишок, де вказані четвертий і п'ятий домени ковалентно зв'язані один з одним так, що вказані четвертий і п'ятий домени не утворюють епітоп-зв'язувальний сайт; і де вказані перший поліпептидний ланцюг і другий поліпептидний ланцюг ковалентно зв'язані один з одним за умови, що ковалентний зв'язок не є пептидним зв'язком; де перший домен і п'ятий домен утворюють перший зв'язувальний сайт (VL1)(VH1), який зв'язується з першим епітопом, а другий домен і четвертий домен утворюють другий зв'язувальний сайт (VL2)(VH2), що зв'язується з другим епітопом.

В іншому своєму варіанті даний винахід стосується ковалентно зв'язаного біспецифічного діатіла, що містить перший і другий поліпептидні ланцюги, де вказаний перший поліпептидний ланцюг включає (i) перший домен, який містить зв'язувальну ділянку варіабельного домену легкого ланцюга першого імуноглобуліну (VL1), специфічного до першого епітопу, (ii) другий домен, який містить зв'язувальну ділянку варіабельного домену важкого ланцюга другого

імуноглобуліну (VH2), специфічного до другого епітопу, і (iii) третій домен, який містить Fc-домен або його частину, де вказані перший і другий домени ковалентно зв'язані один з одним так, що вказані перший і другий домени не утворюють епітоп-зв'язувальний сайт; а вказаний другий поліпептидний ланцюг включає (i) четвертий домен, який містить зв'язувальну ділянку варіабельного домену легкого ланцюга другого імуноглобуліну (VL2), (ii) п'ятий домен, який містить зв'язувальну ділянку варіабельного домену важкого ланцюга першого імуноглобуліну (VH1), де вказані четвертий і п'ятий домени ковалентно зв'язані один з одним так, що вказані третій і четвертий домени не утворюють епітоп-зв'язувальний сайт; і де вказані перший поліпептидний ланцюг і другий поліпептидний ланцюг ковалентно зв'язані один з одним за умови, що ковалентний зв'язок не є пептидним зв'язком, де перший домен і п'ятий домен утворюють перший зв'язувальний сайт (VL1)(VH1), що зв'язується з першим епітопом, а другий домен і четвертий домен утворюють другий зв'язувальний сайт (VL2)(VH2), що зв'язується з другим епітопом.

У деяких своїх аспектах даний винахід стосується молекули діатіла, що містить перший і другий поліпептидні ланцюги, де вказаний перший поліпептидний ланцюг включає (i) перший домен, який містить зв'язувальну ділянку варіабельного домену легкого ланцюга першого імуноглобуліну (VL1), специфічного до першого епітопу, (ii) другий домен, який містить зв'язувальну ділянку варіабельного домену важкого ланцюга другого імуноглобуліну (VH2), специфічного до другого епітопу, і (iii) третій домен, який містить Fc-домен або його частину, де вказані перший і другий домени ковалентно зв'язані один з одним так, що вказані перший і другий домени не утворюють епітоп-зв'язувальний сайт; а вказаний другий поліпептидний ланцюг включає (i) четвертий домен, який містить зв'язувальну ділянку варіабельного домену легкого ланцюга другого імуноглобуліну (VL2), (ii) п'ятий домен, який містить зв'язувальну ділянку варіабельного домену важкого ланцюга першого імуноглобуліну (VH1), і (iii) шостий домен, який містить щонайменше один цистеїновий залишок, де вказані четвертий і п'ятий домени ковалентно зв'язані один з одним так, що вказані четвертий і п'ятий домени не утворюють епітоп-зв'язувальний сайт; і де вказані перший поліпептидний ланцюг і другий поліпептидний ланцюг ковалентно зв'язані один з одним за умови, що ковалентний зв'язок не є пептидним зв'язком; де вказані перший домен і п'ятий домен утворюють перший зв'язувальний сайт (VL1)(VH1), що зв'язується з першим епітопом, а другий домен і четвертий домен утворюють другий зв'язувальний сайт (VL2)(VH2), що зв'язується з другим епітопом.

У деяких своїх варіантах даний винахід стосується ковалентно зв'язаного біспецифічного діатіла, що являє собою димер молекул діатіла, де кожна молекула діатіла містить перший і другий поліпептидні ланцюги, де вказаний перший поліпептидний ланцюг включає (i) перший домен, який містить зв'язувальну ділянку варіабельного домену легкого ланцюга першого імуноглобуліну (VL1), специфічного до першого епітопу, (ii) другий домен, який містить зв'язувальну ділянку варіабельного домену важкого ланцюга другого імуноглобуліну (VH2), специфічного до другого епітопу, і (iii) третій домен, який містить Fc-домен або його частину, де вказані перший і другий домени ковалентно зв'язані один з одним так, що вони не утворюють епітоп-зв'язувальний сайт; а вказаний другий поліпептидний ланцюг включає (i) четвертий домен, який містить зв'язувальну ділянку варіабельного домену легкого ланцюга другого імуноглобуліну (VL2), (ii) п'ятий домен, який містить зв'язувальну ділянку варіабельного домену важкого ланцюга першого імуноглобуліну (VH1), і (iii) шостий домен, який містить щонайменше один цистеїновий залишок, де вказані четвертий і п'ятий домени ковалентно зв'язані один з одним так, що вказані четвертий і п'ятий домени не утворюють епітоп-зв'язувальний сайт; і де вказані перший поліпептидний ланцюг і другий поліпептидний ланцюг кожної молекули діатіла ковалентно зв'язані один з одним за умови, що ковалентний зв'язок не є пептидним зв'язком; де вказані перший домен і п'ятий домен кожної молекули діатіла утворюють перший зв'язувальний сайт (VL1)(VH1), що зв'язується з першим епітопом, а другий домен і четвертий домен кожної молекули діатіла утворюють другий зв'язувальний сайт (VL2)(VH2), що зв'язується з другим епітопом.

В інших своїх варіантах даний винахід стосується ковалентно зв'язаного тетраспецифічного діатіла, який являє собою димер молекул діатіла, де перша молекула діатіла містить перший і другий поліпептидні ланцюги, де вказаний перший поліпептидний ланцюг включає (i) перший домен, який містить зв'язувальну ділянку варіабельного домену легкого ланцюга першого імуноглобуліну (VL1), специфічного до першого епітопу, (ii) другий домен, який містить зв'язувальну ділянку варіабельного домену важкого ланцюга другого імуноглобуліну (VH2), специфічного до другого епітопу, і (iii) третій домен, який містить Fc-домен або його частину, де вказані перший і другий домени ковалентно зв'язані один з одним так, що вони не утворюють епітоп-зв'язувальний сайт; а вказаний другий поліпептидний ланцюг включає (i) четвертий

домен, який містить зв'язувальну ділянку варіабельного домену легкого ланцюга другого імуноглобуліну (VL2), (ii) п'ятий домен, який містить зв'язувальну ділянку варіабельного домену важкого ланцюга першого імуноглобуліну (VH1), і (iii) шостий домен, який містить щонайменше один цистеїновий залишок, де вказані четвертий і п'ятий домени ковалентно зв'язані один з одним так, що вказані четвертий і п'ятий домени не утворюють епітоп-зв'язувальний сайт; і де вказані перший поліпептидний ланцюг і другий поліпептидний ланцюг діатіла ковалентно зв'язані один з одним за умови, що ковалентний зв'язок не є пептидним зв'язком; де вказані перший домен і п'ятий домен утворюють перший зв'язувальний сайт (VL1)(VH1), що зв'язується з першим епітопом, а другий домен і четвертий домен утворюють другий зв'язувальний сайт (VL2)(VH2), що зв'язується з другим епітопом; а друга молекула діатіла містить перший і другий поліпептидні ланцюги, де вказаний перший поліпептидний ланцюг включає (i) перший домен, який містить зв'язувальну ділянку варіабельного домену легкого ланцюга третього імуноглобуліну (VL3), специфічного до третього епітопу, (ii) другий домен, який містить зв'язувальну ділянку варіабельного домену важкого ланцюга четвертого імуноглобуліну (VH4), специфічного до четвертого епітопу, і (iii) третій домен, який містить Fc-домен або його частину, де вказані перший і другий домени ковалентно зв'язані один з одним так, що вони не утворюють епітоп-зв'язувальний сайт; а вказаний другий поліпептидний ланцюг включає (i) четвертий домен, який містить зв'язувальну ділянку варіабельного домену легкого ланцюга четвертого імуноглобуліну (VL4), (ii) п'ятий домен, який містить зв'язувальну ділянку варіабельного домену важкого ланцюга третього імуноглобуліну (VH3), і (iii) шостий домен, який містить щонайменше один цистеїновий залишок, де вказані четвертий і п'ятий домени ковалентно зв'язані один з одним так, що вказані четвертий і п'ятий домени не утворюють епітоп-зв'язувальний сайт; і де вказані перший поліпептидний ланцюг і другий поліпептидний ланцюг діатіла ковалентно зв'язано один з одним за умови, що ковалентний зв'язок не є пептидним зв'язком; де вказані перший домен і п'ятий домен утворюють перший зв'язувальний сайт (VL3)(VH3), що зв'язується з третім епітопом, а другий домен і четвертий домен утворюють другий зв'язувальний сайт (VL4)(VH4), що зв'язується з четвертим епітопом.

У деяких аспектах винаходу перший епітоп, другий епітоп, а також, якщо вони присутні, третій епітоп і четвертий епітоп, можуть бути однаковими. В інших аспектах винаходу перший епітоп, другий епітоп, а також, якщо вони присутні, третій епітоп і четвертий епітоп, можуть відрізнятися один від одного. У деяких аспектах винаходу, які включають домен, який зв'язується з третім епітопом, перший епітоп і третій епітоп можуть бути однаковими. У деяких аспектах винаходу, які включають домен, який зв'язується з четвертим епітопом, перший епітоп і четвертий епітоп можуть бути однаковими. У деяких аспектах винаходу, які включають домен, що зв'язується з третім епітопом, другий епітоп і третій епітоп можуть бути однаковими. У деяких аспектах винаходу, які включають домен, що зв'язується з четвертим епітопом, другий епітоп і четвертий епітоп можуть бути однаковими. У переважних аспектах винаходу перший епітоп і другий епітоп є різними. В інших аспектах винаходу, які включають домен, що зв'язується з третім епітопом, і домен, що зв'язується з четвертим епітопом, третій епітоп і четвертий епітоп можуть бути різними. Слід зазначити, що кожна з вищевказаних комбінацій входить в обсяг даного винаходу.

У конкретних аспектах винаходу перший домен і п'ятий домен діатіла або молекули діатіла можуть походити від того самого імуноглобуліну. В іншому аспекті винаходу другий домен і четвертий домен діатіла або молекули діатіла можуть походити від того самого імуноглобуліну. В іншому аспекті винаходу перший домен і п'ятий домен діатіла або молекули діатіла можуть походити від іншого імуноглобуліну. В іншому аспекті винаходу другий домен і четвертий домен діатіла або молекули діатіла можуть походити від іншого імуноглобуліну. Слід зазначити, що кожна з вищевказаних комбінацій входить в обсяг даного винаходу.

У деяких аспектах винаходу ковалентний зв'язок між першим поліпептидним ланцюгом і другим поліпептидним ланцюгом діатіла або молекули діатіла може бути утворений за допомогою дисульфідного зв'язку між щонайменше одним цистеїновим залишком на першому поліпептидному ланцюзі і щонайменше одним цистеїновим залишком на другому поліпептидному ланцюзі. Цистеїнові залишки на першому або другому поліпептидних ланцюгах, відповідальні за утворення дисульфідного зв'язку, можуть бути присутнім на будь-якій ділянці поліпептидного ланцюга, включаючи перший, другий, третій, четвертий, п'ятий і шостий домени. У конкретному варіанті винаходу цистеїновий залишок на першому поліпептидному ланцюзі присутній в першому домені, а цистеїновий залишок на другому поліпептидному ланцюзі присутній в п'ятому домені. Перший, другий, четвертий і п'ятий домени, що відповідають варіабельним ділянкам, відповідальні за зв'язування. У переважних варіантах винаходу цистеїнові залишки, відповідальні за утворення дисульфідних зв'язків між першим і другим

поліпептидними ланцюгами, розташовані в третьому і шостому доменах, відповідно. У конкретному аспекті цього варіанта третій домен першого поліпептидного ланцюга містить 6 С-кінцевих амінокислот людського легкого ланцюга каппа, FNRGEC (SEQ ID NO: 23), що можуть входити в амінокислотну послідовність (SEQ ID NO: 17). В іншому аспекті цього варіанта шостий домен другого поліпептидного ланцюга містить 6 С-кінцевих амінокислот людського легкого ланцюга каппа, FNRGEC (SEQ ID NO: 23), що можуть входити в амінокислотну послідовність (SEQ ID NO: 17). У ще одному аспекті цього варіанта третій домен першого поліпептидного ланцюга містить амінокислотну послідовність VEPKSC (SEQ ID NO: 77), яка походить від шарнірного домену людського IgG і може кодуватися нуклеотидною послідовністю (SEQ ID NO: 78). В іншому аспекті цього варіанта шостий домен другого поліпептидного ланцюга містить амінокислотну послідовність VEPKSC (SEQ ID NO: 77), яка походить від шарнірного домену людського IgG і може кодуватися нуклеотидною послідовністю (SEQ ID NO: 78). У деяких аспектах цього варіанта третій домен першого поліпептидного ланцюга містить 6 С-кінцевих амінокислот людського легкого ланцюга каппа, FNRGEC (SEQ ID NO: 23), а шостий домен другого поліпептидного ланцюга містить амінокислотну послідовність VEPKSC (SEQ ID NO: 77). В інших аспектах цього варіанта шостий домен другого поліпептидного ланцюга містить 6 С-кінцевих амінокислот людського легкого ланцюга каппа, FNRGEC (SEQ ID NO: 23), а третій домен першого поліпептидного ланцюга містить амінокислотну послідовність VEPKSC (SEQ ID NO: 77). В інших аспектах цього варіанта третій домен першого поліпептидного ланцюга містить 6 С-кінцевих амінокислот людського легкого ланцюга каппа, FNRGEC (SEQ ID NO: 23), а шостий домен другого поліпептидного ланцюга містить шарнірний домен. В інших аспектах цього варіанта шостий домен другого поліпептидного ланцюга містить 6 С-кінцевих амінокислот людського легкого ланцюга каппа, FNRGEC (SEQ ID NO: 23), а третій домен першого поліпептидного ланцюга містить шарнірний домен. В інших аспектах цього варіанта третій домен першого поліпептидного ланцюга містить 6 С-кінцевих амінокислот людського легкого ланцюга каппа, FNRGEC (SEQ ID NO: 23), а шостий домен першого поліпептидного ланцюга містить Fc-домен або його частину. В інших аспектах цього варіанта шостий домен другого поліпептидного ланцюга містить 6 С-кінцевих амінокислот людського легкого ланцюга каппа, FNRGEC (SEQ ID NO: 23), а третій домен першого поліпептидного ланцюга містить Fc-домен або його частину.

В інших варіантах винаходу цистеїнові залишки на першому або другому поліпептиді, відповідальні за утворення дисульфідного зв'язку, можуть бути розташовані за межами першого, другого або третього доменів на першому поліпептидному ланцюзі і за межами четвертого, п'ятого і шостого доменів на другому поліпептидному ланцюзі. Зокрема, цистеїновий залишок на першому поліпептидному ланцюзі може бути N-кінцевим відносно першого домену або С-кінцевим відносно першого домену. Цистеїновий залишок на першому поліпептидному ланцюзі може бути N-кінцевим відносно другого домену або С-кінцевим відносно другого домену. Цистеїновий залишок на першому поліпептидному ланцюзі може бути N-кінцевим відносно третього домену або С-кінцевим відносно третього домену. Крім того, цистеїновий залишок на другому поліпептидному ланцюзі може бути N-кінцевим відносно четвертого домену або С-кінцевим відносно четвертого домену. Цистеїновий залишок на другому поліпептидному ланцюзі може бути N-кінцевим відносно п'ятого домену або С-кінцевим відносно п'ятого домену. Відповідно до цього цистеїновий залишок на другому поліпептидному ланцюзі може бути С-кінцевим відносно шостого домену або N-кінцевим відносно шостого домену. У конкретному аспекті винаходу дисульфідний зв'язок може бути розташований щонайменше між двома цистеїновими залишками на першому поліпептидному ланцюзі і щонайменше між двома цистеїновими залишками на другому поліпептидному ланцюзі. У конкретному аспекті винаходу, де третій домен і шостий домен не містять Fc-домен або його частини, цистеїновий залишок може знаходитися в С-кінця першого поліпептидного ланцюга й біля С-кінця другого поліпептидного ланцюга. Слід зазначити, що кожна з вищевказаних комбінацій входить в обсяг даного винаходу.

У конкретних варіантах даного винаходу, описаних вище, ковалентно зв'язане діатіло відповідно до винаходу включає димери молекул діатіл, де кожна молекула діатіла містить перший і другий поліпептидні ланцюги. У деяких аспектах цього варіанта молекули діатіла можуть бути ковалентно зв'язані один з одним з утворенням димера, за умови, що ковалентний зв'язок не є пептидним зв'язком. У переважних аспектах цього варіанта ковалентним зв'язком є дисульфідний зв'язок, розташований щонайменше між одним цистеїновим залишком на першому поліпептидному ланцюзі і щонайменше одним цистеїновим залишком кожного димера молекул діатіла. У ще більш переважних аспектах винаходу ковалентним зв'язком є дисульфідний зв'язок, розташований щонайменше між одним цистеїновим залишком на

першому поліпептидному ланцюзі і щонайменше одним цистеїновим залишком кожної молекули діатіла, що утворює димер, де вказаний щонайменше один цистеїновий залишок присутній у третьому домені кожного першого поліпептидного ланцюга.

У деяких аспектах винаходу перший домен на першому поліпептидному ланцюзі може бути N-кінцевим відносно другого домену або С-кінцевим відносно другого домену. Перший домен на першому поліпептидному ланцюзі може бути N-кінцевим відносно третього домену або С-кінцевим відносно третього домену. Другий домен на першому поліпептидному ланцюзі може бути N-кінцевим відносно першого домену або С-кінцевим відносно першого домену. Крім того, другий домен на першому поліпептидному ланцюзі може бути N-кінцевим відносно третього домену або С-кінцевим відносно третього домену. Відповідно до цього третій домен на першому поліпептидному ланцюзі може бути N-кінцевим відносно першого домену або С-кінцевим відносно першого домену. Третій домен на першому поліпептидному ланцюзі може бути N-кінцевим відносно другого домену або С-кінцевим відносно другого домену. Що стосується другого поліпептидного ланцюга, то четвертий домен може бути N-кінцевим відносно п'ятого домену або С-кінцевим відносно п'ятого домену. Четвертий домен може бути N-кінцевим відносно шостого домену або С-кінцевим відносно шостого домену. П'ятий домен на другому поліпептидному ланцюзі може бути N-кінцевим відносно четвертого домену або С-кінцевим відносно четвертого домену. П'ятий домен на другому поліпептидному ланцюзі може бути N-кінцевим відносно шостого домену або С-кінцевим відносно шостого домену. Відповідно до цього шостий домен на другому поліпептидному ланцюзі може бути N-кінцевим відносно четвертого домену або С-кінцевим відносно четвертого домену. Шостий домен на другому поліпептидному ланцюзі може бути N-кінцевим відносно п'ятого домену або С-кінцевим відносно п'ятого домену. Слід зазначити, що кожна з вищевказаних комбінацій входить в обсяг даного винаходу.

У деяких варіантах винаходу перший домен і другий домен можуть знаходитися з боку С-кінця відносно третього домену на першому поліпептидному ланцюзі, або перший домен і другий домен можуть знаходитися з боку N-кінця відносно третього домену на першому поліпептидному ланцюзі. Що стосується другого поліпептидного ланцюга, то четвертий домен і п'ятий домен можуть знаходитися з боку С-кінця відносно шостого домену, або четвертий домен і п'ятий домен можуть знаходитися з боку N-кінця відносно шостого домену. У деяких своїх аспектах цього варіанта, даний винахід стосується ковалентно зв'язаного біспецифічного діатіла, що являє собою димер молекул діатіла, кожна з яких містить перший і другий поліпептидні ланцюги, де вказаний перший поліпептидний ланцюг включає (i) перший домен, який містить зв'язувальну ділянку варіабельного домену легкого ланцюга першого імуноглобуліну (VL1), специфічного до першого епітопу, (ii) другий домен, який містить зв'язувальну ділянку варіабельного домену важкого ланцюга другого імуноглобуліну (VH2), специфічного до другого епітопу, і (iii) третій домен, який містить Fc-домен або його частину, де вказані перший і другий домени ковалентно зв'язані один з одним так, що вказані перший і другий домени не утворюють епітоп-зв'язувальний сайт, і де третій домен знаходиться з боку N-кінця відносно першого домену і другого домену, а вказаний другий поліпептидний ланцюг включає (i) четвертий домен, який містить зв'язувальну ділянку варіабельного домену легкого ланцюга другого імуноглобуліну (VL2), (ii) п'ятий домен, який містить зв'язувальну ділянку варіабельного домену важкого ланцюга першого імуноглобуліну (VH1), і (iii) шостий домен, який містить щонайменше один цистеїновий залишок, де вказані четвертий і п'ятий домени ковалентно зв'язані один з одним так, що вказані четвертий і п'ятий домени не утворюють епітоп-зв'язувальний сайт; і де вказані перший поліпептидний ланцюг і другий поліпептидний ланцюг кожної молекули діатіла ковалентно зв'язані один з одним за умови, що ковалентний зв'язок не є пептидним зв'язком; де вказані перший домен і п'ятий домен кожної молекули діатіла утворюють перший зв'язувальний сайт (VL1)(VH1), що зв'язується з першим епітопом, а другий домен і четвертий домен кожної молекули діатіла утворюють другий зв'язувальний сайт (VL2)(VH2), що зв'язується з другим епітопом.

В іншому своєму варіанті даний винахід стосується ковалентно зв'язаного тетраспецифічного діатіла, що являє собою димер молекул діатіла, де перша молекула діатіла містить перший і другий поліпептидні ланцюги, де вказаний перший поліпептидний ланцюг включає (i) перший домен, який містить зв'язувальну ділянку варіабельного домену легкого ланцюга першого імуноглобуліну (VL1), специфічного до першого епітопу, (ii) другий домен, який містить зв'язувальну ділянку варіабельного домену важкого ланцюга другого імуноглобуліну (VH2), специфічного до другого епітопу, і (iii) третій домен, який містить Fc-домен або його частину, де вказані перший і другий домени ковалентно зв'язані один з одним так, що вони не утворюють епітоп-зв'язувальний сайт; і де третій домен знаходиться з боку N-кінця відносно

першого домену і другого домену, а вказаний другий поліпептидний ланцюг включає (i) четвертий домен, який містить зв'язувальну ділянку варіабельного домену легкого ланцюга другого імуноглобуліну (VL2), (ii) п'ятий домен, який містить зв'язувальну ділянку варіабельного домену важкого ланцюга першого імуноглобуліну (VH1), і (iii) шостий домен, який містить щонайменше один цистеїновий залишок, де вказані четвертий і п'ятий домени ковалентно зв'язані один з одним так, що вказані четвертий і п'ятий домени не утворюють епітоп-зв'язувальний сайт; і де вказані перший поліпептидний ланцюг і другий поліпептидний ланцюг діатіла ковалентно зв'язані один з одним за умови, що вказаний ковалентний зв'язок не є пептидним зв'язком; де вказані перший домен і п'ятий домен утворюють перший зв'язувальний сайт (VL1)(VH1), що зв'язується з першим епітопом, а другий домен і четвертий домен утворюють другий зв'язувальний сайт (VL2)(VH2), що зв'язується з другим епітопом; де друга молекула діатіла містить перший і другий поліпептидний ланцюг, і де вказаний перший поліпептидний ланцюг включає (i) перший домен, який містить зв'язувальну ділянку варіабельного домену легкого ланцюга третього імуноглобуліну (VL3), специфічного до третього епітопу, (ii) другий домен, який містить зв'язувальну ділянку варіабельного домену важкого ланцюга четвертого імуноглобуліну (VH4), специфічного до четвертого епітопу, і (iii) третій домен, який містить Fc-домен або його частину, де вказані перший і другий домени ковалентно зв'язані один з одним так, що вказані перший і другий домени не утворюють епітоп-зв'язувальний сайт; і де третій домен знаходиться з боку N-кінця відносно першого домену і другого домену, а вказаний другий поліпептидний ланцюг включає (i) четвертий домен, який містить зв'язувальну ділянку варіабельного домену легкого ланцюга четвертого імуноглобуліну (VL4), (ii) п'ятий домен, який містить зв'язувальну ділянку варіабельного домену важкого ланцюга третього імуноглобуліну (VH3), і (iii) шостий домен, який містить щонайменше один цистеїновий залишок, де вказані четвертий і п'ятий домени ковалентно зв'язані один з одним так, що вказані четвертий і п'ятий домени не утворюють епітоп-зв'язувальний сайт; і де вказані перший поліпептидний ланцюг і другий поліпептидний ланцюг діатіла ковалентно зв'язані один з одним за умови, що ковалентний зв'язок не є пептидним зв'язком; де вказані перший домен і п'ятий домен утворюють перший зв'язувальний сайт (VL3)(VH3), що зв'язується з третім епітопом, а другий домен і четвертий домен утворюють другий зв'язувальний сайт (VL4)(VH4), що зв'язується з четвертим епітопом.

Як обговорювалося вище, домени на окремих поліпептидних ланцюгах є ковалентно зв'язаними. У конкретних аспектах винаходу ковалентний зв'язок між першим і другим доменом, першим і третім доменом, другим і третім доменом, четвертим і п'ятим доменом, четвертим і шостим доменом і/або п'ятим і шостим доменом може являти собою пептидний зв'язок. Зокрема, перший і другий домени, і четвертий і п'ятий домени можуть бути розділені третіми доменом і шостими доменом, відповідно, або додатковими амінокислотними залишками, за умови, що перший і другий домени, і четвертий і п'ятий домени не утворюють зв'язувальний сайт. Число амінокислотних залишків може становити 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 або 9 амінокислотних залишків. В одному з переважних аспектів винаходу число амінокислотних залишків між доменами дорівнює 8.

У деяких аспектах винаходу домени першого і другого поліпептидних ланцюгів, що містять Fc-домен, тобто, необов'язково третій і шостий домени, відповідно, можуть також включати шарнірний домен, який містить шарнірну ділянку-Fc-ділянку. В альтернативних варіантах винаходу перший поліпептидний ланцюг або другий поліпептидний ланцюг можуть містити шарнірний домен, що також не включає Fc-домен. Важкі ланцюги, легкі ланцюги, шарнірні ділянки, Fc-домени і/або шарнірні ділянки-Fc-домени, використовувані в даному винаході, можуть походити від імуноглобуліну будь-якого типу, включаючи IgA, IgD, IgE, IgG або IgM. У переважному аспекті винаходу імуноглобулін належить до типу IgG, або до будь-якого його підтипу, тобто IgG_1, IgG_2, IgG_3 або IgG_4. В інших аспектах винаходу імуноглобулін, від якого походять легкі і важкі ланцюги, є гуманізованим або химерним.

Крім того, перший і другий епітопи, і, якщо вони присутні, то третій і четвертий епітопи, з якими зв'язуються діатіло або молекула діатіла, можуть являти собою різні епітопи того самого антигену або різні епітопи різних антигенів. Антигени можуть являти собою будь-яку молекулу, проти якої може вироблятися антитіло. Так, наприклад, такими молекулами є білки, нуклеїнові кислоти, бактеріальні токсини, маркери клітинної поверхні, аутоімунні маркери, вірусні білки, лікарські засоби і т. п. У конкретних аспектах винаходу щонайменше один епітоп-зв'язувальний сайт діатіла є специфічним до антигену на конкретній клітині, такій як В-клітина, Т-клітина, фагоцит, природна клітина-кілер (NK) або дендритна клітина.

У деяких аспектах варіанта даного винаходу, щонайменше один епітоп-зв'язувальний сайт діатіла або молекули діатіла є специфічним до Fc-рецептора, де вказаний Fc-рецептор може

являти собою активуючий Fc-рецептор або інгібуючий Fc-рецептор. У конкретних аспектах винаходу Fc-рецептором є Fcγ-рецептор, а Fcγ-рецептором є FcγRI-, FcγRII- або FcγRIII-рецептор. У більш переважних аспектах винаходу FcγRIII-рецептором є рецептор FcγRIIIA (CD16A) або рецептор FcγRIIIB (CD16B), а більш переважно FcγRIII-рецептором є рецептор FcγRIIIA (CD16A). В іншому переважному аспекті винаходу FcγRII-рецептор являє собою рецептор FcγRIIA (CD32A) або рецептор FcγRIIB (CD32B), а більш переважно рецептор FcγRIIB (CD32B). В особливо переважному аспекті винаходу один зв'язувальний сайт діатіла є специфічним до CD32B, а інший зв'язувальний сайт є специфічним до CD16A. У конкретному варіанті винаходу щонайменше один епітоп-зв'язувальний сайт діатіла або молекули діатіла є специфічним до активуючого Fc-рецептора, а щонайменше один інший сайт є специфічним до інгібуючого Fc-рецептора. У деяких аспектах цього варіанта активуючим Fc-рецептором є CD32A, а інгібуючим Fc-рецептором є CD32B. В інших аспектах цього варіанта активуючим Fc-рецептором є BCR, а інгібуючим Fc-рецептором є CD32B. В інших аспектах цього варіанта активуючим Fc-рецептором є IgERI, а інгібуючим Fc-рецептором є CD32B.

У тих випадках, коли один епітоп-зв'язувальний сайт є специфічним до CD16A, домени VL і VH можуть бути ідентичними або аналогічними доменам VL і VH мишачого антитіла 3G8, послідовність якого була клонована і представлена в даному описі. В інших випадках, коли один епітоп-зв'язувальний сайт є специфічним до CD32A, домени VL і VH можуть бути ідентичними або аналогічними доменам VL і VH мишачого антитіла IV.3. В інших випадках, коли один епітоп-зв'язувальний сайт є специфічним до CD32B, домени VL і VH можуть бути ідентичними або аналогічними доменам VL і VH мишачого антитіла 2B6, послідовність якого була клонована і представлена в даному описі. Слід зазначити, що будь-які домени VL або VH антитіл 3G8, 2B6 і IV.3 можуть бути використані в будь-якій комбінації. Даний винахід також стосується біспецифічного діатіла або молекули біспецифічного діатіла, де перший епітоп є специфічним до CD32B, а другий епітоп є специфічним до CD16A.

В інших аспектах винаходу епітоп-зв'язувальні сайт може бути специфічним до патогенного антигену. Використовуваний тут патогенний антиген являє собою антиген, що викликає конкретне захворювання, яке викликається патогенами, включаючи рак, інфекцію й аутоімунне захворювання. Таким чином, патогенними антигенами можуть бути пухлинний антиген, бактеріальний антиген, вірусний антиген або аутоімунний антиген. Репрезентативними патогенними антигенами є, але не обмежуються ними, ліпополісахарид, вірусні антигени, вибрані з групи, яка складається з вірусних антигенів, які походять від вірусу імунодефіциту людини, аденовірусу, респіраторно-синцитіального вірусу, вірусу Західного Нілу (наприклад, антигени E16 і/або E53) і вірусу гепатиту; нуклеїнові кислоти (ДНК і РНК) і колаген. Переважним патогенним антигеном є нейтралізуючий антиген. У переважному аспекті винаходу, один епітоп-зв'язувальний сайт є специфічним до CD16A або CD32A, а інший епітоп-зв'язувальний сайт є специфічним до патогенного антигену, за винятком аутоімунних антигенів. В іншому переважному аспекті винаходу один епітоп-зв'язувальний сайт є специфічним до CD32B, а інший епітоп-зв'язувальний сайт є специфічним до будь-якого патогенного антигену. У конкретних варіантах винаходу молекула діатіла відповідно до винаходу зв'язується з двома різними антигенами на одній і тій же клітині, наприклад, один антигензв'язувальний сайт є специфічним до активуючого Fc-рецептору, а інший є специфічним до інгібуючого Fc-рецептору. В інших варіантах винаходу молекула діатіла зв'язується з двома різними вірус-нейтралізуючими епітопами, наприклад, такими як, але не обмежуються ними, E16 і E53 вірусу Західного Нілу.

В іншому варіанті даного винаходу діатіла відповідно до винаходу можуть бути використані для лікування ряду захворювань і розладів. Відповідно до цього, даний винахід стосується способу лікування захворювання або розладу, що включає введення пацієнту, який потребує цього, ефективного кількості ковалентно зв'язаного діатіла або молекули діатіла відповідно до винаходу, у яких щонайменше один зв'язувальний сайт є специфічним до патогенного антигену, такого як антиген, який експресується на поверхні ракових клітин або на поверхні бактерій або віріона, а щонайменше один інший зв'язувальний сайт є специфічним до Fc-рецептору, наприклад, до CD16A.

В іншому своєму варіанті даний винахід стосується способу лікування захворювання або розладу, що включає введення пацієнту, який потребує цього, ефективного кількості діатіла або молекули діатіла відповідно до винаходу, у яких щонайменше один зв'язувальний сайт є специфічним до CD32B, а щонайменше один інший зв'язувальний сайт є специфічним до CD16A.

В іншому своєму варіанті даний винахід стосується способу індукування імунологічної толерантності до патогенного антигену, де вказаний спосіб включає введення пацієнту, який

потребує цього, ефективної кількості ковалентно зв'язаного діатіла або двовалентної молекули діатіла відповідно до винаходу, у яких щонайменше один зв'язувальний сайт є специфічним до CD32B, а щонайменше один інший зв'язувальний сайт є специфічним до вказаного патогенного антигену. В аспектах цього варіанта винаходу патогенним антигеном може бути алерген або інша молекула, до яких було б бажано виробляння імунологічної толерантності, таких як білок, який експресується на трансплантованій тканині.

У ще одному своєму варіанті даний винахід стосується способу детоксифікації, де вказаний спосіб включає введення пацієнту, який потребує цього, ефективної кількості ковалентно зв'язаного діатіла або молекули діатіла відповідно до винаходу, у яких щонайменше один зв'язувальний сайт є специфічним до маркера клітинної поверхні, а щонайменше один інший зв'язувальний сайт є специфічним до токсину. У конкретних аспектах винаходу діатілом, що вводиться, відповідно до винаходу є діатіло, у якому один зв'язувальний є специфічним до маркера клітинної поверхні, такого як Fc, а інший зв'язувальний сайт є специфічним до бактеріального токсину або до лікарського засобу. В одному з аспектів винаходу маркер клітинної поверхні не присутній на еритроцитах.

Даний винахід також стосується способу збільшення часу напівжиття молекули, що містить антигензв'язувальний домен антитіла, де вказаний спосіб включає зв'язування (наприклад, пряме зв'язування або зв'язування за допомогою кон'югування, приєднання і т. п.) двох або більше альбумін-зв'язувальних доменів з молекулою. Даний винахід, зокрема, стосується варіанта такого способу, у якому зв'язування двох або більше альбумін-зв'язувальних доменів включає приєднання 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 або більше альбумін-зв'язувальних доменів до молекули, а більш конкретно, до варіанта такого способу, у якому зв'язування двох або більше альбумін-зв'язувальних доменів включає приєднання 2 альбумін-зв'язувальних доменів до молекули. Такі два або більше альбумін-зв'язувальних доменів можуть бути однаковими або різними, і переважно вони можуть бути незалежно вибрані з групи, яка складається з послідовностей SEQ ID NO: 304, SEQ ID NO: 323, SEQ ID NO: 324, SEQ ID NO: 325, SEQ ID NO: 326, SEQ ID NO: 327, SEQ ID NO: 328 або SEQ ID NO: 329. Даний винахід, зокрема, стосується варіанта таких способів, у яких два або більше альбумін-зв'язувальних доменів є однаковими, або в яких 2 альбумін-зв'язувальні домени є однаковими. Даний винахід, зокрема, стосується варіанта такого способу, у якому молекулою, що містить антигензв'язувальний домен антитіла, є діатіло.

3.1 Визначення

Якщо це не обговорено особливо, то усі використовувані тут спеціальні терміни, примітки й інші наукові терміни або термінологія мають загальноприйняті значення, зрозумілі фахівцю в галузі, до якої належить винахід. У деяких випадках терміни, що мають загальноприйняті значення, приводяться тут для зрозумілості і/або кращого розуміння винаходу, і такі приведені тут визначення термінів не повинні бути витлумачені як визначення, які істотно відрізняються від тих визначень, що, по суті, зрозумілі фахівцям. Для практичного здійснення даного винаходу можуть бути застосовані, якщо це не обговорено особливо, стандартні методи, застосовувані в молекулярній біології (включаючи методи рекомбінантних ДНК), мікробіології, біології клітини, біохімії, хімії нуклеїнових кислот і імунології, і відомі фахівцям. Такі методи докладно описані в літературі, наприклад, у публікаціях Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan et al, eds., 1999, включаючи доповнення, що вийшли до 2001 р. включно); Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel et al, eds., 1987, включаючи доповнення, що вийшли до 2001 р. включно); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, третє видання (Sambrook and Russel, 2001); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); The Immunoassay Handbook (D. Wild, ed., Stockton Press NY, 1994); Bioconjugate Techniques (Greg T. Hermanson, ed., Academic Press, 1996); Methods of Immunological Analysis (R. Masseyeff, W. H. Albert, and N. A. Staines, eds., Weinheim: VCH Verlags gesellschaft mbH, 1993), Harlow and Lane Using Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999; and Beaucage et al. eds., Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry John Wiley & Sons, Inc., New York, 2000).

Використовувані тут терміни "антитіло" і "антитіла" означають моноклональні антитіла, мультиспецифічні антитіла, людські антитіла, гуманізовані антитіла, синтетичні антитіла, химерні антитіла, поліклональні антитіла, верблюжі антитіла, одноланцюжкові Fv (scFv), одноланцюжкові антитіла, Fab-фрагменти, F(ab')-фрагменти, біспецифічні Fv (sdFv), зв'язані дисульфідним зв'язком, інтраантитіла й антиідіотипові (анти-Id) антитіла (включаючи, наприклад, анти-Id і анти-анти-id антитіла проти антитіл відповідно до винаходу) і епітоп-зв'язувальні фрагменти будь-яких перерахованих вище антитіл. Зокрема, антитілами є молекули імуноглобуліну і імунологічно активні фрагменти молекул імуноглобуліну, тобто молекули, що містять антигензв'язувальний сайт. Молекули імуноглобуліну можуть належати до

будь-якого типу (наприклад, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA і IgY), класу (наприклад, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1 і IgA_2) або підкласу.

Використовувані тут терміни "імуноспецифічно зв'язується", "імуноспецифічно розпізнає", "специфічно зв'язується", "специфічно розпізнає" і аналогічні терміни стосуються молекул, що специфічно зв'язуються з антигеном (наприклад, з епітопом або з імунним комплексом), але не зв'язуються специфічно з іншою молекулою. Молекула, що специфічно зв'язується з антигеном, може зв'язуватися з іншими пептидами або поліпептидами з більш низькою афінністю, як було визначено, наприклад, за допомогою імуноаналізів, BIAcore або інших аналізів, відомих фахівцям. Переважно, щоб молекули, що специфічно зв'язуються з антигеном, не мали здатність перехресно реагувати з іншими білками. Молекули, що специфічно зв'язуються з антигеном, можуть бути ідентифіковані, наприклад, за допомогою імуноаналізів, BIAcore або іншими методами, відомими фахівцям.

Використовуваний тут термін "імунний комплекс" означає структуру, що утворюється в тому випадку, коли щонайменше одна молекула-мішень і щонайменше один гетерологічний поліпептид, що містить Fcγ-ділянку, зв'язуються один з одним з утворенням комплексу з більш високою молекулярною масою. Прикладами імунних комплексів є комплекси "антиген-антитіло", що можуть бути розчинними або складатися з частинок (наприклад, комплекс антиген/антитіло на клітинній поверхні).

Використовувані тут терміни "важкий ланцюг", "легкий ланцюг", "варіабельна ділянка", "каркасна ділянка", "константний домен" і т. п. мають своє загальноприйняте значення, відоме фахівцям в галузі імунології, і означають домени в природних імуноглобулінах і відповідні домени синтетичних (наприклад, рекомбінантних) білків, що зв'язуються (наприклад, гуманізованих антитіл, одноланцюжкових антитіл, химерних антитіл і т. п.). Основною структурною одиницею природних імуноглобулінів (наприклад, IgG) є тетрамер, що має два легкі ланцюги і два важкі ланцюги і звичайно експресується у вигляді глікопротеїну розміром приблизно 150000 Да. Аміно-кінцева ("N") частина кожного ланцюга включає варіабельну ділянку приблизно з 100-110 або більше амінокислот, що, головним чином, відповідальні за розпізнавання антигену. Карбокси-кінцева ("C") частина кожного ланцюга означає константну ділянку, де легкі ланцюги мають один константний домен, а важкі ланцюги звичайно мають три константні домени і шарнірну ділянку. Таким чином, структура легких ланцюгів молекули IgG являє собою n-V_L-C_L-c, а структура важких ланцюгів IgG являє собою n-V_H-C_{H1}-H-C_{H2}-C_{H3}-c (де H являє собою шарнірну ділянку). Варіабельні ділянки молекули IgG складаються з гіперваріабельних ділянок (CDR, ділянок, які визначають комплементарність), що містять залишки, які контактують з антигеном і не-CDR-сегментами, що є каркасними сегментами, які, по суті, зберігають структуру і визначають положення CDR-петель (хоча деякі каркасні залишки можуть також контактувати з антигеном). Таким чином, V_L- і V_H-домени мають структуру n-FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4-c.

Що стосується зв'язувальних білків або антитіл (визначених тут загалом), то присвоєння амінокислот кожному домену здійснюють відповідно до визначень по Кебату, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 and 1991). Амінокислоти варіабельних ділянок зрілих важких і легень ланцюгів імуноглобулінів позначають по положенню амінокислоти в ланцюзі. Кебатом були описані різні амінокислотні послідовності для антитіл, ідентифікована амінокислотна консенсусна послідовність для кожної підгрупи, і кожній амінокислоті був присвоєний номер залишку. Схема нумерації по Кебату поширюється і на антитіла, не включені в його короткий посібник з вирівнювання розглянутого антитіла з однією з консенсусних послідовностей, пронумерованих по консервативних амінокислотах відповідно до нумерації Кебата. Цей метод присвоєння номерів залишкам стає традиційним у даній галузі і дозволяє легко ідентифікувати амінокислоти в еквівалентних положеннях різних антитіл, включаючи химерні або гуманізовані варіанти. Так, наприклад, амінокислота в положенні 50 легкого ланцюга людського антитіла займає положення, еквівалентне положенню 50 амінокислоти в легкому ланцюзі мишачого антитіла.

Використовуваний тут термін "важкий ланцюг" визначений як важкий ланцюг антитіла IgG. У інтактному нативному IgG важкий ланцюг містить VH-домен, CH1-домен, шарнірну ділянку, CH2-домен і CH3-домен імуноглобуліну. В описі даного винаходу залишки у важкому ланцюзі IgG пронумеровані відповідно до Європейської нумерації (EU-нумерації), як описано в публікації Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, NH1, MD (1991), що точно вводиться в даний опис за допомогою посилання. "EU-нумерація по Кебату" означає EU-нумерацію людського антитіла IgG1. Приклади амінокислотних послідовностей, що містять шарнірну ділянку, CH2- і CH3-домени людського IgG1, представлені на фіг. 1A і 1B, як описано нижче. На фіг. 1A і 1B також представлені амінокислотні послідовності шарнірної

ділянки, CH2- і CH3-доменів важких ланцюгів IgG2, IgG3 і IgG4. Амінокислотні послідовності ізотипів IgG2, IgG3 і IgG4 вирівнювали з послідовністю IgG1 шляхом уведення першого й останнього цистеїнових залишків відповідних шарнірних ділянок, які утворюють S-S зв'язки між важкими ланцюгами, у ті самі положення. У шарнірній ділянці IgG2 і IgG3 не всі залишки пронумеровані відповідно до EU-нумерації.

"Шарнірна ділянка" або "шарнірний домен" загалом визначені як фрагмент, розташований від Glu216 до Pro230 людського IgG1. Приклад амінокислотної послідовності шарнірної ділянки людського IgG1 представлений на фіг. 1A (амінокислотні залишки на фіг. 1A пронумеровані відповідно до системи нумерації Кебата). Шарнірні ділянки IgG інших ізотипів можуть бути вирівняні з послідовністю IgG1 шляхом уведення першого й останнього цистеїнових залишків, що утворюють S-S зв'язки між важкими ланцюгами, у ті самі положення, як показано на фіг. 1A.

Використовувані тут терміни "Fc-ділянка", "Fc-домен" або аналогічні терміни визначають як C-кінцеву ділянку важкого ланцюга IgG. Приклад амінокислотної послідовності, що містить людський IgG1, представлений на фіг. 1B. Хоча межі можуть варіюватися дуже незначно, як було визначено відповідно до системи нумерації Кебата, однак було встановлено, що Fc-домен розташований від амінокислоти 231 до амінокислоти 447 (амінокислотні залишки на фіг. 1B пронумеровані відповідно до системи нумерації Кебата). На фіг. 1B також представлені приклади амінокислотних послідовностей Fc-ділянок ізотипів IgG, а саме, IgG2, IgG3 і IgG4.

Fc-ділянка IgG містить два константні домени, CH2 і CH3. CH2-домен Fc-ділянки людського IgG звичайно розташований від амінокислоти 231 до амінокислоти 341, як було визначено відповідно до системи нумерації Кебата (фіг. 1B). CH3-домен Fc-ділянки людського IgG звичайно розташований від амінокислоти 342 до амінокислоти 447, як було визначено відповідно до системи нумерації Кебата (фіг. 1B). Унікальність CH2-домену Fc-ділянки людського IgG (який також називається доменом "Cγ2") полягає в тому, що він не утворює тісно зв'язану пару з іншим доменом. Точніше, два N-зв'язаних розгалужених вуглеводних ланцюги убудовані між двома CH2-доменами інтактного нативного IgG.

Використовувані тут терміни "FcγR-зв'язувальний білок", "FcγR-антитіло" і "анти-FcγR антитіло" є синонімами й означають різні імуноглобулін-подібні білки або білки, які походять від імуноглобуліну. "FcγR-зв'язувальні білки" зв'язуються з FcγR за допомогою взаємодії з V_L- і/або V_R-доменами (на відміну від Fcγ-опосередковуваного зв'язування). Прикладами FcγR-зв'язувальних білків є повністю людські, поліклональні, химерні і гуманізовані антитіла (наприклад, що містять 2 важкі і 2 легкі ланцюги), їхні фрагменти (наприклад, Fab-, Fab'-, $F(ab')_2$- і Fv-фрагменти), біфункціональні або мультифункціональні антитіла (див., наприклад, Lanzavecchia et al. (1987) "The Use Of Hybrid Hybridomas To Target Human Cytotoxic T Lymphocytes" Eur. J. Immunol. 17:105-111), одноланцюжкові антитіла (див., наприклад, Bird et al. (1988) "Single-Chain Antigen-Binding Proteins" Science 242:423-26), злиті білки (наприклад, злиті білки фагового представлення), "міні-антитіла" (див., наприклад, патент США № 5837821) і інші антигензв'язувальні білки, що містять V_L- і/або V_H-домен або його фрагмент. В одному з аспектів винаходу FcγRIIIA-зв'язувальним білком є "тетрамерне антитіло", тобто антитіло, що в основному має структуру природного IgG і містить варіабельні і константні домени, тобто два легкі ланцюги, що містять VL-домен і константний домен легкого ланцюга, і два важкі ланцюги, що містять V_H-домен, шарнірну ділянку і константні домени важкого ланцюга.

Використовуваний тут термін "антагоністи FcγR" і аналогічні терміни означають білкові і небілкові речовини, включаючи невеликі молекули, які інгібують щонайменше одну біологічну активність FcγR, наприклад, блокують передачу сигналу. Так, наприклад, молекули відповідно до винаходу блокують передачу сигналу за допомогою інгібування зв'язування IgG з FcγR.

Використовуваний тут термін "похідне", що стосується поліпептидів або білків, означає поліпептид або білок, що містить амінокислотну послідовність, яка була модифікована шляхом уведення замін, делецій або додавань амінокислотних залишків. Використовуваний тут термін "похідне" також означає поліпептид або білок, який був модифікований, наприклад, за допомогою ковалентного зв'язування молекули будь-якого типу з поліпептидом або білком. Прикладами способів модифікації антитіла є, але не обмежуються ними, глікозилування, ацетилування, ПЕГилування, фосфорилування, амідування, дериватизація відомими захисними/блокуючими групами, протеолітичне розщеплення, зв'язування з клітинним антигеном або з іншим білком і т. п. Похідне поліпептиду або білка може бути отримане шляхом хімічних модифікацій із застосуванням методів, відомих фахівцям, включаючи, але не обмежуючись ними, специфічне хімічне розщеплення, ацетилування, формілування, метаболічний синтез тунікаміцину і т. п. Крім того, похідне поліпептиду або білка має функцію, аналогічну або ідентичну функції поліпептиду або білка, від якого воно походить.

Використовуваний тут термін "похідне", що стосується небілкового похідного, означає вторинну органічну або неорганічну молекулу, що утворюється на основі структури першої органічної або неорганічної молекули. Похідне органічної молекули включає, але не обмежується ними, молекулу, модифіковану, наприклад, у результаті додавання або делеції гідроксильної, метильної, етильної, карбоксильної групи або аміногрупи. Органічна молекула може бути також етерифікованою, алкилованою і/або фосфорилованою.

Використовуваний тут термін "молекула діатіла" означає комплекс двох або більш поліпептидних ланцюгів або білків, кожні з яких містять щонайменше один V_L-домен і один V_H-домен або їхні фрагменти, де обидва домени містяться в одному поліпептидному ланцюзі. У деяких варіантах винаходу, "молекула діатіла" включає молекули, що містять Fc або шарнірну ділянку-Fc-домен. Вказані поліпептидні ланцюги в комплексі можуть бути однаковими або різними, тобто, молекула діатіла може являти собою гомомультимер або гетеромультимер. У конкретних аспектах винаходу "молекула діатіла" включає димери або тетрамери, або вказані поліпептидні ланцюги, що містять V_L- і V_H-домен. Окремі поліпептидні ланцюги, що містять мультимерні білки, можуть бути ковалентно зв'язані щонайменше з одним іншим пептидом мультимера міжланцюговими дисульфідними зв'язками.

Використовувані тут терміни "розлад" і "захворювання" є синонімами й означають патологічний стан в індивідуума. Зокрема, термін "аутоімунне захворювання" є синонімом терміна "аутоімунний розлад" і означає стан індивідуума, що характеризується ушкодженням клітин, тканин і/або органів, що викликається імунологічною реакцією індивідуума на свої власні клітини, тканини і/або органи. Термін "запальне захворювання" є синонімом терміна "запальний розлад" і означає стан індивідуума, що характеризується запаленням, а переважно хронічним запаленням. Аутоімунні розлади можуть асоціюватися, а можуть і не асоціюватися з запаленням. Крім того, запалення може викликатися, а може і не викликатися аутоімунним розладом. Таким чином, деякі розлади можуть бути охарактеризовані як аутоімунні і запальні розлади.

Використовуваний тут термін "ідентичні поліпептидні ланцюги" також означає поліпептидні ланцюги, що мають майже ідентичні амінокислотні послідовності, наприклад, включаючи ланцюги, що мають розходження в одній або більше амінокислотах, а переважно консервативні амінокислотні заміни, що не чинять значного впливу на активність двох поліпептидних ланцюгів.

Використовуваний тут термін "рак" означає новоутворення або пухлину, що утворюються в результаті аномального неконтрольованого росту клітин. Більш конкретно, використовуваний тут термін "рак" включає лейкоз і лімфоми. У деяких варіантах винаходу рак означає доброякісну пухлину, що зберігає свою локалізацію. В інших варіантах винаходу рак означає злоякісну пухлину, що проникає в прилеглі структури організму і руйнує їх, а також поширюється і на віддалені ділянки. У деяких варіантах винаходу рак асоціюється зі специфічним раковим антигеном.

Використовуваний тут термін "імуномодулюючий агент" і його варіанти означає агент, що модулює імунну систему хазяїна. У деяких варіантах винаходу імуномодулюючим агентом є імуносупресорний агент. У деяких інших варіантах винаходу імуномодулюючим агентом є імуностимулюючий агент. Імуномодулюючими агентами є, але не обмежуються ними, невеликі молекули, пептиди, поліпептиди, злиті білки, антитіла, неорганічні молекули, агенти-міметики й органічні молекули.

Використовуваний тут термін "епітоп" означає фрагмент поліпептиду або білка або небілкову молекулу, що мають антигенну або імуногенну активність у тварини, переважно в ссавця, а найбільш переважно в людини. Епітоп, який має імуногенну активність, являє собою фрагмент поліпептиду або білка, що виробляє гуморальну відповідь у тварини. Епітоп, що має антигенну активність, являє собою фрагмент поліпептиду або білка, з яким імуноспецифічно зв'язується антитіло, як може бути визначено будь-яким методом, добре відомим фахівцям, наприклад, за допомогою імуноаналізів. Антигенні епітопи необов'язково повинні бути імуногенними.

Використовуваний тут термін "фрагмент" означає пептид або поліпептид, що містить амінокислотну послідовність, яка складається щонайменше з 5 суміжних амінокислотних залишків, щонайменше з 10 суміжних амінокислотних залишків, щонайменше з 15 суміжних амінокислотних залишків, щонайменше з 20 суміжних амінокислотних залишків, щонайменше з 25 суміжних амінокислотних залишків, щонайменше з 40 суміжних амінокислотних залишків, щонайменше з 50 суміжних амінокислотних залишків, по меншій мері з 60 суміжних амінокислотних залишків, щонайменше з 70 суміжних амінокислотних залишків, щонайменше з 80 суміжних амінокислотних залишків, щонайменше з 90 суміжних амінокислотних залишків, щонайменше з 100 суміжних амінокислотних залишків, щонайменше з 125 суміжних

амінокислотних залишків, щонайменше з 150 суміжних амінокислотних залишків, щонайменше з 175 суміжних амінокислотних залишків, щонайменше з 200 суміжних амінокислотних залишків, або щонайменше з 250 суміжних амінокислотних залишків амінокислотної послідовності іншого поліпептиду. У конкретному варіанті винаходу фрагмент поліпептиду зберігає щонайменше одну функцію цього поліпептиду.

Використовувані тут терміни "нуклеїнові кислоти" і "нуклеотидні послідовності" включають молекули ДНК (наприклад, кДНК або геномну ДНК), молекули РНК (наприклад, мРНК), комбінації молекул ДНК і РНК або гібридні молекули ДНК/РНК і аналоги молекул ДНК або РНК. Такі аналоги можуть бути отримані з використанням, наприклад, нуклеотидних аналогів, якими є, але не обмежуються ними, інозин або тритиловані основи. Такі аналоги можуть також включати молекули ДНК або РНК, що містять модифіковані кістяки, які надають молекулам цінні властивості, такі як, наприклад, резистентність до нуклеаз або підвищена здатність проходити через клітинні мембрани. Нуклеїнові кислоти або нуклеотидні послідовності можуть бути одноланцюжковими і дволанцюжковими, можуть містити одноланцюжкові і дволанцюжкові частини, і можуть містити триланцюжкові частини, але переважними є дволанцюжкові ДНК.

Використовуваний тут термін "терапевтично ефективна кількість" означає кількість терапевтичного агента, достатню для терапії або лікування захворювання або розладу. Терапевтично ефективна кількість може означати кількість терапевтичного агента, достатню для уповільнення розвитку захворювання або мінімізації тяжкості захворювання, наприклад, для уповільнення прогресування раку або мінімізації поширення раку. Терапевтично ефективна кількість може також означати кількість терапевтичного агента, що буде давати терапевтичний ефект при терапії або лікуванні захворювання. Крім того, терапевтично ефективна кількість терапевтичного агента відповідно до винаходу означає кількість терапевтичного агента, узятого окремо або в комбінації з іншими терапевтичними агентами, що буде давати терапевтичний ефект при терапії або лікуванні захворювання.

Використовувані тут терміни "профілактичний агент" і "профілактичні агенти" означають будь-який(і) агент(и), який(і) може (можуть) бути використаний(і) для попередження розладу або попередження рецидивів або поширення такого розладу. Профілактично ефективна кількість може означати кількість профілактичного агента, достатню для попередження рецидивів або поширення гіперпроліферативного захворювання, а зокрема, раку, зниження або випадків захворюваності на рак пацієнтів, включаючи, але не обмежуючись ними, пацієнтів зі схильністю до розвитку гіперпроліферативного захворювання, наприклад, пацієнтів з генетичною схильністю до раку, або пацієнтів, що раніше піддавалися впливу канцерогенів. Профілактично ефективна кількість може також означати кількість профілактичного агента, що буде давати профілактичний ефект при попередженні захворювання. Крім того, профілактично ефективна кількість профілактичного агента відповідно до винаходу означає кількість профілактичного агента, узятого окремо або в комбінації з іншими агентами, що буде давати профілактичний ефект при попередженні захворювання.

Використовувані тут терміни "попереджати", "попереджуючий" і "попередження" стосуються попередження рецидивів або початку розвитку одного або більше симптомів розладу в індивідуума після введення профілактичного або терапевтичного агента.

Використовуваний тут термін "у комбінації" означає використання більше ніж одного профілактичного і/або терапевтичного агентів. При вживанні терміна "у комбінації" не мається на увазі обмеження порядку введення профілактичного і/або терапевтичного агентів індивідууму, що страждає на розлад. Перший профілактичний або терапевтичний агент може бути введений до (наприклад, за 5 хвилин, 15 хвилин, 30 хвилин, 45 хвилин, 1 годину, 2 години, 4 години, 6 годин, 12 годин, 24 години, 48 годин, 72 години, 96 годин, 1 тиждень, 2 тижні, 3 тижні, 4 тижні, 5 тижнів, 6 тижнів, 8 тижнів або 12 тижнів) уведення другого профілактичних або терапевтичного агента; або одночасно з уведенням вказаного другого профілактичного або терапевтичного агента, або після (наприклад, через 5 хвилин, 15 хвилин, 30 хвилин, 45 хвилин, 1 годину, 2 години, 4 години, 6 годин, 12 годин, 24 години, 48 годин, 72 години, 96 годин, 1 тиждень, 2 тижні, 3 тижні, 4 тижні, 5 тижнів, 6 тижнів, 8 тижнів або 12 тижнів) уведення вказаного другого профілактичного або терапевтичного агента індивідууму, що страждає на розлад.

Використовуваний тут термін "ефекторна функція" означає біохімічний процес, обумовлений взаємодією Fc-ділянки антитіла з Fc-рецептором або антигеном. Ефекторними функціями є, але не обмежуються ними, антитіло-залежна клітинно-опосередковувана цитотоксичність (ADCC), антитіло-залежний клітинно-опосередковуваний фагоцитоз (ADCP) і комплемент-залежна цитотоксичність (CDC). Ефекторними функціями є функції, що здійснюються після зв'язування з антигеном і незалежно від зв'язування з антигеном.

Використовуваний тут термін "ефекторна клітина" означає клітину імунної системи, яка експресує один або більше Fc-рецепторів і опосередковує здійснення однієї або більше ефекторних функцій. Ефекторними клітинами є, але не обмежуються ними, моноцити, макрофаги, нейтрофіли, дендритні клітини, еозинофіли, гладкі клітини, тромбоцити, В-клітини, великі гранулярні лімфоцити, клітини Лангерганса, природні клітини-кілери (NK), і ці клітини можуть походити від будь-яких організмів, таких як, але не обмежуваних ними, людина, миша, щур, кролики і мавпи.

Використовуваний тут термін "специфічно зв'язується з імунним комплексом" і аналогічні терміни стосуються молекул, що специфічно зв'язуються з імунним комплексом і не зв'язуються специфічно з іншою молекулою. Молекула, що специфічно зв'язується з імунним комплексом, може зв'язуватися з іншими пептидами або поліпептидами з більш низькою афінністю, і може бути визначена, наприклад, за допомогою імуноаналізів, BIAcore або інших аналізів, відомих фахівцям. При цьому переважно, щоб молекули, які специфічно зв'язуються з імунним комплексом, були нездатні перехресно реагувати з іншими білками. Молекули, які специфічно зв'язуються з імунним комплексом, можуть бути ідентифіковані, наприклад, за допомогою імуноаналізів, BIAcore, або іншими методами, відомими фахівцям.

Використовуваний тут термін "стабільний злитий білок" означає злитий білок, який піддається мінімального ступеня розкладання або взагалі не піддається розкладанню в процесі його продукування і/або збереження, як може бути визначено за допомогою стандартних біологічних і функціональних аналізів, відомих фахівцям, і який може зберігатися протягом тривалого періоду часу, не втрачаючи при цьому свою біологічну активність, наприклад, активність зв'язування з FcγR.

4. Короткий опис графічного матеріалу

Фіг. 1A-B. Амінокислотна послідовність CH1-ділянки, шарнірної ділянки і Fc-ділянки людського IgG

На фігурах 1(A) і (B) представлені амінокислотні послідовності шарнірного домену (A) і Fc-домену (B) людських IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4. (шарнірний домен IgG1 (SEQ ID NO: 1); шарнірний домен IgG2 (SEQ ID NO: 2); шарнірний домен IgG3 (SEQ ID NO: 3); шарнірний домен IgG4 (SEQ ID NO: 4); Fc-домен IgG1 (SEQ ID NO: 5); Fc-домен IgG2 (SEQ ID NO: 6); Fc-домен IgG3 (SEQ ID NO: 7); Fc-домен IgG1 (SEQ ID NO: 8)). Амінокислотні залишки, вказані на фігурах 1A і 1B, пронумеровані відповідно до системи нумерації EU Кебата. Послідовності ізотипів вирівнювали з послідовністю IgG1 шляхом уведення першого й останнього цистеїнових залишків відповідних шарнірних ділянок, які утворюють S-S зв'язки між важкими ланцюгами, у ті самі положення. На фігурі 1B залишки в CH2-домені позначені +, а залишки в CH3-домені позначені ~.

Фіг. 2. Схематичне представлення поліпептидних ланцюгів ковалентно зв'язаних біфункціональних діатіл

Поліпептиди ковалентно зв'язаних біфункціональних діатіл складаються з VL-домену антитіла і VH-домену антитіла, відділених один від одного коротким пептидним лінкером. Лінкер, який складається з 8 амінокислотних залишків, запобігає самозбиранню одного поліпептидного ланцюга в scFv-конструкції, і замість цього, в основному, відбувається взаємодія між VL- і VH-доменами різних поліпептидних ланцюгів. Були створені 4 конструкції (кожна конструкція зчитується з аміно-кінця ("n"), тобто з лівого краю конструкції, до карбокси-кінця ("c"), тобто на фігурі праворуч): конструкція (1) (SEQ ID NO: 9) містить n-VL-домен Hu2B6 - лінкер (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) - VH-домен Hu3G8 - і C-кінцеву послідовність (LGGC)-c; конструкція (2) (SEQ ID NO: 11) містить n-VL-домен Hu3G8 - лінкер (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) - VH-домен Hu2B6 - і C-кінцеву послідовність (LGGC)-c; конструкція (3) (SEQ ID NO: 12) містить n-VL-домен Hu3G8 - лінкер (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) - VH-домен Hu3G8 - і C-кінцеву послідовність (LGGC)-c; конструкція (4) (SEQ ID NO: 13) містить n-VL-домен Hu2B6 - лінкер (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) - VH-домен Hu2B6 - і C-кінцеву послідовність (LGGC)-c.

Фіг. 3. Аналіз афінно очищених діатіл за допомогою електрофорезу в ДСН-ПААГ

Афінно очищені діатіла піддавали ДСН-ПААГ-аналізу у відновних умовах (доріжки 1-3) або у невідновлювальних умовах (доріжки 4-6). Вказані приблизні молекулярні маси стандарту (між доріжками 3 і 4). Доріжки 1 і 4, h3G8 CMD; доріжки 2 і 5, h2B6 CMD; і доріжки 3 і 6, h2B6-h3G8 CBD.

Фіг. 4 A-B. Аналіз афінно очищених діатіл за допомогою ексклюзійної хроматографії (EX)

Афінно очищені діатіла піддавали EX-аналізу. (A) Профіль елюювання відомих стандартів: повнорозмірного IgG (~150 кДа), Fab-фрагмента IgG (~50 кДа) і scFv (~30 кДа); (B) Профіль елюювання h2B6 CMD, h3G8 CMD і h2B6-h3G8 CBD.

Фіг. 5. Зв'язування h2B6-h3G8 CBD з sCD32B і sCD16A

Зв'язування h2B6-h3G8 CBD з sCD32B і sCD16A аналізували за допомогою "сендвіч»-ELISA. sCD32B використовували як білок-мішень. Другим зондом був ПХ-кон'югований sCD16A. h3G8 CMD, яке зв'язується з CD16A, використовували як контроль.

Фіг. 6 A-C. BIACORE-аналіз на зв'язування діатіла з sCD16A, SCD32B і sCD32A

Зв'язування h2B6-h3G8 CBD, h2B6 CMD і h3G8 CMD з sCD16A, sCD32B і sCD32A (негативний контроль) аналізували за допомогою ППР-аналіза. h3G8 scFv також тестували як контроль. (A) Зв'язування з sCD16; (B) зв'язування з sCD32B і (C) зв'язування з sCD32A. Діатіла наносили шляхом інжекції в концентрації 100 нМ, а scFv - у концентрації 200 нМ, по всій поверхні рецептора зі швидкістю потоку 50 мл/хв протягом 60 секунд.

Фіг. 7 A-C. BIACORE-аналіз на зв'язування діатіла з sCD16A і sCD32B

Зв'язування h2B6-h3G8 CBD, h2B6 CMD і h3G8 CMD з sCD16A і sCD32B аналізували за допомогою ППР-аналіза. h3G8 scFv також тестували як контроль. (A) Зв'язування h3G8 CMD з sCD16A; (B) зв'язування h2B6-h3G8 CBD з sCD16A; (C) зв'язування h3G8 scFv з sCD16A; (D) зв'язування h2B6 CMD з sCD32B; і (E) зв'язування h2B6-h3G8 CBD з sCD32B. Діатіла наносили шляхом інжекції в концентраціях 6,25-200 нМ по всій поверхні рецептора зі швидкістю потоку 70 мл/хв протягом 180 секунд.

Фіг. 8. Схематичне представлення взаємодії поліпептидних ланцюгів, які містять VL- і VH-домени, з утворенням ковалентно зв'язаної біспецифічної молекули діатіла

NH_2 і COOH являють собою аміно-кінець і карбокси-кінець кожного поліпептидного ланцюга, відповідно. S являє собою С-кінцевий цистеїновий залишок на кожному поліпептидному ланцюзі. VL і VH означають варіабельний домен легкого ланцюга і варіабельний домен важкого ланцюга, відповідно. Два поліпептидні ланцюги розділені штриховими і пунктирними лініями, що, зокрема, представляють лінкерні частини вказаних ланцюгів. h2B6 Fv і h3G8 Fv означають епітоп-зв'язувальний сайт, специфічний до CD32B і CD16, відповідно.

Фіг. 9. Схематичне представлення поліпептидних ланцюгів, які містять Fc-домени ковалентно зв'язаних біспецифічних функціональних діатіл

Представлені поліпептидні конструкції молекул діатіла відповідно до винаходу (кожна конструкція зчитується з аміно-кінця ("n"), тобто з лівої сторони конструкції, до карбокси-кінця ("c"), тобто на фігурі праворуч): конструкція (5) (SEQ ID NO: 14) містить n-VL-домен Hu2B6 - перший лінкер (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) - VH-домен Hu3G8 - другий лінкер (LGGC)- і С-кінцевий Fc-домен людського IgG1-C; конструкція (6) (SEQ ID NO: 15) містить n-VL-домен Hu3G8 - лінкер (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) - VH-домен Hu2B6 - і другий лінкер (LGGC)- і С-кінцевий Fc-домен людського IgG1-c; конструкція (7) (SEQ ID NO: 16) містить n-VL-домен Hu3B6 - перший лінкер (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) - VH-домен Hu3G8 - і С-кінцеву послідовність (LGGCFNRGEC) (SEQ ID NO: 17)-c; конструкція (8) (SEQ ID NO: 18) містить n-VL-домен Hu3G8 - лінкер (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) - VH-домен Hu2B6 - другий лінкер (LGGC)- і С-кінцевий шарнірний домен/Fc-домен людського IgG1 (з амінокислотною заміною A215V)-c.

Фіг. 10. Зв'язування молекул діатіла, що містять Fc-домени, з sCD32B і sCD16A

Зв'язування молекул діатіла, що містять Fc-домени, з sCD32B і sCD16A аналізували за допомогою "сендвіч»-ELISA. Аналізовані антитіла були отримані з використанням 3 систем рекомбінантної експресії: контрансфекції pMGX669 і pMGX674, експресуючих конструкції 1 і 6, відповідно; контрансфекції pMGX667 і pMGX676, експресуючих конструкції 2 і 5, відповідно; і контрансфекції pMGX674 і pMGX676, експресуючих конструкції 5 і 6, відповідно. sCD32B використовували як білок-мішень. Другим зондом був ПХ-кон'югований sCD16A.

Фіг. 11. Схематичне представлення взаємодії двох поліпептидних ланцюгів, кожен з який містить Fc-домен, з утворенням двовалентного ковалентно зв'язаного діатіла

NH_2 і COOH являють собою аміно-кінець і карбокси-кінець кожного поліпептидного ланцюга, відповідно. S являє собою щонайменше один дисульфідний зв'язок між цистеїновими залишками в другій лінкерній послідовності кожного поліпептидного ланцюга. VL і VH означають варіабельний домен легкого ланцюга і варіабельний домен важкого ланцюга, відповідно. Два поліпептидні ланцюги розділені штриховими і пунктирними лініями, що, зокрема, представляють перші лінкерні частини вказаних ланцюгів. CH2 і CH3 означають константні CH2- і CH3-домени Fc-домену. h2B6 Fv і h3G8 Fv означають епітоп-зв'язувальний сайт, специфічний до CD32B і CD16, відповідно.

Фіг. 12. Зв'язування молекул діатіла, що містять шарнірні домени/Fc-домени, з sCD32B і sCD16A

Зв'язування молекул діатіла, що містять Fc-домени, з sCD32B і sCD16A аналізували за допомогою "сендвіч»-ELISA. Аналізовані антитіла були отримані з використанням 4 систем рекомбінантної експресії: котрансфекції pMGX669+pMGX674, експресуючих конструкції 1 і 6, відповідно; котрансфекції pMGX669+pMGX678, експресуючих конструкції 2 і 8, відповідно;

котрансфекції pMGX677+pMGX674, експресуючих конструкції 7 і 6, відповідно; і котрансфекції pMGX677+pMGX678, експресуючих конструкції 7 і 8, відповідно. sCD32B використовували як білок-мішень. Другим зондом був ПХ-кон'югований sCD16A.

Фіг. 13. Схематичне представлення взаємодії поліпептидних ланцюгів з утворенням тетрамерної молекули діатіла

NH_2 і COOH являють собою аміно-кінець і карбокси-кінець кожного поліпептидного ланцюга, відповідно. S являє собою щонайменше один дисульфідний зв'язок між цистеїновим залишком у другій лінкерній послідовності Fc-несучого "більш важкого" поліпептидного ланцюга і цистеїновим залишком у С-кінцевій послідовності, що не несе Fc, "більш легкого" поліпептидного ланцюга. VL і VH означають варіабельний домен легкого ланцюга і варіабельний домен важкого ланцюга, відповідно. Два поліпептидні ланцюги розділені штриховими і пунктирними лініями, що, зокрема, представляють перші лінкерні частини вказаних "більш важких" або ланцюгів лінкер вказаних "більш легких" ланцюгів. CH2 і CH3 означають константні CH2- і CH3-домени Fc-домену. h2B6 Fv і h3G8 Fv означають епітоп-зв'язувальний сайт, специфічний до CD32B і CD16, відповідно.

Фіг. 14. Схематичне представлення поліпептидних ланцюгів, які містять Fc-домени, що утворюють ковалентно зв'язані біспецифічні діатіла

Представлені поліпептидні конструкції, які утворюють молекули діатіла відповідно до винаходу (кожна конструкція зчитується з аміно-кінця ("n"), тобто з лівої сторони конструкції, до карбокси-кінця ("c"), тобто на фігурі праворуч): конструкція (9) (SEQ ID NO: 19) містить n-шарнірний домен/Fc-домен людського IgG1-VL-домен Hu3G8 - лінкер (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) - VH-домен Hu2B6 - лінкер (GGGSGGGG) (SEQ ID NO 10)) і С-кінцеву послідовність LGGC-з; конструкція (10) (SEQ ID NO: 20) містить n-Fc-домен людського IgG1-VL-домен Hu3G8 - лінкер (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) - VH-домен Hu2B6 - лінкер (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) - і С-кінцеву послідовність LGGC-c; конструкція (11) (SEQ ID NO: 21) містить n-VL-домен Hu2B6 (G105C) - лінкер (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) - VH-домен Hu3G8 - і С-кінцевий шарнірний домен/Fc-домен людського IgG1 з амінокислотною заміною A215V-c; конструкція (12) (SEQ ID NO: 22) містить n-VL-домен Hu3G8 - лінкер (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) - VH-домен Hu2B6 (G44C) - і С-кінцеву послідовність FNRGEC (SEQ ID NO: 23)-c.

Фіг. 15 A-B. Електрофорез у ДСН-ПААГ і вестерн-блот-аналіз афінних тетрамерних діатіл

Діатіла, продуковані з використанням систем рекомбінантної експресії, котрансфікованних векторами, експресуючими конструкції 10 і 1, конструкції 9 і 1 і конструкції 11 і 12, піддавали електрофорезу в ДСН-ПААГ у невідновлювальних умовах (A) і вестерн-блот-аналізу з використанням козячого антитіла проти людських IgG1 H+L як зонда (B). Білки в ДСН-ПААГ-гелі візуалізували з використанням синього барвника Simply Blue Safestain (Invitrogen). Для обох панелей A і B молекули діатіл, що містять конструкції 10 і 1, конструкції 9 і 1 і конструкції 11 і 12A, представлені на доріжках 1, 2 і 3, відповідно.

Фіг. 16. Зв'язування молекул діатіл, що містять Fc-домени і сконструйовані міжланцюгові дисульфідні зв'язки, з SCD32B і sCD16A

Зв'язування молекул діатіл, що містять Fc-домени і сконструйовані міжланцюгові дисульфідні зв'язку між "більш легким" і "більш важким" поліпептидними ланцюгами, з sCD32B і sCD16A, оцінювали за допомогою "сендвіч»-ELISA. Аналізовані діатіла були отримані з використанням 3 систем рекомбінантної експресії: систем, експресуючих конструкції 1 і 10; систем, експресуючих конструкції 1 і 9; і систем, експресуючих конструкції 11 і 12, відповідно. sCD32B використовували як білок-мішень. Другим зондом був ПХ-кон'югований sCD16A. Зв'язування h3G8 використовували як контроль.

Фіг. 17. Схематичне представлення поліпротеїнового попередника молекули діатіла і схематичне представлення поліпептидних ланцюгів, що містять легкий ланцюг лямбда і/або шарнірні домени

Представлені поліпептидні конструкції, що містять молекули діатіла відповідно до винаходу (кожна конструкція зчитується з аміно-кінця ("n"), тобто з лівої сторони конструкції, до карбокси-кінця ("c"), тобто на фігурі праворуч): конструкція (13) (SEQ ID NO: 95) містить n-VL-домен 3G8 - перший лінкер (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) - VH-домен 2.4G2VH - другий лінкер (LGGC) - сайт розпізнавання фурину (RAKR (SEQ ID NO: 93)) - VL-домен 2.4G2 - третій лінкер (GGGSGGG (SEQ ID NO: 10)) - VH-домен 3G8 - і С-кінцевий домен LGGC; (нуклеотидна послідовність, яка кодує SEQ ID NO: 95, представлена в SEQ ID NO: 96). Конструкція (14) (SEQ ID NO: 97) містить n-VL домен 3G8 - перший лінкер (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) - VH-домен 2.4G2VH - другий лінкер (LGGC) - сайт розпізнавання фурину (RAKR (SEQ ID NO: 93)) - сайт FMD (протеаза C3 вірусу ящуру) - VL-домен 2.4G2 - третій лінкер (GGGSGGG (SEQ ID NO: 10)) - VH домен 3G8 - і С-кінцевий домен LGGC; (нуклеотидна послідовність, яка кодує SEQ ID NO:

97, представлена в SEQ ID NO: 98). Конструкція (15) (SEQ ID NO: 99) містить n-VL-домен Hu2B6 - лінкер (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) - VH-домен Hu3G8-C-кінцевий-домен FNRGEC (SEQ ID NO: 23); (нуклеотидна послідовність, яка кодує SEQ ID NO: 99, представлена в SEQ ID NO: 100). Конструкція (16) (SEQ ID NO: 101) містить n-VL-домен Hu3G8 - лінкер (GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)) - VH-домен Hu2B6 - і C-кінцевий-домен VEPKSC (SEQ ID NO: 77); (нуклеотидна послідовність, яка кодує SEQ ID NO: 101, представлена в SEQ ID NO: 102).

Фіг. 18. Зв'язування молекул діатіл, які походять від поліпротеїнової молекули-попередника, з mCD32B і sCD16A

Зв'язування молекул діатіл, які походять від конструкції 13 поліпротеїнової молекули-попередника (SEQ ID NO: 95), з мишачим CD32B (mCD32B) і розчинним CD16A (sCD16A), аналізували за допомогою "сендвіч»-ELISA. sCD32B використовували як білок-мішень. Другим зондом був кон'югований з біотином sCD16A.

Фіг. 19. Зв'язування молекул діатіл, що містять ланцюг лямбда і/або шарнірні домени, з sCD32B і sCD16A

Зв'язування молекул діатіл, що містять домени, які походять від C-кінця людського легкого ланцюга лямбда і/або шарнірного домену IgG, з sCD32B і sCD16A, аналізували, і отримані результати порівнювали з результатами для діатіл, що містить конструкції 1 і 2 (фіг. 5), за допомогою "сендвіч»-ELISA. Аналізовані діатіла були отримані з використанням системи рекомбінантної експресії, яка експресує конструкції 15 і 16 (SEQ ID NO: 99 і SEQ ID NO: 101, відповідно). sCD32B використовували як білок-мішень. Другим зондом був ПХ-кон'югований sCD16A. Стовпці з невеликими "боксами" представляють комбінацію конструкцій 15/16, а стовпці з великими "боксами" представляють комбінацію конструкцій 1/2.

Фіг. 20. Схематичне представлення DART 2B6/4420, зв'язаних з CD32B, локалізованому на поверхні клітин, і з молекулою, кон'югованою із флуоресцеїном

На діаграмі проілюстрована гнучкість "універсального адаптера" анти-флуоресцеїнової гілки DART, а також можливість заміни гілки 2B6 на гілку з іншою специфічністю. V-ділянки представлені у вигляді боксів, лінкери GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10) показані лініями, а дисульфідний зв'язок представлений як зв'язок, що з'єднує два ланцюги. Компоненти одного ланцюга показані синім, а компоненти іншого ланцюга показані рожевим. N - аміно-кінець; C - карбокси-кінець; FL - флуоресцеїн, VL - варіабельна ділянка легкого ланцюга; VH - варіабельна ділянка важкого ланцюга.

Фіг. 21 (Панелі A і B). DART 2B6/4420 специфічно зв'язується з молекулами, кон'югованими з флуоресцеїном, і може одночасно зв'язуватися з CD32B

(A) 2B6/4420 або 2B6/3G8 були зв'язані з ELISA-планшетами, покритими білком ФІТЦ-S. Зв'язування і функцію гілки 2B6 детектували шляхом контактування з розчинним CD32B, а потім з антитілом, специфічним до CD32B, і з "другим" детектучим антитілом, кон'югованим із ПХ. (B) 2B6/4420 або 2B6/3G8 були зв'язані з ELISA-планшетами, покритими HuIgG або ФІТЦ-HuIgG (кон'югованими з флуоресцеїном). Зв'язування детектували шляхом контактування з поліклональною сироваткою, специфічною до Fv 2B6, а потім із ПХ-кон'югованим "другим" антитілом.

Фіг. 22 (Панелі A і B). Активація очищених B-клітин з використанням антитіл проти людського CD79B

Очищені B-клітини активували з використанням зростаючих концентрацій ФІТЦ-кон'югованих антитіл проти людського CD79b, CB3.1-ФІТЦ (A) або CB3.2-ФІТЦ (B) і 50 мкг/мл $F(ab')_2$-фрагмента, специфічного до Fc IgG, GAM (вісь x). B-клітини активували в присутності PBS (білі стовпці) або 5 мкг/мл αFITCαCD32BDART (чорні стовпці) або αCD16αCD32BDART (сірі стовпці). Реакції здійснювали з трьома повторностями й обчислювали стандартні відхилення.

Фіг. 23 (Панелі A і B). Активація очищених B-клітин

Очищені B-клітини, узяті в другого здорового донора, активували, як описано на фіг. 22, панель B. Індекс проліферації вимірювали в клітинах, активованих у присутності ФІТЦ-кон'югованого анти-CD79b антитіла CB3.2 (A), і порівнювали з індексом проліферації клітин, активованих у присутності неміченого антитіла CB3.2 (B).

Фіг. 24 (Верхня і нижня панелі). Виснаження мишачих B-клітин in vivo у HCD16A/B-трансгенних мишей з використанням MGD261

Мишам mCD32-/- hCD16A+C57B1/6, mCD32-/- hCD32B+C57B1/6 і mCD32-/- hCD16A+hCD32B+C57B1/6, виведеним шляхом схрещування клітинних колоній MacroGenics, i.v. ін'єктували MGD261 (10, 3, 1 або 0,3 мг/кг) або нерелевантне антитіло (hE16, 10 мг/кг) на дні 0, 3, 7, 10, 14 і 17. Кров брали на день -19 (попередній забір крові) і на дні 4, 11, 18, 25 і 32 для FACS-аналізу. Здоров'я й активність тварин реєстрували три рази на тиждень. Верхня панель:

h2B6-3G8 і WNV mAb; нижня панель: миші, яким уводили h2B6-3G8-hCD16A або -hCD32B, і миші, яким уводили WNV mAb-hCD16A або - hCD32B.

Фіг. 25. Виснаження мишачих B-клітин in vivo у HCD16A/B-трансгенних мишей з використанням 2.4G2-3G8 DB

Мишам mCD16-/-, mCD16-/- hCD16A+C57B1/6, mCD16-/- hCD16B+ і mCD16-/- hCD16A+hCD16B+, виведеним шляхом схрещування клітинних колоній MacroGenics, i.p. ін'єктували 2.4G2-3G8 DB (75 мкг/миша) або PBS на дні 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16 і 18. Кров брали на день -10 (попередній забір крові) і на дні 4, 11 і 18 для FACS-аналізу. Здоров'я й активність тварин реєстрували три рази на тиждень.

Фіг. 26. Ілюстрація протипухлинної активності MGD261 на моделі, якій внутрішньовенно (i.v.) уводили людські пухлинні клітини лінії RAJI

12-20-тижневим мишам mCD16-/-, hCD16A+, RAG1-/- C57B1/6, виведеним шляхом схрещування клітинних колоній MacroGenics, i.v. ін'єктували 5×10^6 клітин Raji на день 0. На дні 6, 9, 13, 16, 20, 23, 27 і 30 мишей внутрішньоочеревинно обробляли (i.p.) 250, 25 або 2,5 мкг MGD261 або PBS (негативний контроль). Потім мишей щодня спостерігали, і масу тіла реєстрували два рази на тиждень. Мишей, у яких розвивався параліч задніх кінцівок, умертвляли.

Фіг. 27. Експресія DART у хазяїнів, які не є ссавцями

Клітини BL21DE3 (Novagen) трансформували плазмідою pET25b(+) T7-lac+3G8/3G8, і колонії, резистентні до ампіциліну, використовували для посіву бульйонної культури. Коли культура досягала OD600=0,5 одиниць, для індукування експресії додавали 0,5 мМ IPTG. Культуру вирощували при 30 °C протягом 2 годин і збирали безклітинне середовище.

Фіг. 28. ELISA DART

ELISA-аналіз на зв'язування з h3G8-h3G8 DART проводили на 96-ямкових планшетах Maxisorp. Після реакції планшет три рази промивали PBS-T і виявляли з використанням 80 мкл/ямку субстрату TMB. Після 5-хвилинного інкубування реакцію припиняли додаванням 40 мкл/ямку 1 % H_2SO_4. OD450 нм зчитували на 96-ямковому планшеті-рідері і реєстрували з використанням комп'ютерної програми SOFTmax. За даними зчитування будували криву за допомогою комп'ютерної програми GraphPadPrism 3.03.

Фіг. 29. DART-індукована загибель людських B-клітин

Людські МКПК інкубували протягом ночі з вказаними молекулами. Апоптоз оцінювали за допомогою FACS-аналізу, і дані виражали як відсоток PI^+-анексин-V^+-популяцій B-клітин ($CD20^+$-клітин) від загального числа популяцій, що не пройшли FSC/SSC-сортинг.

Фіг. 30. Конструкції 8B5-CB3.1 DART

Для ілюстрації даного винаходу була отримана множина конструкцій 8B5-CB3.1 DART. Конструкції 5 і 6, або 6 і 7, або 8 і 9, або 9 і 10, які кодуються експресійними плазмідами, спільно переносили в клітини HEK-293 для експресії 8B5-CB3.1 DART у присутності або під час відсутності антитіла проти flag-мітки з використанням ліпофектаміну 2000 (Invitrogen). Кондиціоноване середовище збирали три рази в кожні три дні. Потім кондиціоноване середовище очищали на CD32B-афінній колонці.

Фіг. 31. ELISA 8B5-CB3.1 DART

ELISA-аналіз на конкурентне зв'язування з 8B5-c3.1 DART/ch8b5 проводили на 96-ямкових планшетах Maxisorp. Після реакції планшет три рази промивали PBS-T і виявляли з використанням 80 мкл/ямку субстрату TMB. Після 5-хвилинного інкубування реакцію припиняли додаванням 40 мкл/ямку 1 % H_2SO_4. OD450 нм зчитували на 96-ямковому планшеті-рідері і реєстрували з використанням комп'ютерної програми SOFTmax. За даними зчитування будували криву за допомогою комп'ютерної програми GraphPadPrism 3.03.

Фіг. 32. Схематична ілюстрація чотиривалентної структури DART

На цій фігурі проілюстрована загальна структура молекул DART, отриманих шляхом збирання чотирьох поліпептидних ланцюгів. Чотири антигензв'язувальні домени Ig-подібного DART показані у вигляді смуг і темно-сірих еліпсів.

Фіг. 33. Ig-подібний чотиривалентний DART

На цій фігурі схематично представлені епітоп-зв'язувальні сайти Ig-подібного чотиривалентного DART.

Фіг. 34. ELISA-аналіз на зв'язування mCD32-hCD16A

На цій фігурі представлені результати ELISA-аналізу, які показали, що молекули Ig-подібного чотиривалентного DART приклада 6.10 зв'язуються з антигеном з більшою афінністю, ніж контрольне антитіло (ch-mCD32 mAb) або інші молекули DART.

Фіг. 35. Схематична ілюстрація Ig-подібних молекул DART

На цій фігурі схематично представлені Ig-подібні молекули DART. Специфічність показана у вигляді затінених, візерункових або білих ділянок, константні ділянки зафарбовані чорними, а дисульфідні зв'язки показані чорними пунктирними лініями. На цій фігурі N-кінці всіх білкових ланцюгів знаходяться зверху, а C-кінці всіх білкових ланцюгів знаходяться внизу. Панелі A-E представляють біспецифічні антитіла, а панелі F-J представляють триспецифічні антитіла. Панелі A і E представляють тривалентні антитіла. Панелі B, C, F, I і J представляють шестивалентні антитіла. Панелі D, G і H представляють восьмивалентні антитіла. Докладний опис окремих доменів представлено на фігурах 1, 2, 9, 14 і 17 і в Розділі 3.1.

Фіг. 36. Активність зв'язування біспецифічного антитіла HU2B6 4.5-HU3G8 5.1

На фігурі 36 проілюстрована здатність біспецифічного антитіла Hu2B6 4.5-Hu3G8 5.1 (квадрати) зв'язуватися з CD32b і CD16a у порівнянні з діатілами Hu2B6 4.5 або Hu3G8 5.1 (трикутники).

Фіг. 37. Схематичне представлення E-спіральних і K-спіральних похідних DART

На фігурі 37 проілюстрована загальна конформація E-спіральних і K-спіральних похідних DART.

Фіг. 38. Спіральна структура переважних E-спіральних і K-спіральних розділювальних послідовностей

На фігурі 38 показана спіральна структура переважної "E-спіральної" послідовності $(EVAALEK)_4$ (SEQ ID NO: 299) і переважної "K-спіральної" послідовності $(KVAALKE)_4$ (SEQ ID NO: 300).

Фіг. 39. Fc-вмісні E-спіральні і K-спіральні похідні DART

На фігурі 39 проілюстровані різні типи Fc-вмісних E-спіральних і K-спіральних похідних DART, які можуть бути утворені за допомогою перестановки ланцюгів.

Фіг. 40. Ексклюзійна хроматографія на E-спіральних і/або K-спіральних похідних і на Fc-вмісних E-спіральних і/або K-спіральних похідних h2B6YAhCB3 DART

На фігурі 40 представлені результати ексклюзійної хроматографії на E-спіральних і/або K-спіральних похідних і Fc-вмісних E-спіральних і/або K-спіральних похідних h2B6YAhCB3 DART. Було проаналізовано чотири види таких молекул, кожна з яких мала E-спіраль і K-спіраль: EK (без Fc-ділянки), 2,1 мг; EFc/K (Fc, зв'язаний з E-спіраллю), 2,7 мг; E/KFc (Fc, зв'язаний з K-спіраллю), 1,8 мг; EFc/KFc (Fc, зв'язаний з K-спіраллю і E-спіраллю того самого DART), 2,0 мг.

Фіг. 41. Структура отриманих димерних молекул

На фігурі 41 показана можлива структура отриманої димерної молекули, ідентифікованої на ексклюзійному хроматографі, представленому на фігурі 40.

Фіг. 42. Аналіз E-спіральних і/або K-спіральних похідних і Fc-вмісних E-спіральних і/або K-спіральних похідних h2B6YAhCB3 DART, проведений за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі з ДСН

На фігурі 42 представлені результати аналізу фракцій E-спіральних і/або K-спіральних похідних і Fc-вмісних E-спіральних і/або K-спіральних похідних h2B6YAhCB3 DART, отриманих за допомогою ексклюзійної хроматографії (фігура 40), де вказаний аналіз проводили за допомогою електрофорезу в поліакриламідном гелі з ДСН. Крайні доріжки: контрольні молекулярні маркери; доріжка 1: EK (без Fc-ділянки); доріжка 2: EFc/K, агрегована фракція; доріжка 3: EFc/K, мономерна фракція; доріжка 4: E/KFc, агрегована фракція; доріжка 5: E/KFc, мономерна фракція; доріжка 6: EFc/KFc, агрегована фракція; доріжка 7: EFc/KFc, димерна фракція; доріжка 8: EFc/KFc, мономерна фракція.

Фіг. 43. ELISA-аналіз на біспецифічне зв'язування

На фігурі 43 представлені результати порівняльного ELISA-аналізу на біспецифічне зв'язування Fc-вмісних E-спіральних/K-спіральних похідних h2B6YAhCB3 DART (EFc/K або E/KFc), h2B6YAhCB3 DART, контролю і похідного EFc/KFc h2B6YAhCB3 DART.

Фіг. 44. Здатність E-спіральних і/або K-спіральних похідних і Fc-вмісних E-спіральних і/або K-спіральних похідних h2B6YAhCB3 DART інгібувати проліферацію T-клітин

На фігурі 44 проілюстрована здатність E-спіральних і/або K-спіральних похідних і Fc-вмісних E-спіральних і/або K-спіральних похідних h2B6YAhCB3 DART інгібувати проліферацію T-клітин.

Фіг. 45. hCD16-hCD32B ABD-DART

На фігурі 45 схематично представлена рекомбінантна молекула антитіла hCD16-hCD32B ABD-DART, яка складається з домену ABD3 стрептококового білка G, злитого з рекомбінантним біспецифічним DART, що вступає в імунну реакцію з антигенами hCD16 і hCD32B.

Фіг. 46A-46J. Афінність зв'язування hCD16-hCD32B ABD-DART

ELISA-планшети покривали антигеном CD16 (фігура 46A) або альбуміном людської сироватки (фігура 46B) у концентрації 2 мкг/мл. hCD16-hCD32B ABD-DART (■) і контрольний hCD16-hCD32B DART (o) зв'язувалися при різних концентраціях, починаючи з 2 мкг/мл. У

планшет додавали біотинільований sCD32B, а потім додавали ПХ-кон'югований стрептавідин для детектування. На фігурі 46C показано, що молекула ABD-DART має здатність одночасно зв'язуватися з CD32B, CD16A і HSA. На фігурах 46D-46I показано, що hCD16-hCD32B ABD-DART і його ABD-гібридне похідне мають еквівалентну здатність зв'язуватися з розчинним CD32B (sCD32B) і з розчинним CD16A(158F) (sCD16A). На фігурі 46J показано, що ABD-гібрид DART зберігає здатність батьківського DART до біспецифічного зв'язування з sCD16A і CD32B незалежно від присутності альбуміну людської сироватки.

Фіг. 47A/47B. Цитотоксичність білків DART

На фігурі 47A проілюстрована МКПК-опосередковує цитотоксичність білків DART. Аналізи на ADCC здійснювали з використанням людських B-клітинних ліній Дауді як клітин-мішеней, інкубованих із клітинами МКПК, використовуваними як ефекторі клітини. Окремі аналізи проводили з трьома повторностями з використанням клітин у відношенні ефектор:мішень = 20:1 і з титруванням антитіл: hCD16A-hCD32B DART (-) і hCD16A-hCD32B ABD DART (■). Клітинно-опосередковувану цитотоксичність оцінювали в аналізі на вивільнення LDH. Нижня крива при 10^0 відповідає hCD16A-hCD32B ABD DART (■). На фігурі 47B показано, що CD16xCD32B DART зв'язується з CD16B-експресуючими ефекторними клітинами, що приводить до рекрутингу вказаних клітин і знищення (за допомогою перенаціленого цитолізу) клітин, експресуючих CD32B.

Фіг. 48. Поліпшені фармакокінетичні властивості hCD16-hCD32B ABD-DART у мишей C57B1/6

Мишам (n=3) вводили одну внутрішньовенну ін'єкцію (A) hCD16-hCD32B ABD-DART (-) і (B) hCD16-hCD32B DART (▲) при 5 мг/кг. Мишачу сироватку брали в різні періоди часу, і концентрацію білка в сироватці оцінювали за допомогою ELISA. Оцінку фармакокінетичних властивостей проводили за допомогою програми WinNonlin Professional 5.1.

Фіг. 49A-49C. Біологічна активність ABD-DART in vivo

На фігурах 49A-49C продемонстровано, що hCD16-hCD32B ABD-DART, після його введення мишам in vivo, зберігав свою біологічну активність. Було виявлено, що одна доза ABD-DART або батьківського DART, уведена Tg(mCD16-/-hCD16A+32B+)- мишам, приводить до селективного зниження концентрацій B-клітин (фігура 49A), але не чинить впливу на концентрації T-клітин (фігура 49B) або мононуклеарних периферичних клітин (фігура 49C).

Фіг. 50A-50E. Активність HER2×TCRb DART на панелі клітинних ліній, експресуючих низькі рівні HER2

Молекули DART, що мають домени, які зв'язуються з Her2 і з T-клітинним рецептором (TCR), тестували на їхню здатність опосередковувати цитотоксичність клітинних ліній при первинно-множинному раку молочної залози, раку товстої кишки і раку сечового міхура, де вказані клітинні лінії були охарактеризовані як клітинні лінії, що мають низькі рівні експресії HER2 (а значить, були не сприйнятливими до лікування анти-Her2/neu антитілом, Herceptin®). Тестованими клітинними лініями раку молочної залози були ZR75-1 (HER2 2+) (фіг. 50A), MCF-7 (HER2 1+) (фіг. 50B) і MDA-MB468 (HER 2-ve) (фіг. 50C). Тестованими клітинними лініями, що не стосуються раку молочної залози, були HT-29 (клітинна лінія раку товстої кишки) (фіг. 50D) і SW780 (клітинна лінія раку сечового міхура) (фіг. 50E).

Фіг. 51A-51B. Очищення поліпептидів KYK2VL-4420VH-GFNRGEC (SEQ ID NO: 313) - E-спіраль і 4420VL-KYK2VH-GVEPKSC (SEQ ID NO: 314)

На фіг. 51A-51B проілюстроване очищення поліпептидів KYK2VL-4420VH-GFNRGEC (SEQ ID NO: 313) - E-спіраль і 4420VL-KYK2VH-GVEPKSC (SEQ ID NO: 314).

Фіг. 52. Специфічність зв'язування KYK2-4420 VF DART

На фіг. 52 проілюстрована специфічність зв'язування KYK2-4420 VF DART.

Фіг. 53. Конструювання плазміди pPAL7 KCOIL-ABD

На фіг. 53 схематично представлений опис конструкції плазміди pPAL7 Kcoil-ABD.

Фіг. 54. Вестерн-блот-аналіз K-спірального білка ABD, очищеного на смолі для очищення PROFINITY EXACT™

На фігурі 54 проілюстрований вестерн-блот-аналіз K-спірального білка ABD, очищеного на смолі для очищення PROFINITY EXACT™ (у невеликому масштабі виходячи з 10 мл культури). Доріжки 1 і 5: неочищені лізати; доріжки 2 і 6: протоковий матеріал, доріжки 3, 4, 8 і 9: очищений білок; доріжка 7: маркер. "Перше" антитіло: кроляче поліклональне анти-EK антитіло; "друге" антитіло: ПХ-кон'юговане антикроляче антитіло.

Фіг. 55. ДСН-ПААГ-аналіз K-спірального білка ABD, очищеного на смолі для очищення PROFINITY EXACT™

На фігурі 55 представлені результати ДСН-ПААГ-аналіза фракцій, елюйованих зі смоли для очищення PROFINITY EXACT™. L: неочищений лізат E. coli; FT: протоковий матеріал; W: промивання; M: маркер.

Фіг. 56A-56C. ELISA-аналіз на зв'язування KYK2 4420 EK ABD DART з подвійною афінністю

На фігурах 56A-56C представлені результати ELISA-аналізу, які продемонстрували, що комплекси KYK2-4420 VF DART з молекулою K-спіраль-ABD, що утворюють E-спіраль - K-спіраль-ABD DART, мають поліпшені властивості. Фігура 56A: DART захоплювалися NKG2D-Fc і були детектовані з використанням біотинільованого моноклонального анти-EK антитіла. Фігура 56B: DART захоплювалися моноклональним анти-EK антитілом і були детектовані з використанням ПХ-людського альбуміну. Фігура 56C: DART захоплювалися NKG2D-Fc і були детектовані з використанням біотинільованого анти-ФІТЦ антитіла. Результати ELISA-аналізу показали, що всі домени в цьому комплексі можуть зв'язуватися з їх відповідними лігандами.

Фіг. 57. ELISA-аналіз деімунізованого ABD

На фігурі 57 представлені результати ELISA, що продемонстрували зміну рівня зв'язування, обумовлена модифікаціями в послідовності альбумін-зв'язувальних доменів.

Фіг. 58. Аналіз на зв'язування з альбуміном

На фігурі 58 представлені результати аналізів на зв'язування з альбуміном для ABD-варіантів Y61A/I65A, Y61A/N66D, L64A/I65A* і L64A/N66D і для ABD дикого типу.

Фіг. 59. Аналіз на зв'язування з альбуміном

На фігурі 59 представлені результати аналізів на зв'язування з альбуміном для ABD-варіантів L64G/N66D, I65A/N66D, N66S/T70S* і Y61A/N66S/T70S і для ABD дикого типу.

Фіг. 60. Аналіз на зв'язування з альбуміном

На фігурі 60 представлені результати аналізів на зв'язування з альбуміном для ABD-варіантів Y60A/Y61A, Y60T/Y61A, I65A/N66D/V71A, Y61A/I65A/V71A, L64A/N66D/V71A і для ABD дикого типу.

Фіг. 61. Аналіз на зв'язування з альбуміном

На фігурі 61 представлені результати аналізів на зв'язування з альбуміном для ABD-варіантів Y60A/Y61A/V71A, Y60T/Y61A/V71A, L64A/I65A/V71A і для ABD дикого типу.

Фіг. 62. Аналіз на зв'язування з альбуміном

На фігурі 62 представлені результати аналізів на зв'язування з альбуміном для ABD-варіантів L64G/I65A/V71A, L64G/N66D/V71A, Y61A/T70S, N66S, T70S, Y61A/N66S, L64A/I65A і для ABD дикого типу.

Фіг. 63. Поліпшені фармакокінетичні властивості CD16xCD32B ABD-DART і варіантів ABD-DART у мишей C57BL/6

На фігурі 63 проілюстровані поліпшені фармакокінетичні властивості CD16xCD32B ABD-DART і варіантів ABD-DART у мишей C57BL/6. Мишам (n=3) вводили одну внутрішньовенну ін'єкцію білків ABD-DART при 5 мг/кг. Мишачу сироватку брали в різні періоди часу, і концентрацію білка в сироватці оцінювали за допомогою ELISA. Оцінку фармакокінетичних властивостей проводили за допомогою програми WinNonlin Professional 5.1.

Фіг. 64A і 64B. Полівалентні білки ABD DART

На фігурах 64A і 64B проілюстровані структури DART, що містять полівалентні ABD, сконструйовані шляхом приєднання ABD по кінцях обох ланцюгів (hCD16xhCD32B E ABD/K ABD DART) (фігура 64A) або шляхом приєднання тандемних ABD по кінці одного ланцюга (hCD16xhCD32B E ABD ABD/K DART) (фігура 64B).

Фіг. 65(A-C). Біспецифічна активність hCD16xhCD32B ABD DART

На фігурах 65A-65C проілюстрована біспецифічна активність hCD16xhCD32B ABD DART, оцінена за допомогою ELISA з подвійною специфічністю. ELISA-планшети покривали 2 мкг/мл антигени CD16. ABD DART і Fc DART у різних концентраціях зв'язували з планшетом. І нарешті, у планшет додавали біотинільований антиген sCD32B, а потім ПХ-кон'югований стрептавідин для детектування.

Фіг. 66. Час напівжиття ABD DART і FC DART у сироватці

На фігурі 66 представлені результати дослідження фармакокінетичних властивостей in vivo, у якому мишам C57B1/6 вводили одну i.v. ін'єкцію ABD DART або Fc DART (5 мг/кг) для оцінки часу їхнього напівжиття в сироватці.

5. Опис переважних варіантів винаходу

Кожен поліпептидний ланцюг молекули діатіла містить VL- домен і VH-домен, які були ковалентно зв'язані так, щоб це запобігало самозбиранню. Взаємодія двох поліпептидних ланцюгів приводить до продукування пар VL-VH, що утворюють два епітоп-зв'язувальні сайти, тобто двовалентну молекулу. Жоден з VH- або VL-доменів не обмежений яким-небудь положенням у поліпептидному ланцюзі, тобто, він обмежений тільки аміно (N)- або карбокси (C)-

кінцем, і жоден з цих доменів не обмежений їхніми положеннями один відносно одного, тобто, VL-домен може бути N-кінцевим відносно VH-домену і навпаки. Одним лише обмеженням є те, що комплементарний поліпептидний ланцюг повинний бути доступним для утворення функціонального діатіла. Якщо VL- і VH-домени походять від того самого антитіла, то два комплементарні поліпептидні ланцюги можуть бути ідентичними. Так, наприклад, якщо зв'язувальні домени походять від антитіла, специфічного до епітопу A (тобто, якщо зв'язувальний домен утворюється в результаті взаємодії VL_A-VH_A), то кожен поліпептид буде містити VH_A і VL_A. Гомодимеризація двох поліпептидних ланцюгів антитіла буде приводити до утворення двох VLA-VHA-зв'язувальних сайтів і, тим самим, до утворення двовалентного моноспецифічного антитіла. Якщо VL- і VH-домени походять від антитіл, специфічних до різних антигенів, то для утворення функціонального біспецифічного діатіла необхідна взаємодія двох різних поліпептидних ланцюгів, тобто утворення гетеродимера. Так, наприклад, для біспецифічного діатіла один поліпептидний ланцюг буде містити VL_A і VL_B; а гомодимеризація вказаного ланцюга буде приводити до утворення двох VL_A-VH_B-зв'язувальних сайтів, які або не зв'язуються, або їхнє зв'язування є непередбаченим. На противагу цьому, якщо два відмінні один від одного поліпептидні ланцюги є вільними для взаємодії, наприклад, у рекомбінантній експресійній системі, тобто в одній системі, що містить VL_A і VH_B, і в іншій системі, що містить VL_B і VH_A, то два відмінні один від одного зв'язувальні сайти будуть утворювати VL_A-VH_A і VL_B-VH_B. Для всіх пар поліпептидних ланцюгів діатіл існує імовірність помилкового вирівнювання або помилкового зв'язування на двох ланцюгах, тобто взаємодії доменів VL-VL або VH-VH, однак, очищення функціональних діатіл може бути легко здійснене виходячи з імуноспецифічності "правильно" димеризованого зв'язувального сайта з застосуванням будь-якого афінного методу, відомого фахівцям або описаного в даній заявці, наприклад, методу афінної хроматографії.

В інших варіантах винаходу один або більше поліпептидних ланцюгів діатіла містять Fc-домен. Fc-домени в поліпептидних ланцюгах молекул діатіла переважно димеризуються з утворенням молекули діатіла, що має імуноглобулін-подібні властивості, наприклад, здатність до Fc-FcγR-взаємодій. Fc-вмісні діатіла можуть бути димерами, наприклад, вони можуть складатися з двох поліпептидних ланцюгів, кожен з який містить VH-домен, VL-домен і Fc-домен. Димеризація вказаних поліпептидних ланцюгів приводить до утворення двовалентного діатіла, що містить Fc-домен, хоча структура цього антитіла відрізняється від структури немодифікованого двовалентного антитіла (фіг. 11). Такі молекули діатіла, на відміну від імуноглобуліну дикого типу, мають змінені фенотипи, наприклад, вони мають змінений час напівжиття в сироватці, модифіковані зв'язувальні властивості і т. п. В інших варіантах винаходу молекули діатіла, що містять Fc-домени, можуть бути тетрамерами. Такі тетрамери містять два "більш важкі" поліпептидні ланцюги, тобто поліпептидний ланцюг, що містить VL-, VH- і Fc-домен, і два "більш легкі" поліпептидні ланцюги, тобто поліпептидний ланцюг, що містить VL і VH. Вказані "більш легкі" і "більш важкі" ланцюги взаємодіють один з одним з утворенням мономера, а вказані мономери взаємодіють один з одним за допомогою їх неспарених Fc-доменів з утворенням Ig-подібної молекули. Таке Ig-подібне діатіло є чотиривалентним і може бути моноспецифічним, біспецифічним або тетраспецифічним.

Щонайменше два зв'язувальні сайти молекули діатіла можуть розпізнавати той самий або різні епітопи. Різні епітопи можуть походити від того самого антигену або від різних антигенів. В одному з варіантів винаходу епітопи походять від різних клітин. В іншому варіанті винаходу епітопами є антигени клітинної поверхні, які присутні на одній і тій же клітині або на тому самому вірусі. Епітоп-зв'язувальні сайти можуть розпізнавати будь-який антиген, проти якого може продукуватися антитіло. Так, наприклад, такими молекулами є білки, нуклеїнові кислоти, бактеріальні токсини, маркери клітинної поверхні, аутоімунні маркери, вірусні білки, лікарські засоби і т. п. У конкретних аспектах винаходу щонайменше один епітоп-зв'язувальний сайт діатіла є специфічним до антигену на конкретній клітині, такій як B-клітина, T-клітина, фагоцит, природна клітина-кілер (NK) або дендритна клітина.

Кожен домен поліпептидного ланцюга діатіла, тобто VL-, VH- і Fc-домени, можуть бути розділені пептидним лінкером. Пептидний лінкер може мати довжину в 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 або 9 амінокислот. У деяких варіантах винаходу амінокислотна лінкерна послідовність являє собою послідовність GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10), яка кодується послідовністю нуклеїнової кислоти (SEQ ID NO: 74).

У деяких варіантах винаходу кожен поліпептидний ланцюг молекули діатіла був сконструйований так, щоб він містив щонайменше один цистеїновий залишок, який буде взаємодіяти з аналогом у положенні щонайменше одного цистеїнового залишку на другому поліпептидному ланцюзі відповідно до винаходу з утворенням міжланцюгового дисульфідного

зв'язку. Вказані міжланцюгові дисульфідні зв'язки служать для стабілізації молекули діатіла, підвищують рівень експресії і вихід продукту в рекомбінантних системах, дозволяють одержати стабільний препарат з однорідним складом, а також підвищують стабільність виділеного і/або очищеного продукту in vivo. Вказаний щонайменше один цистеїновий залишок може бути введений як одна амінокислота або як частина більш великої амінокислотної послідовності, наприклад, шарнірного домену, у будь-яку частину поліпептидного ланцюга. У конкретному варіанті винаходу вказаний щонайменше один цистеїновий залишок уводять так, щоб він був присутній біля С-кінця поліпептидного ланцюга. У деяких варіантах винаходу вказаний щонайменше один цистеїновий залишок вводять у поліпептидний ланцюг амінокислотної послідовності LGGC. У конкретному варіанті винаходу С-кінець поліпептидного ланцюга, що входить до складу молекули діатіла відповідно до винаходу, містить амінокислотну послідовність LGGC. В іншому варіанті винаходу вказаний щонайменше один цистеїновий залишок вводять у поліпептид, який присутній в амінокислотній послідовності, що містить шарнірний домен, наприклад, SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 4. У конкретному варіанті винаходу С-кінець поліпептидного ланцюга молекули діатіла відповідно до винаходу містить амінокислотну послідовність шарнірного домену IgG, наприклад, SEQ ID NO: 1. В іншому варіанті винаходу С-кінець поліпептидного ланцюга молекули діатіла відповідно до винаходу містить амінокислотну послідовність VEPKSC (SEQ ID NO: 77), що може кодуватися нуклеотидною послідовністю (SEQ ID NO: 78). В інших варіантах винаходу вказаний щонайменше один цистеїновий залишок вводять у поліпептидний ланцюг в амінокислотній послідовності LGGCFNRGEC (SEQ ID NO: 17), що може кодуватися нуклеотидною послідовністю (SEQ ID NO: 76). У конкретному варіанті винаходу С-кінець поліпептидного ланцюга, що входить до складу молекули діатіла відповідно до винаходу, містить амінокислотну послідовність LGGCFNRGEC (SEQ ID NO: 17), що може кодуватися нуклеотидною послідовністю (SEQ ID NO: 76). В інших варіантах винаходу вказаний щонайменше один цистеїновий залишок вводять у поліпептидний ланцюг в амінокислотній послідовності FNRGEC (SEQ ID NO: 23), що може кодуватися нуклеотидною послідовністю (SEQ ID NO: 75). У конкретному варіанті винаходу С-кінець поліпептидного ланцюга, що входить до складу молекули діатіла відповідно до винаходу, містить амінокислотну послідовність FNRGEC (SEQ ID NO: 23), що може кодуватися нуклеотидною послідовністю (SEQ ID NO: 75).

У деяких варіантах винаходу молекула діатіла містить щонайменше два поліпептидні ланцюги, кожен з яких включає амінокислотну послідовність LGGC і ковалентно зв'язаний дисульфідного зв'язком, розташованим між цистеїновими залишками в вказаних послідовностях LGGC. В іншому конкретному варіанті винаходу молекули діатіла містять щонайменше два поліпептидні ланцюги, один з яких включає послідовність FNRGEC (SEQ ID NO: 23), а інший включає шарнірний домен (який містить щонайменше один цистеїновий залишок), де вказані щонайменше два поліпептидні ланцюги ковалентно зв'язані дисульфідним зв'язком, розташованим між цистеїновим залишком у FNRGEC (SEQ ID NO: 23) і цистеїновим залишком у шарнірному домені. У конкретних аспектах винаходу цистеїновий залишок, відповідальний за утворення дисульфідного зв'язку в шарнірному домені, являє собою Cys-128 (пронумерований відповідно до нумерації EU Кебата і розташований у шарнірному домені важкого ланцюга немодифікованого інтактного IgG), а цистеїновий залишок аналога в SEQ ID NO: 23 являє собою Cys-214 (пронумерований відповідно до нумерації EU Кебата і розташований у шарнірному домені легкого ланцюга немодифікованого інтактного IgG) (Elkabetz et al. (2005) "Cysteines In CHI Underlie Retention Of Unassembled Ig Heavy Chains" J. Biol. Chem. 280:14402-14412; ця публікація у всій своїй повноті вводиться в даний опис за допомогою посилання). В інших варіантах винаходу щонайменше один цистеїновий залишок сконструйований так, щоб він був присутній біля N-кінця амінокислотного ланцюга. В інших варіантах винаходу щонайменше один цистеїновий залишок сконструйований так, щоб він був присутній в лінкерній частині поліпептидного ланцюга молекули діатіла. В інших варіантах винаходу VH- або VL-домен сконструйований так, щоб він містив щонайменше одну амінокислотну модифікацію в порівнянні з батьківським VH- або VL-доменом, де вказана амінокислотна модифікація включає заміну батьківської амінокислоти цистеїном.

Даний винахід охоплює молекули діатіл, які містять Fc-домен або його частину (наприклад, CH2-домен або CH3-домен). Fc-домен або його частину можуть походити від імуноглобуліну будь-якого ізотипу або алотипу, включаючи, але не обмежуючись ними, IgA, IgD, IgG, IgE і IgM. У переважних варіантах винаходу Fc-домен (або його частина) походить від IgG. У конкретних варіанті винаходу ізотипами IgG є IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4 або їх алотипи. В одному з варіантів винаходу молекула діатіла містить Fc-домен, де вказаний Fc-домен включає CH2-домен і CH3-домен, незалежно вибрані з імуноглобулінів будь-яких ізотипів (тобто, Fc-домен,

який містить CH2-домен, походить від IgG, а CH3-домен походить від IgG, або CH2-домен походить від IgG1, а CH3-домен походить від IgG2, і т. п.). Вказаний Fc-домен може бути введений у поліпептидний ланцюг, який складає молекулу діатіла відповідно до винаходу, у будь-якому положенні відносно інших доменів або частин вказаного поліпептидного ланцюга (наприклад, Fc-домен або його частина можуть бути С-кінцевими відносно VL- і VH-доменам поліпептиду вказаного ланцюга; N-кінцевими відносно VL- і VH-доменам; або N-кінцевими відносно одного домену і С-кінцевими відносно іншого домену (тобто, вони можуть бути розташовані між двома доменами поліпептидного ланцюга)).

Даний винахід також охоплює молекули, що містять шарнірний домен. Шарнірний домен походить від імуноглобуліну будь-якого ізотипу або алотипу, включаючи IgA, IgD, IgG, IgE і IgM. У переважних варіантах винаходу шарнірний домен походить від IgG, де IgG має ізотип IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4 або їх алотип. Вказаний шарнірний домен може бути введений у поліпептидний ланцюг, який складає молекулу діатіла, разом з Fc-доменом, так, щоб молекула діатіла містила шарнірний домен-Fc-домен. У деяких варіантах винаходу шарнірний домен і Fc-домен незалежно вибрані з імуноглобуліну будь-якого ізотипу, відомого фахівцям або описаного в даній заявці. В інших варіантах винаходу шарнірний домен і Fc-домен розділені щонайменше одним іншим доменом поліпептидного ланцюга, наприклад, VL-доменом. Шарнірний домен або необов'язково шарнірний домен-Fc-домен можуть бути введені в поліпептид відповідно до винаходу в будь-якому положенні відносно інших доменів або частин вказаного поліпептидного ланцюга. У деяких варіантах винаходу поліпептидний ланцюг відповідно до винаходу містить шарнірний домен, де вказаний шарнірний домен знаходиться біля С-кінця поліпептидного ланцюга, де вказаний поліпептидний ланцюг не містить Fc-домену. В інших варіантах винаходу поліпептидний ланцюг відповідно до винаходу містить шарнірний домен-Fc-домен, де вказаний шарнірний домен-Fc-домен знаходиться біля С-кінця поліпептидного ланцюга. В інших варіантах винаходу поліпептидний ланцюг відповідно до винаходу містить шарнірний домен-Fc-домен, що знаходиться біля N-кінця поліпептидного ланцюга.

Як обговорювалося вище, даний винахід охоплює мультимери поліпептидних ланцюгів, кожен з яких містить VH- і VL-домени. У деяких аспектах винаходу поліпептидні ланцюги в вказаних мультимерах також містять Fc-домен. Димеризація Fc-доменів приводить до утворення молекули діатіла, що має імуноглобулін-подібні властивості, тобто Fc-опосередковувані функціональні властивості (такі як, наприклад, взаємодія Fc-FcγR, зв'язування з комплементом і т. п.). У деяких варіантах винаходу VL- і VH-домени, що містять кожен поліпептидний ланцюг, мають однакову специфічність, а вказана молекула діатіла є двовалентною і моноспецифічною. В інших варіантах винаходу VL- і VH-домени, що містять кожен поліпептидний ланцюг, мають різні специфічності, а вказане діатіло є двовалентним і біспецифічним.

В інших варіантах винаходу молекули діатіла відповідно до винаходу охоплюють тетрамери поліпептидних ланцюгів, кожен з яких містить VH- і VL-домени. У деяких варіантах винаходу два поліпептидні ланцюги тетрамера також включають Fc-домен. Отже, тетрамер складається з двох "більш важких" поліпептидних ланцюгів, кожен з яких містить VL-, VH- і Fc-домени, і двох "більш легких" поліпептидних ланцюгів, що містять VL- і VH-домени. Взаємодія "більш важкого" і "більш легкого" ланцюгів приводить до утворення двовалентного мономера, що, після димеризації за допомогою Fc-доменів "більш важких" ланцюгів, утворює чотиривалентну імуноглобулін-подібну молекулу (описану в прикладі 6.2 і в прикладі 6.3). У деяких аспектах винаходу вказані мономери є однаковими, а чотиривалентна молекула діатіла є моноспецифічною або біспецифічною. В інших аспектах винаходу вказані мономери відрізняються один від одного, а чотиривалентна молекула діатіла є біспецифічною або тетраспецифічною.

Для утворення тетраспецифічної молекули діатіла, описаної вище, необхідна взаємодія чотирьох різних поліпептидних ланцюгів. Такі взаємодії представляють певні труднощі для їхнього ефективного здійснення в одноклітинній системі рекомбінантного продукування, що обумовлено множиною варіантів потенційно помилкових спарювань ланцюга. Однією з можливостей підвищення імовірності помилкових спарювань є введення мутацій типу "вузли в дірках" у потрібні пари поліпептидних ланцюгів. Такі мутації відбуваються переважно при гетеродимеризації, а не при гомодимеризації. Так, наприклад, що стосується Fc-Fc-взаємодій, то амінокислотна заміна (переважно, заміна амінокислотою, що містить об'ємну бічну групу, яка утворює "вузол", наприклад, триптофаном) може бути введена в CH2- або CH3-домени, так, щоб стеричне утруднення запобігало взаємодії з аналогічним чином мутованим доменом і змушувало мутований домен спарюватися з доменом, у який була введена комплементарна або адаптуюча мутація, тобто "діра" (наприклад, заміна гліцином). Такі серії мутацій можуть

бути введені в будь-яку пару поліпептидів, що складають молекулу діатіла, і, крім того, у будь-яку частину поліпептидних ланцюгів вказаної пари. Методи конструювання білків для досягнення переважно гетеродимеризації, а не гомодимеризації, добре відомі фахівцям, зокрема, фахівцям з конструювання імуноглобулін-подібних молекул, і ці методи описані в літературі (див., наприклад, публікації: Ridgway et al. (1996) "Knobs-Into-Holes" Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization, "Protein Engr. 9:617-621, Atwell et al. (1997) "Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library" J. Mol. Biol. 270:26-35, і Xie et al. (2005) "A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression И Tumor Cell Lysis" J. Immunol. Methods 296:95-101; кожна з який у всій своїй повноті вводиться в даний опис за допомогою посилання).

Даний винахід також охоплює молекули діатіла, які містять варіант Fc-домену або варіант шарнірного домену-Fc-домену (або їхньої частини), де вказаний варіант Fc-домену має щонайменше одну амінокислотну модифікацію (наприклад, заміну, інсерцію, делецію) у порівнянні з Fc-доменом дикого типу або шарнірним доменом-Fc-доменом дикого типу (або їх частинами). Молекули, що містять варіанти Fc-доменів або варіанти шарнірних доменів-Fc-доменів (або їхніх частин) (наприклад, антитіл), звичайно мають змінені фенотипи в порівнянні з молекулами, що містять Fc-домени або шарнірні домени-Fc-домени або їхні частини дикого типу. Змінений фенотип може бути охарактеризований як змінений час напівжиття в сироватці, змінена стабільність, змінена сприйнятливість до клітинних ферментів або змінена ефекторна функція, які були визначені в аналізі на NK-залежний цитоліз або макрофаг-залежний цитоліз. Варіанти Fc-домену, ідентифіковані як варіанти, які мають змінені ефекторні функції, описані в Міжнародній заявці WO04/063351, у публікаціях заявок на патент США 2005/0037000 і 2005/0064514, у попередній заявці на патент США 60/626510, поданій 10 листопада 2004 р., у попередній заявці на патент США 60/636663, поданій 15 грудня 2004 р., і в попередній заявці на патент США 60/781564, поданій 10 березня 2006 р., а також у заявці на патент США 11/271140, поданій 10 листопада 2005 р., і в заявці на патент США 11/305787, поданій 15 грудня 2005 р., і в одночасно поданих заявках авторів винаходу, які у всій своїй повноті вводяться в даний опис за допомогою посилання.

Біспецифічні діатіла відповідно до винаходу можуть одночасно зв'язуватися з двома окремими і різними епітопами. У деяких варіантах винаходу епітопи походять від того самого антигену. В інших варіантах винаходу епітопи походять від різних антигенів. У переважних варіантах винаходу щонайменше один епітоп-зв'язувальний сайт є специфічним до детермінанти, яка експресується на імунних ефекторних клітинах (наприклад, CD3, CD16, CD32, CD64 і т. п.) і на Т-лімфоцитах, природних клітинах-кілерах (NK) або на інших імунонуклеарних клітинах. В одному з варіантів винаходу молекула діатіла зв'язується з детермінантою ефекторної клітини, а також активує вказану ефекторну клітину. Відповідно до цього молекули діатіла відповідно до винаходу можуть мати Ig-подібні функціональні властивості незалежно від того, чи містять вони Fc-домен чи ні (як може бути проаналізовано в будь-якому аналізі на ефекторну функцію, відомому фахівцям або описаному в даній заявці (наприклад, в аналізі на ADCC)). У деяких варіантах винаходу біспецифічне діатіло відповідно до винаходу зв'язується з раковим антигеном на пухлинній клітині і з детермінантою ефекторної клітини й активує вказану клітину. В альтернативних варіантах винаходу біспецифічне діатіло або молекула діатіла відповідно до винаходу можуть інгібувати активацію мішені, наприклад, ефекторної клітини за допомогою одночасного зв'язування і тим самим об'єднання активуючого і інгібуючого рецепторів на одній і тій же клітині (наприклад, зв'язування з CD32A і CD32B, BCR і CD32B або IgERI і CD32B), як описано вище (див. розділ "Попередній рівень техніки"). В іншому аспекті цього варіанта біспецифічне діатіло може мати противірусні властивості завдяки одночасному зв'язуванню двох нейтралізуючих епітопів на вірусі (наприклад, епітопів RSV; епітопів WNV, таких як E16 і E53).

У деяких варіантах винаходу молекули біспецифічних діатіл відповідно до винаходу мають унікальну здатність націлюватися на клітини конкретних типів. Так, наприклад, біспецифічне діатіло або молекула біспецифічного діатіла можуть бути сконструйовані так, щоб вони містили комбінацію епітоп-зв'язувальних сайтів, що розпізнають серію антигенів, унікальних для клітини- або тканини-мішені конкретного типу. Крім того, якщо будь-який з окремих антигенів або обидва ці антигени є досить ізольованими, як це звичайно має місце, якщо вони знаходяться в тканині і/або в клітині інших типів, то для конструювання діатіла або молекули діатіла можуть бути використані домени з низькою афінністю зв'язування. Такі домени з низькою афінністю зв'язування будуть нездатні зв'язуватися з окремим епітопом або антигеном з авідністю, достатньою для терапевтичного застосування. Однак, якщо епітопи або антигени присутні на одній клітині- або тканині-мішені, то авідність діатіла або молекули діатіла для цієї або клітини

тканини, у порівнянні з клітиною або тканиною, яка експресує тільки один з цих антигенів, буде підвищуватися, у результаті чого вказана клітина або тканина можуть бути ефективними мішенями відповідно до винаходу. Така біспецифічна молекула може мати підвищену здатність зв'язуватися з одним або з обома антигенами-мішенями на клітинах, які експресують обидва вказаних антигени, у порівнянні з моноспецифічним діатілом або антитілом, який має специфічність тільки до одного з цих антигенів.

Переважно, зв'язувальні властивості діатіл відповідно до винаходу можуть бути охарактеризовані за допомогою функціональних аналізів in vitro для визначення активності зв'язування і/або однієї або більше FcγR-опосередковуваних функцій ефекторних клітин (опосередковуваних взаємодіями Fc-FcγR або імуноспецифічним зв'язуванням молекули діатіла з FcγR) (див. розділи 5.4.2 і 5.4.3). Афінності і зв'язувальні властивості молекул, наприклад, діатіл відповідно до винаходу відносно FcγR можуть бути визначені за допомогою аналізів in vitro (біохімічних або імунологічних аналізів), відомих фахівцям і проведених для оцінки зв'язування домен-антиген або взаємодій Fc-FcγR, тобто специфічного зв'язування антигену зі зв'язувальним доменом або специфічного зв'язування Fc-ділянки з FcγR, відповідно, де вказаними аналізами є, але не обмежуються ними, ELISA-аналіз, аналіз методом поверхневого плазмонного резонансу, аналізи методом імунопреципітації (див. розділ 5.4.2). У найбільш переважних варіантах винаходу молекули відповідно до винаходу мають аналогічні зв'язувальні властивості в аналізах, проведених на моделях in vivo (таких як моделі, що тут описані і розкриваються) і in vitro. Однак даний винахід не виключає використання молекул відповідно до винаходу, що не мають потрібного фенотипу в аналізах in vitro, але мають потрібний фенотип in vivo.

У деяких варіантах винаходу молекули відповідно до винаходу конструюють так, щоб вони мали змінений характер глікозилування або змінену глікоформу в порівнянні з порівнюваною частиною матричної молекули. Сконструйовані глікоформи можуть бути використані в різних цілях, включаючи, але не обмежуючись ними, посилення ефекторної функції. Сконструйовані глікоформи можуть бути отримані будь-яким методом, відомим фахівцям, наприклад, з використанням сконструйованих або модифікованих експресійних штамів, шляхом коекспресії з одним або більше ферментами, наприклад, з ді-N-ацетилглікозамінілтрансферазою III (Gn111), шляхом експресії діатіла відповідно до винаходу в різних організмах або клітинних лініях, які походять від різних організмів, або шляхом модифікації вуглеводу(ів) після експресії й очищення діатіла. Методи одержання сконструйованих глікоформ відомі фахівцям, і такими методами є, але не обмежуються ними, методи, описані в публікаціях: Umana et al. (1999) "Engineered Glycoforms Of An Antineuroblastoma IgG1 With Optimized Antibody-Dependent Cellular Cytotoxic Activity" Nat. Biotechnol 17:176-180; Davies et al. (2001) "Expression Of GnTIII In A Recombinant Anti-CD20 CHO Production Cell Line: Expression Of Antibodies With Altered Glycoforms Leads To An Increase In Adcc Through Higher Affinity For Fc Gamma RIII" Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields et al. (2002) "Lack Of Fucose On Human IgGI N-Linked Oligosaccharide Improves Binding To Human Fcgamma RIII And Antibody-Dependent Cellular Toxicity" J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Shinkawa et al. (2003) "The Absence Of Fucose But Not The Presence Of Galactose Or Bisecting N-Acetylglucosamine Of Human IgGI Complex-Type Oligosaccharides Shows The Critical Role Of Enhancing Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity" J. Biol. Chem. 278:3466-3473), у патенті США 6602684; у USSN 10/277370; USSN 10/113929; PCT WO 00/61739A1; PCT WO 01/292246A1; PCT WO 02/311140A1; PCT WO 02/30954A1; технологія Potillegent™ (Biowa, Inc. Princeton, NJ); технологія конструювання шляхом глікозилування GlycoMAb™ (GLYCART biotechnology AG, Zurich, Switzerland); де кожний із вказаних документів у всій своїй повноті вводиться в даний опис за допомогою посилання. Див. наприклад, WO 00061739; EA01229125; US 20030115614; Okazaki et al. (2004) "Fucose Depletion From Human IgGI Oligosaccharide Enhances Binding Enthalpy And Association Rate Between IgGI And FcGammaRIIIA" JMB, 336:1239-49, де кожний із вказаних документів у всій своїй повноті вводиться в даний опис за допомогою посилання.

Даний винахід також охоплює введення неприродних амінокислот з метою одержання діатіл відповідно до винаходу. Такі методи відомі фахівцям, наприклад, методи з використанням природних механізмів біосинтезу для включення неприродних амінокислот у білки, див., наприклад, публікації: Wang et al. (2002) "Expanding The Genetic Code" Chem. Comm. 1:1-11; Wang et al. (2001) "Expanding The Genetic Code Of Escherichia coli" Science, 292:498-500; van Hest et al. (2001) "Protein-Based Materials, Toward A New Level Of Structural Control" Chem. Comm. 19:1897-1904, кожна з який у всій своїй повноті вводиться в даний опис за допомогою посилання. Альтернативні стратегії спрямовані на ферменти, відповідальні за біосинтез аміноацил-тРНК, див., наприклад, публікації: Tang et al. (2001) "Biosynthesis Of A Highly Stable

Coiled-Coil Protein Containing Hexafluoro leucine In An Engineered Bacterial Host" J. Am. Chem. Soc. 123(44):11089-11090; Kiick et al. (2001) "Identification Of An Expanded Set Of Trans lationally Active Methionine Analogues In Escherichia coli" FEBS Lett. 502(1-2):25-30; кожна з який у всій своїй повноті вводиться в даний опис за допомогою посилання.

У деяких своїх варіантах даний винахід охоплює методи модифікації VL-, VH- або Fc-домену молекули відповідно до винаходу шляхом додавання або делеції сайта глікозилування. Методи модифікації вуглеводу білків добре відомі фахівцям і входять в обсяг даного винаходу, див., наприклад, патент США № 6218149; EP 0359096 B1; публікацію заявки США 2002/0028486; WO 03/035835; публікацію заявки США № 2003/0115614; патент США № 6218149; патент США № 6472511; які у всій своїй повноті вводяться в даний опис за допомогою посилання.

Молекули діатіла відповідно до винаходу можуть бути сконструйовані так, щоб вони містили домен, що являє собою зв'язувальний ліганд для рецептора природних клітин-кілерів групи 2D (NKG2D). Такими зв'язувальними лігандами, а зокрема, лігандами, що не експресуються на нормальних клітинах, є молекула гістосумісності 60 (H60), продукт раннього індуцибельного гена-1 ретиноєвої кислоти (RAE-1) і білкок-подібний транскрипт 1, що зв'язується з мишачим UL16 (MULT1) (Raulet D.H. (2003) "Roles Of The NKG2D Immunoreceptor And Its Ligands" Nature Rev. Immunol. 3:781-790; Coudert, J.D. et al. (2005) "Altered NKG2D Function In NK Cells Induced By Chronic Exposure To Altered NKG2D Ligand-Expressing Tumor Cells" Blood 106:1711-1717). Додатковими лігандами, що реагують з людським NKG2D, є поліморфні молекули, споріднені ланцюги MHC класу I, MICA і MICB (Diefenbach, A. et al. (1999) "Natural Killer Cells: Stress Out, Turn On, Tune In" Curr. Biol. 9(22):R851-R8533; Bauer, S. et al. (1999) "Activation Of NK Cells And T Cells By NKG2D, A Receptor For Stress-Inducible MICA" Science 285(5428):727-729; Stephens, H.A. (2001) "MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved" Trends Immunol. 22:378-385).

Послідовністю MICA є послідовність SEQ ID NO: 311:

MGLGPVFLLL AGIFPFAPPG AAAEPHSLRY NLTVLSWDGS VQSGFLTEVH
LDGQPFLRCD RQKCRAKPQG QWAEDVLGNK TWDRETRDLT GNGKDLRMTL
AHIKDQKEGL HSLQEIRVCE IHEDNSTRSS QHFYYDGELF LSQNLETKEW
TMPQSSRAQT LAMNVRNFLK EDAMKTKTHY HAMHADCLQE LRRYLKSGVV
LRRTVPPMVN VTRSEASEGN ITVTCRASGF YPWNITLSWR QDGVSLSHDT
QQWGDVLPDG NGTYQTWVAT RICQGEEQRF TCYMEHSGNH STHPVPSGKV
LVLQSHWQTF HVSAVAAAAI FVIIIFYVRC CKKKTSAAEG PELVSLQVLD
QHPVGTSDHR DATQLGFQPL MSDLGSTGST EGA

Послідовністю MICB є послідовність SEQ ID NO: 312:

PHSLRYNLMV LSQDGSVQSG FLAEGHLDGQ PFLRYDRQKR RAKPQGQWAE
DVLGAKTWDT ETEDLTENGQ DLRRTLTHIK DQKGGLHSLQ EIRVCEIHED
SSTRGSRHFY YDGELFLSQN LETQESTVPQ SSRAQTLAMN VTNFWKEDAM
KTKTHYRAMQ ADCLQKLQLP PMVNVICSEV SEGNITVTCR ASSFYPRNIT
LTWRQDGVSL SHNTQQWGDV LPDGNGTYQT WVATRIRQGE EQRFTCYMEH
SGNHGTHPVP SGKALVLQSQ RTDFPYVSAA MPCFVIIIIL CVPCCKKKTS
AAEGP

Антитілами, що специфічно зв'язуються з Т-клітинним рецептором, є анти-TCR антитіло BMA 031 (Kurrle, R. et al. (1989) "BMA 031-A TCR-Specific Monoclonal Antibody For Clinical Application" Transplant Proc. 21(1 Pt 1):1017-1019; Nashan, B. et al. (1987) "Fine Specificity Of A Panel Of Antibodies Against The TCR/CD3 Complex" Transplant Proc. 19(5):4270-4272; Shearman, C.W. et al. (1991) "Construction, Expression, And Biologic Activity Of Murine/Human Chimeric Antibodies With Specificity For The Human α/β T Cell" J. Immunol. 146(3):928-935; Shearman, C.W. et al. (1991) "Construction, Expression And Characterization of Humanized Antibodies Directed Against The Human α/β T Cell Receptor" J. Immunol. 147(12):4366-4373). Антитілами, що специфічно зв'язуються з рецептором NKG2D, є KYK-2.0 (Kwong, KY et al. (2008) "Generation, Affinity Maturation, And Characterization Of A Human Anti-Human NKG2D Monoclonal Antibody With Dual Antagonistic And Agonistic Activity" J. Mol. Biol. 384:1143-1156; і PCT/US09/54911).

При використанні такого діатіла клітину-мішень переорієнтовують так, щоб вона могла зв'язуватися з клітинами, які містять набір рецепторів (NKG2D). Рецептор NKG2D експресується на всіх людських природних клітинах-кілерах (і в клітинах інших ссавців) (Bauer, S. et al. (1999) "Activation OfNK Cells And T Cells By NKG2D, A Receptor For Stress-Inducible MICA" Science 285(5428):727-729; Jamieson, A.M. et al. (2002) "The Role Of The NKG2D Immunoreceptor In Immune Cell Activation And Natural Killing" Immunity 17(1):19-29), а також на всіх $CD8^+$-Т-клітинах (Groh, V. et al. (2001) "Costimulation OfCDSafi T Cells By NKG2D Via Engagement By MIC Induced On Virus-Infected Cells" Nat. Immunol. 2(3):255-260; Jamieson, A.M. et al. (2002) "The Role Of The NKG2D Immunoreceptor In Immune Cell Activation And Natural Killing" Immunity 17(1):19-29).

Альтернативно, молекули діатіла відповідно до винаходу можуть бути сконструйовані так, щоб вони містили домен, який являє собою зв'язувальний ліганд для Т-клітинного рецептора ("TCR"). Природний TCR експресується $CD4^+$- або $CD8^+$-Т-клітинами і дозволяє таким клітинам розпізнавати антигенні пептиди, які є зв'язаними і презентуються білками MHC класу I або класу II на антигенпрезентуючих клітинах. Розпізнавання комплексу pMHC (пептид-MHC) рецептором TCR ініціює вироблянні клітинної імунної відповіді, що приводить до продукування цитокінів і до лізису антигенпрезентуючих клітин (див., наприклад, Armstrong, K.M. et al. (2008) "Conformational Changes And Flexibility In T-Cell Receptor Recognition Of Peptide-MHC Complexes" Biochem. J. 415(Pt 2):183-196; Willemsen, R. (2008) "Selection Of Human Antibody Fragments Directed Against Tumor T-Cell Epitopes For Adoptive T-Cell Therapy" Cytometry A. 73(11):1093-1099; Beier, K.C. et al. (2007) "Master Switches Of T-Cell Activation And Differentiation" Eur. Respir. J. 29:804-812; Mallone, R. et al. (2005) "Targeting T Lymphocytes For Immune Monitoring And Intervention In Autoimmune Diabetes" Am. J. Ther. 12(6):534-550).

При конструюванні таких молекул діатіл, що додатково містять щонайменше один епітоп-зв'язувальний домен, здатний зв'язуватися, наприклад, з рецептором, який присутній на поверхні мішені, такі молекули діатіла стають молекулами DART, а тому вони набувають здатності зв'язуватися з мішенями і надають цим мішеням можливість представляти ліганд для зв'язування з рецептором природних клітин-кілерів групи 2D (NKG2D) або з TCR (з будь-якими TCR, який присутній на мішені, зв'язаній з діатілом) (див., наприклад, Germain, C. et al. (2008) "Redirecting NK Cells Mediated Tumor Cell Lysis By A New Recombinant Bifunctional Protein" Prot. Engineer. Design Selection 21(11):665-672).

Такі діатіла можуть бути використані для переорієнтації будь-якої потрібної клітини-мішені в клітину, що буде мішенню для лізису, опосередковуваного NK-клітинами, або для цитотоксичності, опосередковуваної Т-клітинами. В одному з варіантів винаходу епітоп-зв'язувальний домен діатіла, здатний зв'язуватися з рецептором, який присутній на поверхні мішені, являє собою епітоп, що зв'язується з пухлиноасоційованим антигеном так, щоб це приводило до переорієнтації таких ракових клітин у субстрати для лізису, опосередковуваного NK клітинами, або для цитотоксичності, опосередковуваної Т-клітинами. Особливий інтерес представляють пухлиноасоційовані антигени, що являють собою антиген раку молочної залози, антиген раку яєчника, антиген раку передміхурової залози, антиген раку шийки матки, антиген карциноми підшлункової залози, антиген раку легень, антиген раку сечового міхура, антиген раку товстої кишки, антиген раку яєчок, антиген гліобластоми, антиген, асоційований зі злоякісною пухлиною В-клітин; антиген, асоційований із множинною мієломою; антиген, асоційований з неходжкінською лімфомою, або антиген, асоційований с хронічним лімфоцитарним лейкозом.

Пухлиноасоційованими антигенами, що підходять для такого застосування, є A33 (антиген карциноми прямої і ободової кишки; Almqvist, Y. 2006, Nucl Med Biol. Nov; 33(8):991-998); B1 (Egloff, A.M. et al. 2006, Cancer Res. 66(l):6-9); BAGE (Bodey, B. 2002 Expert Opin Biol Ther. 2(6):577-84); бета-катенин (Prange W. et al. 2003 J Pathol. 201(2):250-9); CA125 (Bast, R.C. Jr. et al. 2005 Int J Gynecol Cancer 15 Suppl 3:274-81); CD5 (Calin, G.A. et al. 2006 Semin Oncol. 33(2):167-73; CD19 (Troussard, X. et al. 1998 Hematol Cell Ther. 40(4):139-48); CD20 (Thomas, D.A. et al. 2006 Hematol Oncol Clin North Am. 20(5):1125-36); CD22 (Kreitman, R.J. 2006 AAPS J. 18; 8(3):E532-51); CD23 (Rosati, S. et al. 2005 Curr Top Microbiol Immunol. 5; 294:91-107); CD25 (Troussard, X. et al. 1998 Hematol Cell Ther. 40(4):139-48); CD27 (Bataille, R. 2006 Haematologica 91(9):1234-40); CD28 (Bataille, R. 2006 Haematologica 91(9):1234-40); CD36 (Ge, Y. 2005 Lab Hematol. 11(1):31-7); CD40/CD154 (Messmer, D. et al. 2005 Ann N Y Acad Sci. 1062:51-60); CD45 (Jurcic, J.G. 2005 Curr Oncol Rep. 7(5):339-46); CD56 (Bataille, R. 2006 Haematologica 91(9):1234-40); CD79a/CD79b (Troussard, X. et al. 1998 Hematol Cell Ther. 40(4):139-48; Chu, P.G. et al. 2001 Appl Immunohistochem Mol Morphol. 9(2):97-106); CD103 (Troussard, X. et al. 1998 Hematol Cell Ther. 40(4):139-48); CDK4 (Lee, Y.M. et al. 2006 Cell Cycle 5(18):2110-4); CEA (карциноембріональний антиген; Mathelin, C. 2006 Gynecol Obstet Fertil. 34(7-8):638-46; Tellez-

Avila, F.I. et al. 2005 Rev Invest Clin. 57(6):814-9); CTLA4 (Peggs, K.S. et al. 2006 Curr Opin Immunol. 18(2):206-13); EGF-R (рецептор епідермального фактора росту; Adenis, A. et al. 2003 Bull Cancer. 90 Spec No:S228-32); ErbB (ErbBl; ErbB3; ErbB4; Zhou, H. et al. 2002 Oncogene 21(57):8732-40; Rimon, E. et al. 2004 Int J Oncol. 24(5):1325-38); GAGE (GAGE-1; GAGE-2; Akcakanat, A. et al. 2006 Int J Cancer. 118(1):123-8); GD2/GD3/GM2 (Livingston, P.O. et al. 2005 Cancer Immunol Immunother. 54(10):1018-25); gp100 (Lotem, M. et al. 2006 J Immunother. 29(6):616-27); HER-2/neu (Kumar, Pal S et al. 2006 Semin Oncol. 33(4):386-91); людський папіломавірус-E6/людський папіломавірус-E7 (DiMaio, D. et al. 2006 Adv Virus Res. 66:125-59; KSA (17-1 A) (Ragupathi, G. 2005 Cancer Treat Res. 123:157-80); MAGE (MAGE-1; MAGE-3; (Bodey, B. 2002 Expert Opin Biol Ther. 2(6):577-84); MART (Kounalakis, N. et al. 2005 Curr Oncol Rep. 7(5):377-82; MUC-1 (Mathelin, C. 2006 Gynecol Obstet Fertil. 34(7-8):638-46); MUM-1 (Castelli, C. et al. 2000 J Cell Physiol. 182(3):323-31); N-ацетилглюкозамінілтрансфераза (Dennis, J.W. 1999 Biochim Biophys Acta. 6; 1473(l):21-34); pl5 (Gil, J. et al. 2006 Nat Rev Mol Cell Biol. 7(9):667-77); PSA (антиген, специфічний для передміхурової залози; Cracco, CM. et al. 2005 Minerva Urol Nefrol. 57(4):301-11); PSMA (Ragupathi, G. 2005 Cancer Treat Res. 123:157-80); sTn (Holmberg, L.A. 2001 Expert Opin Biol Ther. 1(5):881-91); TNF-рецептор (рецептор TNF-α, рецептор TNF-β або рецептор TNF-γ; van Horssen, R. et al. 2006 Oncologist. 11(4):397-408; Gardnerova, M. et al. 2000 Curr Drug Targets. l(4):327-64); або рецептор VEGF (O'Dwyer. P.J. 2006 Oncologist. 11(9):992-8).

Іншими пухлиноасоційованими антигенами, використовуваними для цих цілей (і публікаціями, у яких описані антитіла, що специфічно реагують з такими антигенами), є ADAM-9 (публікація заявки на патент США № 2006/0172350; публікація PCT № WO 06/084075); ALCAM (публікація PCT № WO 03/093443); карбоксипептидаза M (публікація заявки на патент США № 2006/0166291); CD46 (патент США № 7148038; публікація PCT № WO 03/032814); цитокератин 8 (публікація PCT № WO 03/024191); рецептори ефрину (зокрема, EphA2 (патент США № 7569672; публікація PCT № WO 06/084226); інтегрин альфа-V-бета-6 (публікація PCT № WO 03/087340); JAM-3 (публікація PCT № WO 06/084078); KID3 (публікація PCT № WO 05/028498); KID31 (публікація PCT № WO 06/076584); LUCA-2 (публікація патенту США № 2006/0172349; публікація PCT № WO 06/083852); онкостатин M (рецептор онкостатину бета) (патент США № 7572896; публікація PCT № WO 06/084092); PIPA (патент США № 7405061; публікація PCT № WO 04/043239); RAAG10 (патент США № 7527969; публікація PCT № WO 04/001381); ROR1 (патент США № 5843749); TES7 (публікація PCT № WO 08/066691); і рецептор трансферину (патент США № 7572895; публікація PCT № WO 05/121179).

Інтерес також представляють антигени, специфічні до конкретних інфекційних агентів, наприклад, до вірусних агентів, включаючи, але не обмежуючись ними, вірус імунодефіциту людини (ВІЛ), вірус гепатиту B (HBV), вірус грипу, людський папіломавірус (HPV), вірус ящуру (коксаківірус), вірус сказу, вірус простого герпеса (HSV), агенти, що викликають гастроентерит, включаючи ротавіруси, аденовіруси, каліцивіруси, астровіруси і вірус Норуолк; бактеріальні агенти, включаючи, але не обмежуючись ними, агенти E. coli, Salmonella thyphimurium, Pseudomonas aeruginosa, Vibrio cholerae, Neisseria gonorrhoeae, Helicobacter pylori, Hemophylos influenzae, Shigella dysenteriae, Staphylococcus aureus, Mycobacterium tuberculosis і Streptococcus pneumoniae; грибкові агенти і паразити, такі як Giardi.

Альтернативно, такий епітоп може зв'язуватися з Fc-рецептором (наприклад, з FcγRI або FcγRII), що дозволяє, наприклад, переорієнтувати клітини гострого моноцитарного лейкозу в субстрати для лізису клітин, опосередковуваного NK-клітинами.

5.1. Зв'язувальні домени діатіл

Діатіла відповідно до винаходу включають антигензв'язувальні домени, в основному, які походять від імуноглобулінів або антитіл. Антитіла, від яких походять зв'язувальні домени, використовувані в способах відповідно до винаходу, можуть бути отримані від будь-якої тварини, включаючи птахів і ссавців (наприклад, людини, приматів, що не є людиною, мишей, ослів, овець, кроликів, кіз, морських свинок, верблюдів, коней або курей). Переважними антитілами є людські або гуманізовані моноклональні антитіла. Використовуваними тут "людськими" антитілами є антитіла, що мають амінокислотну послідовність людського імуноглобуліну, і антитіла, виділені з бібліотек людських імуноглобулінів або бібліотек синтетичних послідовностей, що кодують людські імуноглобуліни, або антитіла, виділені в мишей, у яких вказані антитіла експресуються з людських генів.

У даному винаході розглядається застосування будь-яких антитіл, відомих фахівцям, для лікування і/або попередження раку, аутоімунного захворювання, запального захворювання або інфекційного захворювання, де вказані антитіла служать джерелом зв'язувальних доменів для діатіл відповідно до винаходу. Необмежувальними прикладами відомих протиракових антитіл є

антитіла, що приводяться в розділі 5.7.1, а також інші антитіла, специфічні до перерахованих антигенів-мішеней, і антитіла проти ракових антигенів, перерахованих у розділі 5.6.1; необмежувальними прикладами відомих антитіл, використовуваних для лікування і/або попередження аутоімунного захворювання і запального захворювання, є антитіла, що приводяться в розділі 5.7.2., а також антитіла проти перерахованих антигенів-мішеней і антитіла проти антигенів, перерахованих у розділі 5.6.2; а в інших варіантах винаходу можуть бути використані антитіла проти епітопів, асоційованих з інфекційними захворюваннями, перерахованими в розділі 5.6.3. У деяких варіантах винаходу антитіла містять варіант Fc-ділянки, що має одну або більше амінокислотних модифікацій, які були ідентифіковані способами відповідно до винаходу і які надають ефекторну функцію і/або підвищену афінність до FcγRIIB і знижену афінність до FcγRIIIA у порівнянні з молекулою, що містить Fc-ділянку дикого типу. Необмежувальні приклади антитіл, що використовуються для лікування або попередження запальних розладів і які можуть бути сконструйовані відповідно до даного винаходу, представлені в таблиці 9, а необмежувальні приклади антитіл, що використовуються для лікування або попередження аутоімунного розладу, представлені в таблиці 10.

Для визначених цілей, включаючи in vivo використання антитіл для введення людині і для in vitro аналізів по детектуванню, може виявитися переважним використовувати діатіла, що містять варіабельні домени, які походять від людських, химерних або гуманізованих антитіл. Варіабельні домени від повністю людських антитіл є особливо придатними для терапевтичного лікування людини. Людські антитіла можуть бути отримані різними методами, відомими фахівцям, включаючи описані вище методи фагового представлення, у яких використовуються бібліотеки антитіл, які походять від послідовностей людського імуноглобуліну. Див., також патенти США №№ 4444887 і 4716111; і публікації Міжнародних заявок WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 і WO 91/10741, що у всій своїй повноті вводяться в даний опис за допомогою посилання.

Гуманізованим антитілом є антитіло, його варіант або фрагмент, які мають здатність зв'язуватися з попередньо визначеним антигеном і містять каркасну ділянку, що має, в основному, амінокислотну послідовність людського імуноглобуліну, і CDR, що має, в основному, амінокислотну послідовність нелюдського імуноглобуліну. Гуманізоване антитіло може містити, в основному, усі, або щонайменше один, а звичайно два варіабельні домени, у яких усі або майже всі ділянки CDR відповідають ділянкам не-людського імуноглобуліну (тобто, донорного антитіла), і всі або майже всі каркасні ділянки відповідають ділянкам консенсусної послідовності людського імуноглобуліну.

Каркасні ділянки і CDR-ділянки гуманізованого антитіла необов'язково повинні точно відповідати ділянкам батьківських послідовностей, наприклад, донорна CDR або консенсусна каркасна ділянка можуть бути піддані мутагенезу шляхом заміни, інсерції або делеції щонайменше одного залишку так, щоб залишок CDR або каркасний залишок у цьому сайті не відповідали ні консенсусному антитілу, ні донорному антитілу. Однак такі мутації переважно не є численними. Звичайно щонайменше 75 %, найчастіше 90 % залишків, а найбільше переважно більше 95 % залишків гуманізованого антитіла відповідають послідовностям батьківської каркасної ділянки (FR) і CDR. Гуманізовані антитіла можуть бути продуковані різними методами, відомими фахівцям, включаючи, але не обмежуючись ними, CDR-щеплення (Європейський патент № EP 239400; публікація Міжнародної заявки № WO 91/09967; і патенти США №№ 5225539, 5530101 і 5585089), "оздоблення" або "облицювання" (Європейські патенти №№ EP 592106 і EP 519596; Padlan (1991) "A Possible Procedure For Reducing The Immunogenicity Of Antibody Variable Domains While Preserving Their Ligand-Binding Properties" Molecular Immunology 28(4/5):489-498; Studnicka et al. (1994) "Human-Engineered Monoclonal Antibodies Retain Full Specific Binding Activity By Preserving Non-CDR Complementarity-Modulating Residues" Protein Engineering 7(6):805-814; і Roguska et al. (1994) "Humanization Of Murine Monoclonal Antibodies Through Variable Domain Resurfacing" Proc Natl Acad Sci USA 91:969-973), перестановку ланцюгів (патент США № 5565332), і методи, описані, наприклад, у патентах США №№ 6407213, 5766886, 5585089, у публікації Міжнародної заявки № WO 9317105, Tan et al. (2002) "Superhumanized' Antibodies: Reduction Of Immunogenic Potential By Complementarity-Determining Region Grafting With Human Germline Sequences: Application To An Anti-CD28" J. Immunol. 169:1119-25, Caldas et al. (2000) "Design And Synthesis Of Germline-Based Hemi-Humanized Single-Chain Fv Against The CD 18 Surface Antigen" Protein Eng. 13:353-60, Morea et al. (2000) "Antibody Modeling: Implications For Engineering And Design" Methods 20:267-79, Baca et al. (1997) "Antibody Humanization Using Monovalent Phage Display" J. Biol. Chem. 272:10678-84, Roguska et al. (1996) "A Comparison of Two Murine Monoclonal Antibodies Humanized By CDR-Grafting And Variable Domain Resurfacing" Protein Eng. 9:895-904, Couto et al. (1995) "Designing Human

Consensus Antibodies With Minimal Positional Templates" Cancer Res. 55 (23 Supp):5973s-5977s, Couto et al. (1995) "Anti-BA46 Monoclonal Antibody Mc3: Humanization Using A Novel Positional Consensus And In Vivo And In Vitro Characterization" Cancer Res. 55:1717-22, Sandhu (1994) "A Rapid Procedure For The Humanization Of Monoclonal Antibodies" Gene 150:409-10, Pedersen et al. (1994) "Comparison Of Surface Accessible Residues In Human And Murine Immunoglobulin Fv Domains. Implication For Humanization Of Murine Antibodies" J. Mol. Biol. 235:959-973, Jones et al. (1986) "Replacing The Complementarity-Determining Regions In A Human Antibody With Those From A Mouse" Nature 321:522-525, Riechmann et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies For Therapy" Nature 332:323-327, and Presta (1992) "Antibody Engineering" Curr. Op. Biotech. 3(4):394-398. У більшості випадків каркасні залишки в каркасних ділянках заміняють відповідним залишком CDR донорного антитіла з метою зміни, а переважно, підвищення рівня зв'язування з антигеном. Ці заміни в каркасних ділянках ідентифікують методами, добре відомими фахівцям, наприклад, шляхом моделювання взаємодії CDR і каркасних залишків з метою ідентифікації каркасних залишків, що відіграють важливу роль у зв'язуванні з антигеном, і для порівняння послідовностей з метою ідентифікації рідких каркасних залишків у конкретних положеннях (див., наприклад, Queen et al., патент США № 5585089; публікації заявок США №№ 2004/0049014 і 2003/0229208; патенти США №№ 6350861; 6180370; 5693762; 5693761; 5585089 і 5530101; і Riechmann et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies For Therapy" Nature 332:323-327, що у всій своїй повноті вводяться в даний опис за допомогою посилання).

В особливо переважному варіанті винаходу зв'язувальний домен гуманізованого антитіла специфічно зв'язується з тим же епітопом, з яким зв'язується донорне мишаче антитіло. Для фахівця в даній галузі очевидно, що даний винахід у цілому охоплює CDR-щеплення антитіл. Таким чином, донорне й акцепторне антитіла можуть походити від тварин того самого виду і навіть від антитіла того самого класу або підкласу. Однак, найчастіше, донорне й акцепторне антитіла походять від тварин різних видів. Звичайно донорним антитілом є нелюдське антитіло, таке як mAb гризунів, а акцепторним антитілом є людське антитіло.

У деяких варіантах винаходу щонайменше одну CDR від донорного антитіла переносять у людське антитіло. В інших варіантах винаходу щонайменше дві, а переважно всі три CDR кожної варіабельної ділянки важкого і/або легкого ланцюга переносять у людське антитіло. Ці CDR можуть містити CDR по Кебату, CDR структурної петлі або їхню комбінацію. У деяких своїх варіантах даний винахід охоплює гуманізоване FcγRIIB-специфічне антитіло, що містить щонайменше один CDR-щеплений важкий ланцюг і щонайменше один CDR-щеплений легкий ланцюг.

Діатіла, використовувані в способах відповідно до винаходу, включають похідні, які були модифіковані, наприклад, шляхом ковалентного зв'язування молекули будь-якого типу з діатілом. Прикладами похідних діатіл є, але не обмежуються ними, діатіла, які були модифіковані, наприклад, шляхом глікозилування, ацетилування, ПЕГилування, фосфорилування, амідування, дериватизації відомими захисними/блокуючими групами, протеолітичного розщеплення, зв'язування з клітинним лігандом або з іншим білком і т. п. Будь-які різні хімічні модифікації можуть бути здійснені з застосуванням відомих методів, включаючи, але не обмежуючись ними, специфічне хімічне розщеплення, ацетилування, формілування, метаболічний синтез туникаміцину і т. п. Крім того, вказане похідне може містити одну або більше некласичних амінокислот.

Химерне антитіло являє собою молекулу, у якій різні частини антитіла походять від різних молекул імуноглобуліну, таких як антитіла, що мають варіабельну ділянку, яка походить від нелюдського антитіла, і константну ділянку людського імуноглобуліну. Методи одержання химерних антитіл відомі фахівцям. Див., наприклад, Morrison (1985) "Transfectomas Provide Novel Chimeric Antibodies" Science 229:1202-1207; Oi et al. (1986) "Chimeric Antibodies" BioTechniques 4:214-221; Gillies et al. (1989) "High-Level Expression Of Chimeric Antibodies Using Adapted cDNA Variable Region Cassettes" J. Immunol. Methods 125:191-202; і патенти США №№ 6311415, 5807715, 4816567 і 4816397, що у всій своїй повноті вводяться в даний опис за допомогою посилання.

У більшості випадків каркасні залишки в каркасних ділянках замінюють відповідним залишком CDR донорного антитіла з метою зміни, а переважно підвищення рівня зв'язування з антигеном. Ці заміни в каркасних ділянках ідентифікують методами, добре відомими фахівцям, наприклад, шляхом моделювання взаємодій CDR і каркасних залишків з метою ідентифікації каркасних залишків, що відіграють важливу роль у зв'язуванні з антигеном, і для порівняння послідовностей з метою ідентифікації рідких каркасних залишків у конкретних положеннях (див., наприклад, патент США № 5585089; і Riechmann et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies For

Therapy" Nature 332:323-327, що у всій своїй повноті вводяться в даний опис за допомогою посилання).

Моноклональні антитіла, від яких походять зв'язувальні домени діатіл відповідно до винаходу, можуть бути отримані з застосуванням технологій широкого ряду, відомих фахівцям, включаючи гібридомну технологію, техніку рекомбінантних ДНК і технологію фагового представлення або їхні комбінації. Так, наприклад, моноклональні антитіла можуть бути отримані з застосуванням гібридомної технології, включаючи технології, відомі фахівцям і описані, наприклад, у публікаціях Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling, et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, pp. 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981) (які у всій своїй повноті вводяться в даний опис за допомогою посилання). Використовуваний тут термін "моноклональне антитіло" не обмежується антитілами, отриманими з застосуванням гібридомної технології. Термін "моноклональне антитіло" означає антитіло, що походить від одного клону, включаючи будь-який еукаріотичний, прокаріотичний або фаговий клон, але не обмежується способом його одержання.

Способи продукування і скринінгу специфічних антитіл із застосуванням гібридомної технології є рутинними методами, добре відомими фахівцям. У необмежувальному прикладі миші можуть бути імунізовані антигеном, що представляє інтерес, або клітиною, яка експресує такий антиген. Після детектування імунної відповіді, наприклад, антитіла, специфічні до антигену, детектують у мишачій сироватці, а потім беруть селезінку і виділяють спленоцити. Після цього спленоцити піддають злиттю з будь-якими придатними мієломними клітинами добре відомими методами. Гібридоми відбирають і клонують шляхом лімітуючого розведення. Потім гібридомні клони аналізують відомими методами на клітини, секретуючі антитіла, здатні зв'язуватися з антигеном. Асцитна рідина, що в основному містить високі рівні антитіл, може бути отримана шляхом внутрішньоочеревинної інокуляції мишей позитивними гібридомними клонами. Антигенами, що представляють інтерес, є, але не обмежуються ними, антигени, асоційовані з раковими захворюваннями, перерахованими в розділі 5.8.1, антигени, асоційовані з аутоімунними і запальними захворюваннями, перерахованими в розділі 5.8.2, антигени, асоційовані з інфекційними захворюваннями, перерахованими в розділі 5.8.3, і токсини, перераховані в розділі 5.8.4.

Антитіла можуть бути також отримані різними методами фагового представлення, відомими фахівцям. У методах фагового представлення функціональні домени антитіл представляють на поверхні фагових частинок, що несуть полінуклеотидні послідовності, які кодують ці домени. У конкретному варіанті винаходу такий фаг може бути використаний для представлення антигензв'язувальних доменів, таких як Fab і Fv або Fv, стабілізованих дисульфідними зв'язками, де вказані домени були експресовані з бібліотеки репертуару антитіл або комбінаторної бібліотеки антитіл (наприклад, людських або мишачих). Фаг, який експресує антигензв'язувальний домен, що зв'язується з антигеном, який представляє інтерес, може бути відібраний або ідентифікований з використанням антигену, наприклад, з використанням міченого антигену або антигену, зв'язаного з твердою поверхнею або зі сферами, або антигену, іммобілізованого на вказаних поверхнях або сферах. Фагом, використовуваним у цих методах, звичайно є нитчастий фаг, включаючи fd і M13. Антигензв'язувальні домени експресуються як рекомбінантні злиті білки, приєднані рекомбінантними методами до білка фагового гена III або гена VIII. Прикладами методів фагового представлення, що можуть бути застосовані для одержання імуноглобулінів або їхніх фрагментів відповідно до винаходу, є методи, описані в публікаціях Brinkmann et al. (1995) "Phage Display Of Disulfide-Stabilized Fv Fragments" J. Immunol. Methods, 182:41-50; Ames et al. (1995) "Conversion Of Murine Fabs Isolated From A Combinatorial Phage Display Library To Full Length Immunoglobulins" J. Immunol. Methods, 184:177-186; Kettleborough et al. (1994) "Isolation Of Tumor Cell-Specific Single-Chain Fv From Immunized Mice Using Phage-Antibody Libraries And The Re-Construction Of Whole Antibodies From These Antibody Fragments" Eur. J. Immunol, 24:952-958; Persic et al. (1997) "An Integrated Vector System For The Eukaryotic Expression Of Antibodies Or Their Fragments After Selection From Phage Display Libraries" Gene, 187:9-18; Burton et al. (1994) "Human Antibodies From Combinatorial Libraries" Advances in Immunology, 57:191-280; у заявці PCT № PCT/GB91/01134; заявках PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; і в патентах США №№ 5698426; 5223409; 5403484; 5580717; 5427908; 5750753; 5821047; 5571698; 5427908; 5516637; 5780225; 5658727; 5733743 і 5969108; які у всій своїй повноті вводяться в даний опис за допомогою посилання.

Технологія фагового представлення може бути застосована для підвищення афінності антитіла відносно його антигену. Ця технологія може бути використана для одержання у високому ступені афінних антитіл. У цій технології, основаній на дозріванні афінності,

використовують мутагенез або "прогулянку" по CDR і повторний відбір з використанням когнатного антигену для ідентифікації антитіл, що зв'язуються з антигеном з більш високою афінністю в порівнянні з вихідним батьківським антитілом (див., наприклад, Glaser et al. (1992) "Dissection Of The Combining Site In A Humanized Anti-Tac Antibody" J. Immunology 149:2607-2614). Мутагенез цілих кодонів, а не окремих нуклеотидів, дозволяє одержати напіврандомізований набір амінокислотних мутацій. Можуть бути сконструйовані бібліотеки, що складаються з пулу варіантів клонів, кожний з який відрізняється від іншого однією амінокислотною модифікацією в одній CDR, і містить варіанти, що представляють кожну можливу амінокислотну заміну для кожного залишку CDR. Мутанти з підвищеною афінністю зв'язування з антигеном можуть бути скриновані за допомогою контактування іммобілізованих мутантів з міченим антигеном. Для ідентифікації мутантних антитіл з підвищеною авідністю до антигену може бути застосований будь-який метод скринінгу, відомий фахівцям (наприклад, ELISA) (див. Wu et al. (1998) "Stepwise In Vitro Affinity Maturation Of Vitaxin, An Alphav Beta3-Specific Humanized mAb" Proc Natl. Acad Sci. USA 95:6037-6042; Yelton et al. (1995) "Affinity Maturation Of The Br96 Anti-Carcinoma Antibody By Codon-Based Mutagenesis" J. Immunology 155:1994-2004). Може бути також застосований метод "прогулянки" по CDR, що дозволяє здійснити рандомізацію легкого ланцюга (див. Schier et al. (1996) "Isolation Of Picomolar Affinity Anti-C-ErbB-2 Single-Chain Fv By Molecular Evolution Of The Complementarity Determining Regions In The Center Of The Antibody Binding Site" J. Mol. Bio. 263:551-567).

Даний винахід також охоплює використання зв'язувальних доменів, що містять амінокислотну послідовність кожного зі зв'язувальних доменів, які описані у даній заявці або відомі фахівцям і містять мутації (наприклад, одну або більше амінокислотних замін) у каркасній ділянці або в CDR-ділянці. Переважно, щоб мутації в цих зв'язувальних доменах зберігали або підвищували авідність і/або афінність зв'язувальних доменів до FcγRIIB, з яким вони імуноспецифічно зв'язуються. Для аналізу афінності антитіла до конкретного антигену можуть бути застосовані стандартні методи, відомі фахівцям (наприклад, імуноаналізи).

Для введення мутацій у нуклеотидну послідовність, яка кодує антитіло або його фрагмент, можуть бути застосовані стандартні методи, відомі фахівцям, включаючи, наприклад, сайт-направлений мутагенез і ПЛР-опосередований мутагенез, що приводить до амінокислотних замін. При цьому переважно, щоб такі похідні включали менше ніж 15 амінокислотних замін, менше ніж 10 амінокислотних замін, менше ніж 5 амінокислотних замін, менше ніж 4 амінокислотні заміни, менше ніж 3 амінокислотні заміни або менше ніж 2 амінокислотні заміни в порівнянні з вихідним антитілом або його фрагментом. У переважному варіанті винаходу похідні мають консервативні амінокислотні заміни, зроблені в положеннях одного або більше передбачених замінних амінокислотних залишків.

5.1.1. Діатіла, що містять епітоп-зв'язувальні сайти, які імуноспецифічно зв'язуються з FcγRIIB

У конкретному варіанті винаходу щонайменше один зі зв'язувальних доменів діатіл відповідно до винаходу діє як агоніст щонайменше однієї активності FcγRIIB. В одному з варіантів винаходу вказаною активністю є інгібування передачі сигналу, опосередковуваної B-клітинним рецептором. В іншому варіанті винаходу зв'язувальний домен інгібує активацію B-клітин, проліферацію B-клітин, продукування антитіла, приплив внутрішньоклітинного кальцію у B-клітини, проходження клітинних циклів або активність однієї або більше молекул передачі сигналу, що діють у наступних реакціях шляху передачі сигналу FcγRIIB. В іншому варіанті винаходу зв'язувальний домен підвищує рівень фосфорилування FcγRIIB або рекрутинг SHIP. В іншому варіанті винаходу зв'язувальний домен інгібує активність кінази MAP або рекрутинг Akt у шляху передачі сигналу, опосередковуваного B-клітинним рецептором. В іншому варіанті винаходу зв'язувальний домен підсилює FcγRIIB-опосередковуване інгібування передачі сигналу FcεRI. У конкретному варіанті винаходу вказаний зв'язувальний домен інгібує FcεRI-індуковану активацію тучних клітин, мобілізацію кальцію, дегрануляцію, продукування цитокінів або вивільнення серотоніну. В іншому варіанті винаходу зв'язувальні домени відповідно до винаходу стимулюють фосфорилування FcγRIIB, стимулюють рекрутинг SHIP, стимулюють фосфорилування SHIP і його зв'язування з Shc, або інгібують активацію членів сімейства кіназ MAP (наприклад, Erk1, Erk2, JNK, p38 і т. п.). В іншому варіанті винаходу зв'язувальні домени відповідно до винаходу підвищують рівень фосфорилування тирозину p62dok і його зв'язування з SHIP і rasGAP. В іншому варіанті винаходу зв'язувальні домени відповідно до винаходу інгібують FcγR-опосередковуваний фагоцитоз у моноцитах або у макрофагах.

В іншому варіанті винаходу зв'язувальні домени діють як антагоністи щонайменше однієї активності FcγRIIB. В одному з варіантів винаходу вказаною активністю є активація передачі сигналу, опосередковуваної B-клітинним рецептором. У конкретному варіанті винаходу

зв'язувальні домени підсилюють активність В-клітин, проліферацію В-клітин, продукування антитіла, приплив внутрішньоклітинного кальцію або активність однієї або більше молекул передачі сигналу, що діють у наступних реакціях шляху передачі сигналу FcγRIIB. В іншому конкретному варіанті винаходу зв'язувальні домени знижують рівень фосфорилування FcγRIIB або рекрутинг SHIP. В іншому варіанті винаходу зв'язувальні домени підсилюють активність кінази MAP або рекрутинг Akt у шляху передачі сигналу, опосередковуваного В-клітинним рецептором. В іншому варіанті винаходу зв'язувальні домени є антагоністами FcγRIIB-опосередковуваного інгібування передачі сигналу FcεRI. У конкретному варіанті винаходу вказані зв'язувальні домени підсилюють FcεRI-індуковану активацію тучних клітин, мобілізацію кальцію, дегрануляцію, продукування цитокінів або вивільнення серотоніну. В іншому варіанті винаходу зв'язувальні домени інгібують фосфорилування FcγRIIB, рекрутинг SHIP, фосфорилування SHIP і його зв'язування з Shc, і підсилюють активацію членів сімейства кіназ MAP (наприклад, Erk1, Erk2, JNK, p38 і т. п.). В іншому варіанті винаходу зв'язувальні домени інгібують рівень фосфорилування тирозину p62dok і його зв'язування з SHIP і rasGAP. В іншому варіанті винаходу зв'язувальні домени підсилюють FcγR-опосередковуваний фагоцитоз у моноцитах або у макрофагах. В іншому варіанті винаходу зв'язувальні домени попереджають фагоцитоз, кліренс опсонізованих частинок макрофагами селезінки.

В інших варіантах винаходу щонайменше один зі зв'язувальних доменів може бути використаний для націлювання діатіл відповідно до винаходу на клітини, які експресують FcγRIIB.

В одному конкретному варіанті винаходу один зі зв'язувальних доменів походить від мишачого моноклонального антитіла, продукованого клоном 2B6 або 3H7, що має реєстраційні номери ATCC PTA-4591 і PTA-4592, відповідно. Гібридоми, які продукують антитіла 2B6 і 3H7, були депоновані в Американській колекції типових культур (10801 University Blvd., Manassas, VA. 20110-2209) 13 серпня 2002 р. відповідно до Будапештського договору про міжнародне визнання депонування мікроорганізмів для цілей патентних процедур, і мають реєстраційні номери PTA-4591 (для гібридоми, яка продукує 2B6) і PTA-4592 (для гібридоми, яка продукує 3H7), відповідно, і ці гібридоми вводяться в даний опис за допомогою посилання. У переважному варіанті винаходу зв'язувальні домени є людськими або гуманізованими, переважно походять від гуманізованого варіанта антитіла, продукованого клонами 3H7 або 2B6.

Даний винахід також охоплює діатіла, що мають зв'язувальні домени, які походять від інших антитіл і специфічно зв'язуються з FcγRIIB, переважно з людським FcγRIIB і більш переважно з нативним людським FcγRIIB, а також походять від клонів, включаючи, але не обмежуючись ними, клони 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 і 1F2 з реєстраційними номерами ATCC PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 і PTA-5959, відповідно. Гібридоми, які продукують ідентифіковані вище клони, були депоновані в Американській колекції типових культур (10801 University Blvd., Manassas, VA. 20110-2209) 7 травня 2004 р. відповідно до Будапештського договору і вводиться в даний опис за допомогою посилання. У переважних варіантах винаходу зв'язувальні домени, які походять від вищеописаних антитіл, є гуманізованими.

У конкретному варіанті винаходу зв'язувальні домени, використовувані в діатілах відповідно до винаходу, походять від антитіла або його антигензв'язувального фрагмента (наприклад, що містить одну або більше гіперваріабельних ділянок (CDR), переважно всі 6 CDR) антитіла, продукованого клонами 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 або 1F2. В іншому варіанті винаходу зв'язувальний домен зв'язується з тим же епітопом, з яким зв'язується мишаче моноклональне антитіло, продуковане клонами 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 або 1F2, відповідно, і/або конкурує з мишачим моноклональним антитілом, яке продукується клонами 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 або 1F2, як було визначено, наприклад, у або ELISA-аналізі в іншому відповідному конкурентному імуноаналізі, а також зв'язується з FcγRIIB з афінністю, яка перевищує афінність зв'язування зв'язувального домену з FcγRIIA.

Даний винахід також охоплює діатіла зі зв'язувальними доменами, що містять амінокислотну послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга і/або варіабельної ділянки легкого ланцюга, що щонайменше на 45 %, щонайменше на 50 %, щонайменше на 55 %, щонайменше на 60 %, щонайменше на 65 %, щонайменше на 70 %, щонайменше на 75 %, щонайменше на 80 %, щонайменше на 85 %, щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 % або щонайменше на 99 % ідентична амінокислотній послідовності варіабельної ділянки важкого ланцюга і/або легкого ланцюга мишачого моноклонального антитіла, продукованого клонами 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 або 1F2. Даний винахід також охоплює діатіла зі зв'язувальними доменами, що специфічно зв'язуються з FcγRIIB з афінністю, яка перевищує афінність зв'язування вказаного антитіла або його фрагмента з FcγRIIA, і містять амінокислотну послідовність однієї або більше CDR, що щонайменше на 45 %, щонайменше на 50 %, щонайменше на 55 %, щонайменше на

60 %, щонайменше на 65 %, щонайменше на 70 %, щонайменше на 75 %, щонайменше на 80 %, щонайменше на 85 %, щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 % або щонайменше на 99 % ідентична амінокислотній послідовності однієї або більше CDR мишачого моноклонального антитіла, продукованого клонами 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 або 1F2. Визначення відсотка ідентичності двох амінокислотних послідовностей може бути здійснено будь-яким методом, відомим фахівцям, включаючи алгоритм пошуку білків BLAST.

Даний винахід також охоплює використання діатіл, що містять зв'язувальні домени, які специфічно зв'язуються з FcγRIIB з афінністю, яка перевищує афінність зв'язування зв'язувального домену з FcγRIIA, і кодуються нуклеотидною послідовністю, яка гібридизується з нуклеотидною послідовністю мишачого моноклонального антитіла, продукованого клонами 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 або 1F2 у відповідних умовах твердості. У переважному варіанті винаходу зв'язувальний домен специфічно зв'язується з FcγRIIB з афінністю, яка перевищує афінність зв'язування з FcγRIIA, і містить варіабельну ділянку легкого ланцюга і/або варіабельну ділянку важкого ланцюга, які кодуються нуклеотидною послідовністю, яка гібридизується у відповідних умовах твердості з нуклеотидною послідовністю варіабельної ділянки легкого ланцюга і/або варіабельної ділянки важкого ланцюга мишачого моноклонального антитіла, продукованого клонами 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 або 1F2 у відповідних умовах твердості. В іншому переважному варіанті винаходу зв'язувальні домени специфічно зв'язуються з FcγRIIB з афінністю, яка перевищує афінність зв'язування з FcγRIIA, і містять одну або більше CDR, які кодуються нуклеотидною послідовністю, що гібридизується у відповідних умовах твердості з нуклеотидною послідовністю однієї або більше CDR мишачого моноклонального антитіла, продукованого клонами 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 або 1F2. Жорсткими умовами гібридизації є, але не обмежуються ними, гібридизація з ДНК, зв'язаної з фільтром, у 6X хлориді натрію/цитраті натрію (SSC) приблизно при 45 °C, а потім одне або більше промивань у 0,2X SSC/0,1 % ДСН приблизно при 50-65 °C, гібридизація в умовах високої твердості, така як гібридизація з ДНК, зв'язаної з фільтром, у 6X SSC приблизно при 45 °C, а потім одне або більше промивань у 0,1X SSC/0,2 % ДСН приблизно при 60 °C, або гібридизація в будь-яких інших умовах твердості, відомих фахівцям (див., наприклад, посібник Ausubel, F.M. et al, eds. 1989 Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1, Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley and Sons, Inc., NY, стор. 6.3.1-6.3.6 і 2.10.3, що вводиться в даний опис за допомогою посилання).

Даний винахід також охоплює використання зв'язувальних доменів, які містять амінокислотну послідовність будь-яких описаних вище зв'язувальних доменів, що має мутації (наприклад, одну або більше амінокислотних замін) у каркасній ділянці або в CDR-ділянках. Переважно, мутації в цих зв'язувальних доменах зберігають або підвищують авідність і/або афінність зв'язувальних доменів відносно FcγRIIB, з яким вони імуноспецифічно зв'язуються. Для аналізу афінності антитіла до конкретного антигену можуть бути застосовані стандартні методи, відомі фахівцям (наприклад, імуноаналізи).

Для введення мутацій у нуклеотидну послідовність, яка кодує антитіло або його фрагмент, можуть бути застосовані стандартні методи, відомі фахівцям, включаючи, наприклад, сайт-направлений мутагенез і ПЛР-опосередковуваний мутагенез, що приводить до амінокислотних замін. При цьому переважно, щоб такі похідні включали менше ніж 15 амінокислотних замін, менше ніж 10 амінокислотних замін, менше ніж 5 амінокислотних замін, менше ніж 4 амінокислотні заміни, менше ніж 3 амінокислотні заміни або менше ніж 2 амінокислотні заміни в порівнянні з вихідним антитілом або його фрагментом. У переважному варіанті винаходу похідні мають консервативні амінокислотні заміни, зроблені в одному або більше передбачених положеннях замінних амінокислотних залишків.

У переважних варіантах винаходу зв'язувальні домени походять від гуманізованих антитіл. Гуманізоване FcγRIIB-специфічне антитіло може містити, в основному, усі або щонайменше один, а звичайно два варіабельні домени, у яких усі або майже всі CDR-ділянки відповідають ділянкам нелюдського імуноглобуліну (тобто, донорного антитіла) і всі або майже всі каркасні ділянки відповідають ділянкам консенсусної послідовності людського імуноглобуліну.

Діатіла відповідно до винаходу містять гуманізовані варіабельні FcγRIIB-специфічні домени, у яких одна або більше ділянок однієї або більше CDR варіабельних ділянок важкого і/або легкого ланцюга людського антитіла (антитіла-реципієнта) замінені аналогічними частинами однієї або більше CDR донорного моноклонального антитіла, що специфічно зв'язується з FcγRIIB з афінністю, яка перевищує афінність зв'язування з FcγRIIA, наприклад, моноклонального антитіла, продукованого клонами 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 або 1F2. В інших варіантах винаходу гуманізовані антитіла зв'язуються з тими ж епітопами, з якими зв'язуються клони 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 або 1F2, відповідно.

У переважному варіанті винаходу CDR-ділянки гуманізованого FcγRIIB-зв'язувального домену походять від мишачого антитіла, специфічного до FcγRIIB. У деяких варіантах винаходу описані тут гуманізовані антитіла містять модифікації, включаючи, але не обмежуючись ними, амінокислотні делеції, інсерції, модифікації акцепторного антитіла, тобто каркасних ділянок людського варіабельного домену важкого і/або легкого ланцюга, які необхідні для збереження специфічності зв'язування донорного моноклонального антитіла. У деяких варіантах винаходу каркасні ділянки описаних тут гуманізованих антитіл необов'язково складаються з точно визначеної амінокислотної послідовності каркасної ділянки варіабельного домену природного людського антитіла, але містять різні модифікації, включаючи, але не обмежуючись ними, амінокислотні делеції, інсерції, модифікації, що змінюють властивості гуманізованого антитіла, наприклад, поліпшують зв'язувальні властивості ділянки гуманізованого антитіла, що є специфічної до тієї ж самої мішені, до якої специфічне мишаче FcγRIIB-специфічне антитіло. У найбільш переважних варіантах винаходу в каркасну ділянку уводять мінімальне число модифікацій, щоб уникнути великих включень нелюдських каркасних залишків і для гарантії мінімальної імуногенності гуманізованого антитіла в людини. Донорним моноклональним антитілом переважно є моноклональне антитіло, продуковане клонами 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 або 1F2.

У конкретному варіанті винаходу зв'язувальний домен охоплює варіабельні домени CDR-щепленого антитіла, яке специфічно зв'язується з FcγRIIB з афінністю, яка перевищує афінність зв'язування вказаного антитіла з FcγRIIA, де вказане CDR-щеплене антитіло включає домен варіабельної ділянки важкого ланцюга, що містить каркасні залишки антитіла-реципієнта і залишки донорного моноклонального антитіла, що специфічно зв'язується з FcγRIIB з афінністю, яка перевищує афінність зв'язування вказаного антитіла з FcγRIIA, наприклад, моноклонального антитіла, продукованого клонами 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 або 1F2. В іншому конкретному варіанті винаходу діатіла відповідно до винаходу включають варіабельні домени CDR-щепленого антитіла, що специфічно зв'язується з FcγRIIB з афінністю, яка перевищує афінність зв'язування вказаного антитіла з FcγRIIA, де вказане CDR-щеплене антитіло включає домен варіабельної ділянки легкого ланцюга, що містить каркасні залишки антитіла-реципієнта і залишки донорного моноклонального антитіла, що специфічно зв'язується з FcγRIIB з афінністю, яка перевищує афінність зв'язування вказаного антитіла з FcγRIIA, наприклад, моноклонального антитіла, продукованого клонами 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 або 1F2.

Гуманізовані варіабельні домени анти-FcγRIIB антитіла, використовувані в даному винаході, можуть мати варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність CDR1 (SEQ ID NO: 24 або SEQ ID NO: 25) і/або CDR2 (SEQ ID NO: 26 або SEQ ID NO: 27) і/або CDR3 (SEQ ID NO: 28 або SEQ ID NO: 29), і/або варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність CDR1 (SEQ ID NO: 30 або SEQ ID NO: 31) і/або CDR2 (SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 або SEQ ID NO: 35) і/або CDR3 (SEQ ID NO: 36 або SEQ ID NO: 37).

В одному конкретному варіанті винаходу діатіло містить варіабельні домени гуманізованого антитіла 2B6, де VH-ділянка складається з FR-сегментів, які походять від VH-сегмента людської зародкової лінії VH1-18 (Matsuda et al. (1998) "The Complete Nucleotide Sequence Of The Human Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region Locus" J. Exp. Med. 188:2151-2162) і JH6 (Ravetch et al. (1981) "Structure Of The Human Immunoglobulin Mu Locus: Characterization Of Embryonic And Rearranged J And D Genes" Cell 27(3 Pt. 2):583-91), і однієї або більше CDR-ділянок VH 2B6, що має амінокислотну послідовність SED ID NO: 24, SEQ ID NO: 26 або SEQ ID NO: 28. В одному з варіантів винаходу VH 2B6 має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 38. В іншому варіанті винаходу VH-домен 2B6 має амінокислотну послідовність Hu2B6VH, SEQ ID NO: 85, і може кодуватися нуклеотидною послідовністю SEQ ID NO: 86. В іншому конкретному варіанті винаходу діатіло також містить VL-ділянку, що складається з FR-сегментів VL-сегмента людської зародкової лінії VK-A26 (Lautner-Rieske et al. (1992) "The Human Immunoglobulin Kappa Locus. Characterization Of The Duplicated A Regions" Eur. J. Immunol. 22:1023-1029) і JK4 (Hieter et al. (1982) "Evolution Of Human Immunoglobulin Kappa J Region Genes" J. Biol. Chem. 257:1516-22), і однієї або більше CDR-ділянок VL 2B6, що мають амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 і SEQ ID NO: 36. В одному з варіантів винаходу VL 2B6 має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 39; SEQ ID NO: 40 або SEQ ID NO: 41. У конкретному варіанті винаходу VL 2B6 має амінокислотну послідовність Hu2B6VL, SEQ ID NO: 87, і може кодуватися нуклеотидною послідовністю, представленою в SEQ ID NO: 88.

В іншому конкретному варіанті винаходу діатіло має варіабельні домени гуманізованого антитіла 3H7, де VH-ділянка складається з FR-сегментів, які походять від VH-сегмента людської зародкової лінії і CDR-ділянок VH 3H7, що мають амінокислотну послідовність SEQ ID NO. 35. В іншому конкретному варіанті винаходу гуманізоване антитіло 3H7 також містить VL-ділянки, що складаються з FR-сегментів VL-сегмента людської зародкової лінії і CDR-ділянок 3H7VL, що мають амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 42.

Зокрема, зв'язувальні домени імуноспецифічно зв'язуються з позаклітинними доменами нативного людського FcγRIIB і містять (або альтернативно складаються з них) послідовності CDR 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 або 1F2, у кожній з нижченаведених комбінацій: VH CDR1 і VL CDR1; VH CDR1 і VL CDR2; VH CDR1 і VL CDR3; VH CDR2 і VL CDR1; VH CDR2 і VL CDR2; VH CDR2 і VL CDR3; VH CDR3 і VH CDR1; VH CDR3 і VL CDR2; VH CDR3 і VL CDR3; VH1 CDR1; VH CDR2 і VL CDR1; VH CDR1; VH CDR2 і VL CDR2; VH CDR1, VH CDR2 і VL CDR3; VH CDR2, VH CDR3 і VL CDR1; VH CDR2, VH CDR3 і VL CDR2; VH CDR2, VH CDR2 і VL CDR3; VH CDR1, VL CDR1 і VL CDR2; VH CDR1, VL CDR1 і VL CDR3; VH CDR2, VL CDR1 і VL CDR2; VH CDR2, VL CDR1 і VL CDR3; VH CDR3, VL CDR1 і VL CDR2; VH CDR3, VL CDR1 і VL CDR3; VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3 і VL CDR1; VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3 і VL CDR2; VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3 і VL CDR3; VH CDR1, VH CDR2, VL CDR1 і VL CDR2; VH CDR1, VH CDR2, VL CDR1 і VL CDR3; VH CDR1, VH CDR3, VL CDR1 і VL CDR2; VH CDR1, VH CDR3, VL CDR1 і VL CDR3; VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1 і VL CDR2; VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1 і VL CDR3; VH CDR2, VH CDR3, VL CDR2 і VL CDR3; VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1 і VL CDR2; VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1 і VL CDR3; VH CDR1, VH CDR2, VL CDR1, VL CDR2 і VL CDR3; VH CDR1, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 і VL CDR3; VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 і VL CDR3; або в будь-якій із вказаних тут комбінацій VH CDR і VL CDR.

Антитіла для продукування зв'язувальних доменів, необхідних для включення в діатіла відповідно до винаходу, можуть бути також охарактеризовані шляхом картування епітопів, з метою відбору антитіл, що мають більш високу специфічність до FcγRIIB у порівнянні з FcγRIIA. Методи картування епітопів для антитіл добре відомі фахівцям і включені в способи відповідно до винаходу. У деяких варіантах винаходу злиті білки, що містять одну або більше ділянок FcγRIIB, можуть бути використані з метою картування епітопа для антитіла відповідно до винаходу. У конкретному варіанті винаходу злитий білок містить амінокислотну послідовність ділянки FcγRIIB, зв'язану з Fc-частиною людського IgG2. Кожен злитий білок може також мати амінокислотні модифікації і/або заміни деяких ділянок рецептора відповідною ділянкою рецептора-гомолога, наприклад, FcγRIIA, як вказано нижче в таблиці 2. Плазміди pMGX125 і pMGX132 містять сайт зв'язування IgG з рецептором FcγRIIB, де перша плазміда має С-кінець FcγRIIB, а остання плазміда має С-кінець FcγRIIA, і вони можуть бути використані для диференціації С-кінцевого зв'язування. Інші плазміди мають заміни FcγRIIA в зв'язувальному сайті IgG і в N-кінців FcγRIIA або FcγRIIB. Ці молекули дозволяють визначити частина молекули рецепторів, з яким зв'язуються антитіла.

Таблиця 2

Список гібридних білків, які можуть бути використані в дослідженні епітопу для моноклональних анти-FcγRIIB антитіл. Залишки 172-180 належать сайту зв'язування IgG з FcγRIIA і B. Специфічні амінокислоти послідовності FcγRIIA показані жирним шрифтом

Плазміда	Рецептор	N-кінець	172-180	SEQ ID NO:	C-кінець
pMGX125	RIIb	IIb	KKFSRSDPN	43	APS-------SS (IIb)
pMGX126	RIIa/b	IIa	**Q**KFSR**L**DPN	44	APS-------SS (IIb)
pMGX127		IIa	**Q**KFSR**L**DP**T**	45	APS------SS (IIb)
pMGX128		IIb	KKFSR**L**DP**T**	46	APS------SS (IIb)
pMGX129		IIa	**Q**KFS**H**L**D**P**T**	47	APS------SS (IIb)
pMGX130		IIb	KKFS**H**L**D**P**T**	48	APS------SS (IIb)
pMGX131		IIa	**Q**KFSR**L**DPN	49	VPSMGSSS(IIa)
pMGX132		IIb	KKFSRSDPN	50	VPSMGSSS(IIa)
pMGX133	RIIa-131R	IIa	**Q**KFSR**L**DP**T**	51	VPSMGSSS(IIa)
pMGX134	RIIa-131H	IIa	**Q**KFS**H**L**D**P**T**	52	VPSMGSSS(IIa)
pMGX135		IIb	KKFSR**L**DP**T**	53	VPSMGSSS(IIa)
pMGX136		IIb	KKFS**H**L**D**P**T**	54	VPSMGSSS(IIa)

Примітка: APSSS являє собою SEQ ID NO:309; VPSMGSSS являє собою SEQ ID NO:310

Злиті білки можуть бути використані в будь-якому біохімічному аналізі на визначення зв'язування з анти-FcγRIIB антитілом відповідно до винаходу, наприклад, у ELISA-аналізі. В інших варіантах винаходу додаткове підтвердження специфічності до епітопу може бути здійснене з використанням пептидів, у яких специфічні залишки замінені залишками, які походять від послідовності FcγRIIA.

Антитіла можуть бути охарактеризовані за допомогою аналізів на ідентифікацію функції антитіл відповідно до винаходу, зокрема, активності модуляції передачі FcγRIIB-сигналу. Так, наприклад, аналізи по характеризації відповідно до винаходу дозволяють визначити рівень фосфорилування тирозинових залишків у мотиві ITIM FcγRIIB, або рівень інгібування мобілізації кальцію, що генерується B-клітинним рецептором. Аналізи по характеризації відповідно до винаходу можуть являти собою аналізи, проведені в присутності або під час відсутності клітин.

Фахівцями було чітко встановлено, що в тучних клітинах коагрегація FcγRIIB з високоафінним рецептором IgE, FcεRI, приводить до інгібування індукованого антигеном дегрануляції, мобілізації кальцію і продукування цитокінів (Metcalfe D.D. et al. (1997) "Mast Cells" Physiol. Rev. 77:1033-1079; Long E.O. (1999) "Regulation of Immune Responses Through Inhibitory Receptors" Annu. Rev. Immunol. 17:875-904). Нещодавно був точно виявлений молекулярний механізм шляху передачі такого сигналу (Ott V. L. (2002) "Downstream Of Kinase, p62(dok), Is A Mediator Of Fcgammall Inhibition Of Fc Epsilon RI Signaling" J. Immunol. 162(9):4430-4439). Після коагрегації з FcεRI, FcγRIIB швидко фосфорилується в тирозині свого мотиву ITIM, після чого відбувається рекрутинг гомолога-2 Src, що містить інозіт-5-фосфатазу (SHIP), домену SH2, що містить інозитполіфосфат-5-фосфатазу, що, у свою чергу, фосфорилується і зв'язується з Shc і $p62^{dok}$ ($p62^{dok}$ являє собою прототип сімейства молекул-адаптерів, що включають домени передачі сигналу, такі як домен аміно-кінцевого гомолога плекстрину (домен PH), домен PTB і карбокси-кінцева ділянка, що містить мотиви PXXP, і множину сайтів фосфорилування) (Carpino et al. (1997) "p62(dok): A Constitutively Tyrosine-Phosphorylated, GAP-Associated Protein In Chronic Myelogenous Leukemia Progenitor Cells" Cell, 88:197-204; Yamanshi et al. (1997) "Identification Of The Abl-And rasGAP-Associated 62 kDa Protein As A Docking Protein, Dok" Cell, 88:205-211).

Анти-FcγRIIB антитіла, використовувані в даному винаході, аналогічним чином можуть бути охарактеризовані на їхню здатність модулювати один або більше IgE-опосередковуваних відповідей. Переважно, клітинні лінії, коекспресуючі високоафінний рецептор для IgE і низькоафінний рецептор для FcγRIIB, можуть бути використані з метою характеризації анти-FcγRIIB антитіл на їхню здатність модулювати IgE-опосередковувані відповіді. У конкретному варіанті винаходу можуть бути використані клітини, які походять від клітинної лінії щурячого

базофільного лейкозу (RBL-H23; див. публікацію Barsumian E.L. et al. (1981) "IgE-Induced Histamine Release From Rat Basophilic Leukemia Cell Lines: Isolation Of Releasing And Nonreleasing Clones" Eur. J. Immunol. 11:317-323, що у всій своїй повноті вводиться в даний опис за допомогою посилання), трансфікованою повнорозмірним людським FcγRIIB. RBL-2H3 являє собою добре охарактеризовану щурячу клітинну лінію, що широко застосовується для вивчення механізмів передачі сигналу після IgE-опосередковуваної активації клітин. При експресії в клітинах RBL-2H3 і при коагрегації з FcεRI, FcγRIIB інгібує FcεRI-індуковану мобілізацію кальцію, дегрануляцію і продукування цитокінів (Malbec et al. (1998) "Fc Epsilon Receptor I-Associated Lyn-Dependent Phosphorylation Of Fc Gamma Receptor IIB During Negative Regulation Of Mast Cell Activation" J. Immunol. 160:1647-1658; Daeron et al. (1995) "Regulation Of High-Affinity IgE Receptor-Mediated Mast Cell Activation By Murine Low-Affinity IgG Receptors" J. Clin. Invest. 95:577; Ott V. L. (2002) "Downstream Of Kinase, p62(dok), Is A Mediator Of FcgammaIIB Inhibition Of Fc Epsilon RI Signaling" J. Immunol. 162(9):4430-4439).

Антитіла, використовувані в даному винаході, можуть бути також охарактеризовані на їхню здатність інгібувати FcεRI-індуковану активацію тучних клітин. Так, наприклад, клітини, які походять від клітинної лінії щурячого базофільного лейкозу (RBL-H23; Barsumian E.L. et al. (1981) "IgE-Induced Histamine Release From Rat Basophilic Leukemia Cell Lines: Isolation Of Releasing And Nonreleasing Clones" Eur. J. Immunol. 11:317-323), які були трансфіковані FcγRIIB, сенсибілізували IgE і стимулювали або $F(ab')_2$-фрагментами кролячого антитіла проти мишачих IgG, для агрегації тільки FcεRI, або повнорозмірним кролячим антитілом проти мишачих IgG, для коагрегації FcγRIIB і FcεRI. У цій системі непряма модуляція молекул передачі сигналу наступних стадій каскаду реакцій може бути проаналізована після додавання антитіл відповідно до винаходу до сенсибілізованих і стимульованих клітин. Так, наприклад, можуть бути проаналізовані фосфорилування по тирозині FcγRIIB і рекрутинг і фосфорилування SHIP, активація членів сімейства кіназ MAP, включаючи, але не обмежуючись ними, Erk1, Erk2, JNK або p38; і фосфорилування по тирозині $p62^{dok}$ і його зв'язування з SHIP і RasGAP.

Один з репрезентативних аналізів по визначенню інгібування FcεRI-індукованої активації тучних клітин під дією антитіл відповідно до винаходу може включати: трансфекцію клітин RBL-H23 людським FcγRIIB, IgE- сенсибілізацію клітин RBL-H23, стимуляцію клітин RBL-H23 $F(ab')_2$-фрагментами кролячого антитіла проти мишачих IgG (для агрегації тільки FcεRI і виявлення FcεRI-опосередковуваної передачі сигналу як контролю) або стимуляцію клітин RBL-H23 повнорозмірним кролячим антитілом проти мишачих IgG (для коагрегації FcγRIIB і FcεRI, що приводить до інгібування FcεRI-опосередковуваної передачі сигналу). Клітини, стимульовані повнорозмірними кролячими антитілами проти мишачих IgG можуть бути також попередньо інкубовані з антитілами відповідно до винаходу. Вимірювання FcεRI-залежної активності клітин, які були попередньо інкубовані з антитілами відповідно до винаходу, і клітин, які не були попередньо інкубовані з антитілами відповідно до винаходу, і порівняння рівнів FcεRI-залежної активності цих клітин указувало на модуляцію FcεRI-залежної активності під дією антитіл відповідно до винаходу.

Вищеописаний репрезентативний аналіз може бути проведений, наприклад, для ідентифікації антитіл, що блокують зв'язування ліганду (IgG) з рецептором FcγRIIB і служать антагоністами FcγRIIB-опосередковуваного інгібування передачі FcεRI-сигналу за допомогою запобігання коагрегації FcγRIIB і FcεRI. Аналогічним чином, цей аналіз дозволяє ідентифікувати антитіла, що підсилюють коагрегацію FcγRIIA і FcεRI і служать агоністами FcγRIIB-опосередковуваного інгібування передачі FcεRI-сигналу за допомогою стимуляції коагрегації FcγRIIB і FcεRI.

У деяких варіантах винаходу анти-FcγRIIB діатіла, що містять епітоп-зв'язувальні домени ідентифікованих, описаних тут або відомих анти-FcγRIIB антитіл відповідно до винаходу, були охарактеризовані на їхню здатність модулювати IgE-опосередковувану відповідь шляхом моніторингу і/або оцінки дегрануляції тучних клітин або базофілів переважно в клітинному аналізі. При цьому переважно, щоб гладкі клітини або базофіли, використовувані в таких аналізах, були сконструйовані так, щоб вони містили людський FcγRIIB, із застосуванням стандартних рекомбінантних методів, відомих фахівцям. У конкретному варіанті винаходу анти-FcγRIIB антитіла відповідно до винаходу характеризували на їхню здатність модулювати IgE-опосередковувану відповідь у клітинному аналізі на вивільнення β-гексозамінідази (ферменту, що міститься в гранулах). Вивільнення β-гексозамінідази з тучних клітин і базофілів є першою подією при гострому алергійному і запальному стані (Aketani et al. (2001) "Correlation Between Cytosolic Calcium Concentration And Degranulation In RBL-2H3 Cells In The Presence Of Various Concentrations Of Antigen-Specific IgEs" Immunol. Lett. 75:185-189; Aketani et al. (2000) "A Screening Method For Antigen-Specific IgE Using Mast Cells Based On Intracellular Calcium

Signaling" Anal. Chem. 72:2653-2658). Вивільнення інших медіаторів запалення, включаючи, але не обмежуючись ними, серотонін і гістамін, може бути проаналізоване для оцінки IgE-опосередковуваної відповіді способами відповідно до винаходу. Не обмежуючи яким-небудь конкретним механізмом дії, слід зазначити, що вивільнення гранул, таких як гранули, що містять β-гексозамінідази тучних клітин і базофілів, являє собою внутрішньоклітинний процес, що залежить від концентрації кальцію, де вказаний процес ініціюється перехресним зв'язуванням FcγRI з полівалентним антигеном.

Можливість дослідження людських тучних клітин обмежується відсутністю придатних довгоіснуючих культур людських тучних клітин. Нещодавно, з аспіратів кісткового мозку пацієнта із саркомою/лейкозом тучних клітин було виділено дві нові лінії людських тучних клітин, ріст яких залежить від фактора стовбурових клітин, і ці клітини були позначені LAD1 і LAD2 (див. публікацію Kirshenbaum et al. (2003) "Characterization Of Novel Stem Cell Factor Responsive Human Mast Cell Lines LAD I And 2 Established From A Patient With Mast Cell Sarcoma/Leukemia; Activation Following Aggregation Of FcRI Or FcγRI" Leukemia research, 27:677-82, що у всій своїй повноті вводиться в даний опис за допомогою посилання). Були описані обидві клітинні лінії, які експресують FcεRI і декілька маркерів людських тучних клітин. Клітини LAD 1 і 2 можуть бути використані для оцінки впливу антитіл відповідно до винаходу на IgE-опосередковувані відповіді. У конкретному варіанті винаходу клітинні аналізи на вивільнення β-гексозамінідази, описані вище, можуть бути проведені для клітин LAD з метою визначення будь-якої модуляції IgE-опосередковуваної відповіді під дією анти-FcγRIIB антитіл відповідно до винаходу. У репрезентативному аналізі людські гладкі клітини, наприклад, LAD1, примували химерним антитілом проти людського IgE - антитілом проти нітрофенолу (NP), і стимулювали BSA-NP, тобто полівалентним антигеном, а потім проводили моніторинг дегрануляції клітин шляхом виміру рівня вивільнення β-гексозамінідази в супернатант (див. публікацію Kirshenbaum et al. (2003) "Characterization Of Novel Stem Cell Factor Responsive Human Mast Cell Lines LAD I And 2 Established From A Patient With Mast Cell Sarcoma/Leukemia; Activation Following Aggregation Of FcRI Or FcγRI" Leukemia research, 27:677-82, що у всій своїй повноті вводиться в даний опис за допомогою посилання).

У деяких варіантах винаходу, якщо в людських тучних клітинах спостерігається низький рівень експресії ендогенного FcγRIIB, як може бути визначено із застосуванням стандартних методів, відомих фахівцям, наприклад, FACS-фарбування, то в цьому випадку досить важко провести моніторинг і/або детектувати розходження в активації шляхів інгібування, опосередковуваних анти-FcγRIIB діатілами відповідно до винаходу. Даний винахід також охоплює альтернативні методи, у яких експресія FcγRIIB може бути посилена з використанням цитокінів і в конкретних умовах культивування. Було продемонстровано, що FcγRIIB у високому ступені активується в людських моноцитарних клітинних лініях, наприклад, THP1 і U937 (Tridandapani et al. (2002) "Regulated Expression And Inhibitory Function Of Fcgamma RUB In Human Monocytic Cells" J. Biol. Chem., 277(7):5082-5089), і в первинних людських моноцитах (Pricop et al. (2001) "Differential Modulation Of Stimulatory And Inhibitory Fc Gamma Receptors On Human Monocytes By Thl And Th2 Cytokines" J. of Immunol., 166:531-537) під дією IL4. Було продемонстровано, що диференціювання клітин U937 під дією циклічного дибутирил-AMP приводить до підвищення рівня експресії FcγRII (Cameron et al. (2002) "Differentiation Of The Human Monocyte Cell Line, U937, With Dibutyryl CyclicAMP Induces The Expression Of The Inhibitory Fc Receptor, FcgammaRIIB" Immunology Letters 83, 171-179). Таким чином, експресія ендогенного FcγRIIB у людських тучних клітинах, використовуваних у способах відповідно до винаходу, може бути посилена з використанням цитокінів, наприклад, IL-4, IL-13, з метою підвищення чутливості детектування.

Анти-FcγRIIB діатіла можуть бути також проаналізовані на інгібування передачі сигналу, опосередковуваної B-клітинним рецептором (BCR). BCR-опосередковувана передача сигналу може включати щонайменше одну або більше біологічних відповідей, які продукуються на більш пізніх стадіях каскаду реакцій, таких як активація і проліферація B-клітин, продукування антитіл і т. п. Коагрегація FcγRIIB і BCR приводить до інгібування проходження клітинного циклу і виживаності клітин. Крім того, коагрегація FcγRIIB і BCR приводить до інгібування BCR-опосередковуваної передачі сигналу.

Зокрема, BCR-опосередковувана передача сигналу включає щонайменше один або більше процесів, а саме, модуляцію молекул передачі сигналу, які продукуються на більш пізніх стадіях каскаду реакцій (наприклад, фосфорилування FcγRIIB, рекрутинг SHIP, локалізацію Btk і/або PLCγ, активність кінази MAP, рекрутинг Akt (антиапоптотичний сигнал), мобілізацію кальцію, проходження клітинного циклу і проліферацію клітин).

Хоча відомо, що багато які ефекторні функції FcγRIIB-опосередковуваного інгібування передачі BCR-сигналу опосередковуються SHIP, однак, нещодавно було продемонстровано, що активовані ліпополісахаридом (ЛПС) B-клітини SHIP-дефіцитних мишей мають значну FcγRIIB-опосередковувану інгібуючу дію, спрямовану на мобілізацію кальцію, продукування Ins(1,4,5)P_3 і фосфорилування Erk і Akt (Brauweiler et al. (2001) "Partially Distinct Molecular Mechanisms Mediate Inhibitory FcgammaRIIB Signaling In Resting And Activated B Cells" Journal of Immunology, 167(1):204-211). Відповідно до цього B-клітини SHIP-дефіцитних мишей ex vivo можуть бути використані для характеризації антитіл відповідно до винаходу. Один з репрезентативних аналізів, проведених для оцінки FcγRIIB-опосередковуваного інгібування передачі BCR-сигналу антитілами відповідно до винаходу, може включати наступні стадії: виділення B-клітин селезінки в SHIP-дефіцитних мишей, активація вказаних клітин ліпополісахаридом і стимуляція вказаних клітин F(ab')$_2$-фрагментом анти-IgM антитіла для агрегації BCR або анти-IgM антитілом для коагрегації BCR з FcγRIIB. Клітини, які були стимульовані інтактним анти-IgM антитілом для коагрегації BCR з FcγRIIB, можуть бути також попередньо інкубовані з антитілами відповідно до винаходу. FcγRIIB-залежна активність клітин може бути визначена стандартними методами, відомими фахівцям. Порівняння рівня FcγRIIB-залежної активності в клітинах, які були попередньо інкубовані з антитілами, і в клітинах, які не були попередньо інкубовані з антитілами, буде вказувати на модуляцію FcγRIIB-залежної активності під дією вказаних антитіл.

Аналіз на FcγRIIB-залежну активність може включати, наприклад, визначення рівня мобілізації внутрішньоклітинного кальцію за допомогою протокової цитометрії, вимірювання рівня фосфорилування Akt і/або Erk, оцінку BCR-опосередковуваної акумуляції PI(3,4,5)P_3 або оцінку FcγRIIB-опосередковуваної проліферації B-клітин.

Ці аналізи можуть бути проведені, наприклад, з метою ідентифікації діатіл або анти-FcγRIIB антитіл, використовуваних у даному винаході, які модулюють FcγRIIB-опосередковуване інгібування передачі BCR-сигналу за допомогою блокування сайта зв'язування ліганду (IgG) з рецептором FcγRIIB, і які діють як антагоністи FcγRIIB-опосередковуваного інгібування передачі BCR-сигналу за допомогою попередження коагрегації FcγRIIB і BCR. Ці аналізи можуть бути також проведені з метою ідентифікації антитіл, що підсилюють коагрегацію FcγRIIB і BCR, і які є агоністами FcγRIIB-опосередковуваного інгібування передачі BCR-сигналу.

Анти-FcγRIIB антитіла можуть бути також проаналізовані на FcγRII-опосередковувану передачу сигналу в людських моноцитах/макрофагах. Коагрегація FcγRIIB з рецептором, що несе мотив активації імунорецептора на основі тирозину (ITAM), чинить інгібуючу дію на FcγR-опосередковуваний фагоцитоз у присутності SHIP як ефектора такого фагоцитозу (Tridandapani et al. (2002) "Regulated Expression And Inhibitory Function Of Fcgamma RUB In Human Monocytic Cells" J. Biol. Chem., 277(7):5082-5089). Коагрегація FcγRIIA з FcγRIIB приводить до швидкого фосфорилування тирозинового залишку на мотиві ITIM FcγRIIB, що сприяє підвищенню рівня фосфорилування SHIP, зв'язування SHIP з Shc і фосфорилування білків, що мають молекулярну масу 120 і 60-65 кДа. Крім того, коагрегація FcγRIIA з FcγRIIB приводить до інгібування фосфорилування Akt, що являє собою серин-треонін-кіназу, яка бере участь у клітинній регуляції й у інгібуванні апоптозу.

Анти-FcγRIIB діатіла можуть бути також проаналізовані на інгібування FcγR-опосередковуваного фагоцитозу в людських моноцитах/макрофагах. Так, наприклад, клітини, які походять від людської моноцитарної клітинної лінії, THP-1, можуть бути стимульовані Fab-фрагментами мишачого моноклонального антитіла IV.3 проти FcγRII і козячого антимишачого антитіла (для агрегації тільки FcγRIIA), або повнорозмірним мишачим моноклональним антитілом IV.3 і козячим антимишачим антитілом (для коагрегації FcγRIIA і FcγRIIB). У цій системі модуляція молекул наступних стадій передачі сигналу, така як фосфорилування тирозину FcγRIIB, фосфорилування SHIP, зв'язування SHIP з Shc, фосфорилування Akt і фосфорилування білків, що мають молекулярну масу 120 і 60-65 кДа, може бути проаналізована після додавання молекул відповідно до винаходу до стимульованих клітин. Крім того, ефективність FcγRIIB-залежного фагоцитозу моноцитарної клітинної лінії може бути безпосередньо оцінена в присутності і під час відсутності антитіл відповідно до винаходу.

Інший репрезентативний аналіз, який проводиться з метою визначення ступеня інгібування FcγR-опосередковуваного фагоцитозу в у людських моноцитах/макрофагах під дією антитіл відповідно до винаходу, може включати: стимуляцію клітин THP-1 Fab-фрагментом мишачого анти-FcγRII антитіла IV.3 і козячого антимишачого антитіла (для агрегації тільки FcγRIIA і виробляння FcγRIIB-опосередковуваної передачі сигналу) або мишачим анти-FcγRII антитілом і козячим антимишачим антитілом (для коагрегації FcγRIIA і FcγRIIB і інгібування FcγRIIa-опосередковує передачі сигналу). Клітини, стимульовані повнорозмірними мишачим анти-FcγRII

антитілом і козячим антимишачим антитілом, можуть бути також попередньо інкубовані з молекулами відповідно до винаходу. Вимірювання FcγRIIA-залежної активності стимульованих клітин, які були попередньо інкубовані з молекулами відповідно до винаходу, і клітин, які не були попередньо інкубовані з антитілами відповідно до винаходу, і порівняння рівнів FcγRIIA-залежної активності цих клітин указувало на модуляцію FcγRIIA-залежної активності під дією антитіл відповідно до винаходу.

Вищеописаний репрезентативний аналіз може бути проведений, наприклад, для ідентифікації зв'язувальних доменів, що блокують зв'язування ліганду з рецептором FcγRIIB і служать антагоністами FcγRIIB-опосередковуваного інгібування передачі FcγRIIA-сигнала за допомогою запобігання коагрегації FcγRIIB і FcγRIIA. Аналогічним чином, цей аналіз дозволяє ідентифікувати зв'язувальні домени, що підсилюють коагрегацію FcγRIIB і FcγRIIA і служать агоністами FcγRIIB-опосередковуваного інгібування передачі FcγRIIA-сигналу.

FcγRIIB-зв'язувальні домени, які представляють інтерес, можуть бути проаналізовані для того, щоб визначити, чи містять клітини THP-1 антитіла, і такий аналіз може бути проведений шляхом оцінки здатності клітин THP-1 до фагоцитозу IgG-опсонізованих овечих еритроцитів (SRBC), оброблених флуоресцеїном, методами, описаними раніше (Tridandapani et al. (2000) "The Adapter Protein LAT Enhances Fcgamma Receptor-Mediated Signal Transduction In Myeloid Cells" J. Biol. Chem. 275:20480-7). Так, наприклад, репрезентативний аналіз для оцінки фагоцитозу включає: обробку клітин THP-1 антитілами відповідно до винаходу або контрольним антитілом, що не зв'язується з FcγRII; порівняння рівнів активності вказаних клітин, де розходження в активностях клітин (наприклад, активності розеткоутворення (числа клітин THP-1, що зв'язуються з IgG-покритими SRBC), в адгезивній активності (загального числа SRBC, зв'язаних із клітинами THP-1) і швидкості фагоцитозу) повинне вказувати на модуляцію FcγRIIB-залежної активності під дією антитіл відповідно до винаходу. Цей аналіз може бути проведений для ідентифікації, наприклад, антитіл, що блокують зв'язування ліганду з рецептором FcγRIIB і які є антагоністами FcγRIIB-опосередковуваного інгібування фагоцитозу. Цей аналіз також дозволяє ідентифікувати антитіла, що підсилюють FcγRIIB-опосередковуване інгібування передачі FcγRIIA-сигналу.

У переважному варіанті винаходу зв'язувальні домени модулюють FcγRIIB-залежну активність у людських моноцитах/макрофагах щонайменше по одному або більше шляхах: модуляції молекул наступних стадій передачі сигналу (наприклад, модуляції фосфорилування FcγRIIB, модуляції фосфорилування SHIP, модуляції зв'язування SHIP з Shc, модуляції фосфорилування Akt, модуляції фосфорилування додаткових білків, що мають молекулярну масу приблизно 120 і 60-65 кДа) і модуляції фагоцитозу.

5.1.2. CD16A-зв'язувальні домени

У нижченаведеному розділі обговорюються CD16A-зв'язувальні білки, які можуть бути використані як джерела варіабельних ділянок легкого і важкого ланцюгів для продукування ковалентно зв'язаного діатіла. Відповідно до даного винаходу CD16A-зв'язувальні білки включають молекули, що містять VL- і VH-домени анти-CD16A антитіл, де вказані VH- і VL-домени використовуються для одержання діатіл відповідно до винаходу.

Відповідно до даного винаходу можуть бути використані різні CD16A-зв'язувальні білки. Придатними CD16A-зв'язувальними білками є людські або гуманізовані моноклональні антитіла, а також CD16A-зв'язувальні фрагменти антитіл (наприклад, scFv або одноланцюжкові антитіла, Fab-фрагменти, міні антитіла) і інші антитіло-подібні білки, які зв'язуються з CD16A за допомогою взаємодії з доменом варіабельної ділянки легкого ланцюга, доменом варіабельної ділянки важкого ланцюга або з обома доменами.

У деяких варіантах винаходу CD16A-зв'язувальний білок, використовуваний відповідно до даного винаходу, включає VL- і/або VH-домен, що має одну або більше CDR з послідовностями, які походять від нелюдського анти-CD16A антитіла, такого як мишаче анти-CD16A антитіло, і одну або більше каркасних ділянок, які походять від каркасних послідовностей одного або більше людських імуноглобулінів. Різні нелюдські моноклональні анти-CD16A антитіла, від яких можуть бути отримані CDR і інші послідовності, відомі фахівцям (див., наприклад, Tamm et al. (1996) "The Binding Epitopes Of Human CD 16 (Fc gamma Rill) Monoclonal Antibodies. Implications For Ligand Binding" J. Imm. 157:1576-81; Fleit et al. (1989) p.159; LEUKOCYTE TYPING II: HUMAN MYELOID AND HEMATOPOIETIC CELLS, Reinherz et al., eds. New York: Springer-Verlag; (1986); LEUCOCYTE TYPING III: WHITE CELL DIFFERENTIATION ANTIGENS McMichael A J, ed., Oxford: Oxford University Press, 1986); LEUKOCYTE TYPING IV: WHITE CELL DIFFERENTIATION ANTIGENS, Kapp et al., eds. Oxford Univ. Press, Oxford; LEUKOCYTE TYPING V: WHITE CELL DIFFERENTIATION ANTIGENS, Schlossman et al., eds. Oxford Univ. Press, Oxford; LEUKOCYTE TYPING VI: WHITE CELL DIFFERENTIATION ANTIGENS, Kishimoto, ed. Taylor & Francis). Крім

того, як показано в Прикладах, нові CD16A-зв'язувальні білки, що розпізнають людський CD16A, який експресується на клітинах, можуть бути отримані добре відомими методами продукування і відбору моноклональних антитіл або споріднених зв'язувальних білків (наприклад, за допомогою гібридомної технології, фагового представлення і т. п.). Див., наприклад, публікації O'Connell et al. (2002) "Phage Versus Phagemid Libraries For Generation Of Human Monoclonal Antibodies" J. Mol. Biol. 321:49-56; Hoogenboom et al. (2000) "Natural And Designer Binding Sites Made By Phage Display Technology" Imm. Today 21:371078; Krebs et al. (2001) "High-Throughput Generation And Engineering Of Recombinant Human Antibodies" J. Imm. Methods 254:67-84; і інші цитовані там роботи. Моноклональні антитіла, які походять від видів, що не є людиною, можуть бути отримані у вигляді химерних або гуманізованих антитіл із застосуванням методів гуманізації антитіл, відомих фахівцям.

Альтернативно, повністю людські антитіла проти CD16A можуть бути отримані з використанням трансгенних тварин, які мають елементи людської імунної системи (див., наприклад, патенти США №№ 5569825 і 5545806), з використанням людських клітин периферичної крові (Casali et al. (1986) "Human Monoclonals From Antigen-Specific Selection Of B Lymphocytes And Transformation By EBV" Science 234:476-479), шляхом скринінгу бібліотеки ДНК із людських В-клітин відповідно до загального протоколу, описаним Huse et al. (1989) "Generation Of A Large Combinatorial Library Of The Immunoglobulin Repertoire In Phage Lambda" Science 246:1275-1281, і іншими методами.

У переважному варіанті винаходу зв'язувальним донором є донор, який походить від антитіла 3G8 або його гуманізованого варіанта, наприклад, описаних у публікації заявки на патент США 2004/0010124, що у всій своїй повноті вводиться в даний опис за допомогою посилання. При цьому передбачається, що для деяких цілей може виявитися переважним використання CD16A-зв'язувальних білків, що зв'язуються з рецептором CD16A на тому ж самому епітопі, що зв'язується з 3G8, або щонайменше на ділянці, близькій до цього епітопу, але достатньому для блокування зв'язування з 3G8. Методи картування епітопів і експерименти по конкурентному зв'язуванню, застосовувані для ідентифікації зв'язувальних білків з потрібними зв'язувальними властивостями, добре відомі фахівцям в галузі експериментальної імунології. Див., наприклад, роботу Harlow & Lane, цитовану вище; Stahli et al. (1983) "Distinction Of Epitopes By Monoclonal Antibodies" Methods in Enzymology 92:242-253; Kirkland et al. (1986) "Analysis Of The Fine Specificity And Cross-Reactivity Of Monoclonal Anti-Lipid A Antibodies" J. Immunol. 137:3614-3619; Morel et al. (1988) "Monoclonal Antibodies To Bovine Serum Albumin: Affinity And Specificity Determinations" Molec. Immunol. 25:7-15; Cheung et al. (1990) "Epitope-Specific Antibody Response To The Surface Antigen Of Duck Hepatitis B Virus In Infected Ducks" Virology 176:546-552; і Moldenhauer et al. (1990) "Identity Of HML-1 Antigen On Intestinal Intraepithelial T Cells And Of B-ly7 Antigen On Hairy Cell Leukaemia" Scand. J. Immunol. 32:77-82. Так, наприклад, можна визначити, чи зв'язуються два антитіла з тим самим сайтом під дією одного з антитіл, іммобілізованих з антигеном на ELISA-планшеті, а потім можна оцінити здатність до зв'язування другого антитіла з іммобілізованим антигеном. Порівняння епітопів може бути також здійснене шляхом прямого або опосередкованого мічення "першого" антитіла ферментом, або радіонуклідом флуорофором, а потім може бути оцінена здатність неміченого "другого" антитіла інгібувати зв'язування "першого" антитіла з антигеном на клітинах, у розчині або на твердій фазі.

Може бути також визначена здатність антитіл блокувати зв'язування рецептора CD16A з імунними комплексами, які утворюються на ELISA-планшетах. Такі імунні комплекси одержують спочатку шляхом покриття планшета антигеном, таким як флуоресцеїн, а потім шляхом нанесення на цей планшет специфічного антитіла проти флуоресцеїну. Цей імунний комплекс служить як ліганд для розчинних Fc-рецепторів, таких як sFcRIIIa. Альтернативно, отриманий розчинний імунний комплекс може бути прямо або опосередковано позначений ферментом, радіонуклідом або флуорофором. Потім може бути оцінена здатність антитіл інгібувати зв'язування цих мічених імунних комплексів з Fc-рецепторами на клітинах, у розчині або на твердій фазі.

CD16A-зв'язувальні білки відповідно до винаходу можуть містити, а можуть і не містити, Fc-ділянку людського імуноглобуліну. Fc-ділянки відсутні, наприклад, у scFv-зв'язувальних білках. Fc-ділянки присутні, наприклад, у людських або гуманізованих тетрамерних моноклональних антитілах IgG. Як описано вище, у деяких варіантах винаходу CD16A-зв'язувальний білок включає Fc-ділянку, що має змінену ефекторну функцію, наприклад, знижену афінність відносно ефекторного ліганду, такого як Fc-рецептор або компонент комплементу C1, у порівнянні з функцією немодифікованої Fc-ділянки (наприклад, Fc природних білків IgG1). В одному з

варіантів винаходу Fc-ділянка не є глікозилованою у положенні амінокислоти, що відповідає положенню 297. Такі антитіла не мають ефекторної Fc-функції.

Таким чином, CD16A-зв'язувальний білок може не мати здатність до Fc-опосередковуваного зв'язування з ефекторним лігандом, таким як Fc-рецептор або компонент комплементу C1, що обумовлено відсутністю Fc-домену в зв'язувальному білку, а в інших випадках відсутність зв'язувальної або ефекторної функції обумовлено модифікацією в константній ділянці антитіла.

5.1.2.1. CD16A-зв'язувальні білки, що містять послідовності CDR, аналогічні послідовностям CDR mAb 3G8

CD16A-зв'язувальними білками, які можуть бути використані для здійснення даного винаходу, є білки, які містять послідовність CDR, яка походить (тобто, що має таку ж або аналогічну послідовність) від CDR мишачого моноклонального антитіла 3G8. Комплементарні кДНК, які кодують варіабельні ділянки важкого ланцюга і легкого ланцюга мишачого моноклонального антитіла 3G8, що включає CDR-кодуючі послідовності, клонували і секвенували, як описано в даній заявці. Послідовності нуклеїнової кислоти і білка 3G8 представлені нижче. З використанням послідовностей мишачої варіабельної ділянки і CDR було отримано велике число химерних і гуманізованих моноклональних антитіл, що містять гіперваріабельні ділянки, які походять від CDR 3G8, і були проаналізовані їхній властивості. Для ідентифікації гуманізованих антитіл, що зв'язуються з CD16A з високою афінністю й мають інші потрібні властивості, були отримані важкі ланцюги антитіл, що містять VH- ділянку з CDR, які походять від 3G8, і ці важкі ланцюги були об'єднані (за допомогою коекспресії) з легкими ланцюгами антитіл, що містять VL- ділянку з CDR, які походять від 3G8, у результаті чого було отримано тетрамерне антитіло для аналізу. Властивості отриманих тетрамерних антитіл були визначені, як описано нижче. Як описано нижче, CD16A-зв'язувальні білки, що містять CDR 3G8, такі як білки описаних тут гуманізованих антитіл, можуть бути використані відповідно до даного винаходу.

5.1.2.1.1. VH-ділянка

В одному з аспектів винаходу CD16A-зв'язувальний білок відповідно до винаходу може містити варіабельний домен важкого ланцюга, у якому щонайменше одна CDR (а звичайно три CDR) має послідовність CDR (а найчастіше всі три CDR) важкі ланцюги мишачого моноклонального антитіла 3G8, а інші частини зв'язувального білка є в основному людськими (тобто, походять від варіабельної ділянки важкого ланцюга людського антитіла або людських антитіл і, в основному, аналогічні такій ділянці).

В одному зі своїх аспектів даний винахід стосується гуманізованого антитіла 3G8 або його фрагмента, що містить CDR, які походять від антитіла 3G8, в основному в людській каркасній ділянки, але в якій щонайменше одна CDR варіабельного домену важкого ланцюга має послідовність, що відрізняється від відповідної послідовності CDR важкого ланцюга мишачого антитіла 3G8. Так, наприклад, в одному з варіантів винаходу CDR відрізняється(ються) від послідовності 3G8 CDR щонайменше тим, що вона (вони) має(ють) одну або більше замін CDR, що, як відомо, впливають на зв'язування 3G8 з CD16A, як відомо фахівцям або як показано в таблицях 3 і 4A-H. Придатні CD16-зв'язувальні білки можуть містити 0, 1, 2, 3, або 4 або більше таких замін (часто від 1 до 4 таких замін), а також вони можуть містити, але необов'язково, додаткові заміни.

Таблиця 3

Заміни в V_H-домені

No.	Положення по Кебату	Область	Заміни
1	2	FR1	Ile
2	5	FR1	Lys
3	10	FR1	Thr
4	30	FR1	Arg
5	34	CDR1	Val
6	50	CDR2	Leu
7	52	CDR2	Phe або Tyr або Asp
8	54	CDR2	Asn
9	60	CDR2	Ser
10	62	CDR2	Ser
11	70	FR3	Thr
12	94	FR3	Gln або Lys або Ala або His
13	99	CDR3	Tyr
14	101	CDR3	Asp

Таблиця 4А

Послідовності V_H, походять від V_H 3G8*

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
3G8VH	A	A	A	A	A	A	A
Ch3G8VH	A	A	A	A	A	A	B
HxC	B	A	B	A	A	A	B
CxH	A	A	A	A	B	A	B
Hu3G8VH-1	B	A	B	A	B	A	B
Hu3G8VH-2	C	A	B	A	B	A	B
Hu3G8VH-3	D	A	B	A	B	A	B
Hu3G8VH-4	B	A	B	A	C	B	B
Hu3G8VH-5	B	A	B	A	C	A	B
Hu3G8VH-6	B	B	B	A	B	B	B
Hu3G8VH-7	B	B	B	A	B	A	B
Hu3G8VH-8	B	A	B	A	B	C	B
Hu3G8VH-9	B	A	B	B	B	B	B
Hu3G8VH-10	B	A	B	A	B	B	B
Hu3G8VH-11	B	A	B	B	B	A	B
Hu3G8VH-12	B	A	B	C	B	A	B
Hu3G8VH-13	B	A	B	D	B	A	B
Hu3G8VH-14	B	A	B	E	B	A	B
Hu3G8VH-15	B	A	B	A	D	A	B
Hu3G8VH-16	B	A	B	A	E	A	B
Hu3G8VH-17	B	A	B	A	F	A	B
Hu3G8VH-18	B	A	B	A	G	A	B
Hu3G8VH-19	B	A	B	A	C	C	B
Hu3G8VH-20	B	B	B	C	B	A	B
Hu3G8VH-21	B	A	B	A	D	B	B
Hu3G8VH-22	B	B	B	C	B	C	B
Hu3G8VH-23	B	B	B	C	E	C	B
Hu3G8VH-24	B	B	B	C	F	C	B
Hu3G8VH-25	B	B	B	C	G	C	B
Hu3G8VH-26	B	B	B	C	C	C	B
Hu3G8VH-27	B	B	B	C	E	D	B
Hu3G8VH-28	B	B	B	C	F	D	B
Hu3G8VH-29	B	B	B	C	G	D	B
Hu3G8VH-30	B	B	B	C	C	D	B
Hu3G8VH-31	E	B	B	C	B	A	B
Hu3G8VH-32	E	B	B	H	B	A	B
Hu3G8VH-33	E	B	B	H	B	A	B
Hu3G8VH-34	E	B	B	C	B	C	B
Hu3G8VH-35	E	B	B	C	C	C	B
Hu3G8VH-36	E	B	B	H	C	D	B
Hu3G8VH-37	E	B	B	H	E	C	B
Hu3G8VH-38	E	B	B	F	B	A	B
Hu3G8VH-39	E	B	B	I	B	A	B
Hu3G8VH-40	E	B	B	G	B	A	B
Hu3G8VH-41	E	B	B	J	B	A	B

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
Hu3G8VH-42	E	B	B	C	H	A	B
Hu3G8VH-43	E	B	B	C	H	C	B
Hu3G8VH-44	E	B	B	C	I	D	B
Hu3G8VH-45	E	B	B	C	J	D	B

* Букви в таблиці 4А позначають послідовності, представлені в таблицях 4 B-H

Таблиця 4B

FR1

A	B	C	D	E		Залишок
Q	Q	Q	Q	Q		1
V	V	V	V	I		2
T	T	T	T	T		3
L	L	L	L	L		4
K	R	K	R	K		5
E	E	E	E	E		6
S	S	S	S	S		7
G	G	G	G	G		8
P	P	P	P	P		9
G	A	A	A	T		10
I	L	L	L	L		11
L	V	V	V	V		12
Q	K	K	K	K		13
P	P	P	P	P		14
S	T	T	T	T		15
Q	Q	Q	Q	Q		16
T	T	T	T	T		17
L	L	L	L	L		18
S	T	T	T	T		19
L	L	L	L	L		20
T	T	T	T	T		21
C	C	C	C	C		22
S	T	T	T	T		23
F	F	F	F	F		24
S	S	S	S	S		25
G	G	G	G	G		26
F	F	F	F	F		27
S	S	S	S	S		28
L	L	L	L	L		29
R	S	S	R	S		30
103	**104**	**105**	**106**	**107**		**SEQ ID NO.**

SEQ ID NO.	Послідовність
103	QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLR
104	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLS
105	QVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLS
106	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLR
107	QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLS

Таблиця 4C

CDR1

A	B		Залишок
T	T		31
S	S		32
G	G		33
M	V		34
G	G		35
V	V		35A
G	G		35B
108	**109**		**SEQ ID NO.**

SEQ ID NO.	Послідовність
108	TSGMGVG
109	TSGVGVG

Таблиця 4D

FR2

A	B		Залишок
W	W		36
I	I		37
R	R		38
Q	Q		39
P	P		40
S	P		41
G	G		42
K	K		43
G	A		44
L	L		45
E	E		46
W	W		47
L	L		48
A	A		49
110	**111**		**SEQ ID NO.**

SEQ ID NO.	Послідовність
110	WIRQPSGKGLEWLA
111	WIRQPPGKALEWLA

Таблиця 4E

CDR2

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	Залишок
H	H	H	H	H	L	H	L	H	L	50
I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	51
W	Y	W	Y	W	D	F	W	D	W	52
W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	53
D	N	D	D	N	D	D	D	D	N	54
D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	55
D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	56
K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	57
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	58
Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	59
N	N	S	N	N	S	S	S	S	S	60
P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	61
A	A	S	A	A	S	S	S	S	S	62
L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	63
K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	64
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	65
112	**113**	**114**	**115**	**116**	**117**	**118**	**119**	**120**	**121**	**SEQ ID NO**

Таблиця 4F

FR3

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	Залишок
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	66
L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	67
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	68
I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	69
S	S	S	S	S	S	S	T	T	T	70
K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	71
D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	72
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	73
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	74

S	K	K	K	K	K	K	K	K	K	75
N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	76
Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	77
V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	78
F	V	V	V	V	V	V	V	V	V	79
L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	80
K	T	T	T	T	T	T	T	T	T	81
I	M	M	M	M	M	M	M	M	M	82
A	T	T	T	T	T	T	T	T	T	82A
S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	82B
V	M	M	M	M	M	M	M	M	M	82C
D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	83
T	P	P	P	P	P	P	P	P	P	84
A	V	V	V	V	V	V	V	V	V	85
D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	86
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	87
A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	88
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	89
Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	90
Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	91
C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	92
A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	93
Q	R	Q	T	K	A	H	R	H	Q	94
122	**123**	**124**	**125**	**126**	**127**	**128**	**129**	**130**	**131**	82 SEQ ID NO.
132	**133**	**134**	**135**	**136**	**137**	**138**	**139**	**140**	**141**	82A SEQ ID NO.
142	**143**	**144**	**145**	**146**	**147**	**148**	**149**	**150**	**151**	82B SEQ ID NO.
152	**153**	**154**	**155**	**156**	**157**	**158**	**159**	**160**	**161**	82C SEQ ID NO.

SEQ ID NO.	**Послідовність**
122	RLTISKDTSSNQVFLKIDTADTATYYCAQ
123	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAR
124	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAQ
125	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAT
126	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAK
127	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAA
128	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAH
129	RLTITKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAR
130	RLTITKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAH
131	RLTITKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAQ
132	RLTISKDTSSNQVFLKADTADTATYYCAQ
133	RLTISKDTSKNQVVLTTDPVDTATYYCAR
134	RLTISKDTSKNQVVLTTDPVDTATYYCAQ

SEQ ID NO.	Послідовність
135	RLTISKDTSKNQVVLTTDPVDTATYYCAT
136	RLTISKDTSKNQVVLTTDPVDTATYYCAK
137	RLTISKDTSKNQVVLTTDPVDTATYYCAA
138	RLTISKDTSKNQVVLTTDPVDTATYYCAH
139	RLTITKDTSKNQVVLTTDPVDTATYYCAR
140	RLTITKDTSKNQVVLTTDPVDTATYYCAH
141	RLTITKDTSKNQVVLTTDPVDTATYYCAQ
142	RLTISKDTSSNQVFLKSDTADTATYYCAQ
143	RLTISKDTSKNQVVLTNDPVDTATYYCAR
144	RLTISKDTSKNQVVLTNDPVDTATYYCAQ
145	RLTISKDTSKNQVVLTNDPVDTATYYCAT
146	RLTISKDTSKNQVVLTNDPVDTATYYCAK
147	RLTISKDTSKNQVVLTNDPVDTATYYCAA
148	RLTISKDTSKNQVVLTNDPVDTATYYCAH
149	RLTITKDTSKNQVVLTNDPVDTATYYCAR
150	RLTITKDTSKNQVVLTNDPVDTATYYCAH
151	RLTITKDTSKNQVVLTNDPVDTATYYCAQ
152	RLTISKDTSSNQVFLKVDTADTATYYCAQ
153	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAR
154	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAQ
155	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAT
156	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAK
157	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAA
158	RLTISKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAH
159	RLTITKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAR
160	RLTITKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAH
161	RLTITKDTSKNQVVLTMDPVDTATYYCAQ

Таблиця 4G

CDR3

A	B	C	D	Залишок
I	I	I	I	95
N	N	N	N	96
P	P	P	P	97
A	A	A	A	98
W	W	Y	Y	99
F	F	F	F	100
A	D	A	D	101
Y	Y	Y	Y	102
162	**163**	**164**	**165**	**SEQ ID NO**

SEQ ID NO.	Послідовність
162	INPAWFAY
163	INPAWFDY
164	INPAYFAY
165	INPAYFDY

Таблиця 4H

FR4

A	B		Залишок
W	W		103
G	G		104
Q	Q		105
G	G		106
T	T		107
L	L		108
V	V		109
T	T		110
V	V		111
S	S		112
A	S		113
166	**167**		**SEQ ID NO**

SEQ ID NO.	Послідовність
166	WGQGTLVTVSA
167	WGQGTLVTVSS

В одному з варіантів винаходу CD16A-зв'язувальний білок може містити послідовність варіабельного домену важкого ланцюга, яка є ідентичною або аналогічною VH-домену конструкції Hu3G8VH-1, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 68. Так, наприклад, даний винахід стосується CD16A-зв'язувального білка, що містить VH-домен, послідовність якого (1) відрізняється від послідовності VH-домену Hu3G8VH-1 (SEQ ID NO: 68) тим, що в ній відсутні CDR-заміни або присутні одна або більше ніж одна CDR-заміна, представлені в таблиці 1; (2) відрізняється від послідовності VH-домену Hu3G8VH-1 тим, що в ній відсутні заміни каркасних залишків або присутні одна або більше ніж одна заміна каркасних залишків, представлених у таблиці 1; і (3) щонайменше приблизно на 80 %, найчастіше щонайменше приблизно на 90 %, а іноді щонайменше приблизно на 95 % або навіть щонайменше приблизно на 98 % ідентична послідовності VH Hu3G8VH-1 в інших положеннях.

Репрезентативні VH-домени CD16-зв'язувальних білків відповідно до винаходу мають послідовності 3G8VH, Hu3G8VH-5 і Hu3G8VH-22 (SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 69 і SEQ ID NO: 70, відповідно). Репрезентативні нуклеотидні послідовності, які кодують послідовності 3G8VH і Hu3G8VH-5 (SEQ ID NO: 79 і SEQ ID NO: 69, відповідно), представлені SEQ ID NO: 80 і SEQ ID NO: 81, відповідно.

VH-домен може мати послідовність, що відрізняється від Hu3G8VH-1 (SEQ ID NO: 68) щонайменше однією, щонайменше двома, щонайменше трьома, щонайменше чотирма, щонайменше п'ятьма або щонайменше шістьма замінами, вказаними в таблиці 3. Ці заміни, мабуть, обумовлені підвищенням афінності відносно CD16A і/або зниженням імуногенності CD16A-зв'язувального білка при його введенні людині. У деяких варіантах винаходу ступінь ідентичності VH-домену Hu3G8VH-1 в інших положеннях становить щонайменше приблизно 80 %, щонайменше приблизно 90 %, щонайменше приблизно 95 % або щонайменше приблизно 98 %.

Ілюстративними, але необмежувальними прикладами послідовностей VH-доменів ряду CD16A-зв'язувальних білків є послідовності, представлені в таблиці 4. Важкі ланцюги, що містять ці послідовності, приєднані до константної ділянки людського Cγ1, були коекспресовані з легким ланцюгом hu3G8VL-1 (описаним нижче) для одержання тетрамерних антитіл, і зв'язування цих антитіл з CD16A оцінювали для визначення впливу присутності амінокислотних замін у порівнянні з VH-доменом hu3G8VH-1, де такі заміни були відсутні. Конструкції, у яких VH-домен має послідовність hu3G8VH-1, 2, 3, 4, 5, 8, 12, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 42, 43, 44 і 45, виявляють високу афінність зв'язування, а VH-домени hu3G8VH-6 і -40 виявляють проміжний рівень зв'язування. Вважається, що CD16A-зв'язувальні білки, що містять VH-домени hu3G8VH-5 і hu3G8VH-22 (SEQ ID NO: 69 і SEQ ID NO: 70, відповідно), мають особливо цінні зв'язувальні властивості.

5.1.2.2. VL-ділянка

Аналогічні дослідження були проведені для ідентифікації послідовностей варіабельного домену легкого ланцюга, що мають цінні зв'язувальні властивості. В одному зі своїх аспектів даний винахід стосується CD16A-зв'язувального білка, що містить варіабельний домен легкого ланцюга, у якому щонайменше одна CDR (і звичайно три CDR) має послідовність CDR (і найчастіше всі три CDR) легкого ланцюга мишачого моноклонального антитіла 3G8, а інші частини зв'язувального білка є, в основному, людськими (тобто, походять від варіабельної ділянки важкого ланцюга людського антитіла або людських антитіл і, в основному, аналогічні такій ділянці).

В одному зі своїх аспектів даний винахід стосується фрагмента гуманізованого антитіла 3G8, що містить CDR, які походять від антитіла 3G8, в основному, у людській каркасній ділянці, але в який щонайменше одна CDR варіабельного домену легкого ланцюга має послідовність, що відрізняється від відповідної послідовності CDR легкого ланцюга мишачого моноклонального антитіла 3G8. В одному з варіантів винаходу CDR відрізняється(ються) від послідовності 3G8 наявністю щонайменше однієї або більше амінокислотних замін у CDR, наприклад, однієї або більше замін, представлених у таблиці 2 (наприклад, аргініну в положенні 24 у CDR1; серину в положенні 25 у CDR1; тирозину в положенні 32 у CDR1; лейцину в положенні 33 у CDR1; аспарагінової кислоти, триптофану або серину в положенні 50 у CDR2; серину в положенні 53 у CDR2; аланіну або глутаміну в положенні 55 у CDR2; треоніну в положенні 56 у CDR2; серину в положенні 93 у CDR3; і/або треоніну в положенні 94 у CDR3). У різних варіантах винаходу варіабельний домен може мати 0, 1, 2, 3, 4, 5, або більше таких замін (а найчастіше від 1 до 4 таких замін), а також він може мати, але необов'язково, додаткові заміни.

В одному з варіантів винаходу придатний CD16A-зв'язувальний білок може містити послідовність варіабельного домену легкого ланцюга, яка є ідентичною або аналогічною VL-домену конструкції Hu3G8VL-1 (SEQ ID NO: 71), послідовність якої представлена в таблиці 6. Так, наприклад, даний винахід стосується CD16A-зв'язувального білка, що містить VL-домен, послідовність якого (1) відрізняється від послідовності VL-домену Hu3G8VL-1 (SEQ ID NO: 71) тим, що в ній відсутні CDR-заміни, або присутні одна або більше ніж одна CDR-заміна, представлені в таблиці 5; (2) відрізняється від послідовності VL-домену Hu3G8VL-1 тим, що в ній відсутні заміни каркасних залишків або присутні одна або більше ніж одна заміна каркасних залишків, представлених у таблиці 5; і (3) щонайменше приблизно на 80 %, найчастіше щонайменше приблизно на 90 %, а іноді щонайменше приблизно на 95 % або навіть щонайменше приблизно на 98 % ідентична послідовності VL Hu3G8VL-1 (SEQ ID NO: 71) в інших положеннях.

Таблиця 5

Заміни в V_L-домені 3G8

No.	Положення по Кебату	Область	Заміни
1	24	CDR1	Arg
2	25	CDR1	Ser
3	32	CDR1	Tyr
4	33	CDR1	Leu
5	50	CDR2	Asp або Trp або Ser
6	51	CDR2	Ala
7	53	CDR2	Ser
8	55	CDR2	Ala або Gln
9	56	CDR2	Thr
10	93	CDR3	Ser
11	94	CDR3	Thr

Таблиця 6

Послідовності V_L, походять від V_L 3G8*

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
3G8VL	A	A	A	A	A	A	A
Ch3G8VL	A	A	A	A	A	A	A
Hu3G8VL-1	B	A	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-2	B	B	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-3	B	C	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-4	B	D	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-5	B	E	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-6	B	F	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-7	B	G	A	A	B	A	B
Hu3G8VL-8	B	A	A	B	B	A	B
Hu3G8VL-9	B	A	A	C	B	A	B
Hu3G8VL-10	B	A	A	D	B	A	B
Hu3G8VL-11	B	A	A	E	B	A	B
Hu3G8VL-12	B	A	A	F	B	A	B
Hu3G8VL-13	B	A	A	G	B	A	B
Hu3G8VL-14	B	A	A	A	B	B	B
Hu3G8VL-15	B	A	A	A	B	C	B
Hu3G8VL-16	B	A	A	A	B	D	B
Hu3G8VL-17	B	A	A	A	B	E	B
Hu3G8VL-18	B	B	A	D	B	A	B
Hu3G8VL-19	B	B	A	D	B	D	B
Hu3G8VL-20	B	B	A	D	B	E	B
Hu3G8VL-21	B	C	A	D	B	A	B
Hu3G8VL-22	B	C	A	D	B	D	B
Hu3G8VL-23	B	C	A	D	B	E	B
Hu3G8VL-24	B	D	A	D	B	A	B
Hu3G8VL-25	B	D	A	D	B	D	B
Hu3G8VL-26	B	D	A	D	B	E	B
Hu3G8VL-27	B	E	A	D	B	A	B
Hu3G8VL-28	B	E	A	D	B	D	B
Hu3G8VL-29	B	E	A	D	B	E	B
Hu3G8VL-30	B	A	A	D	B	D	B
Hu3G8VL-31	B	A	A	D	B	E	B
Hu3G8VL-32	B	A	A	H	B	A	B
Hu3G8VL-33	B	A	A	I	B	A	B
Hu3G8VL-34	B	A	A	J	B	A	B
Hu3G8VL-35	B	B	A	H	B	D	B
Hu3G8VL-36	B	C	A	H	B	D	B
Hu3G8VL-37	B	E	A	H	B	D	B
Hu3G8VL-38	B	B	A	I	B	D	B
Hu3G8VL-39	B	C	A	I	B	D	B

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
Hu3G8VL-40	B	E	A	I	B	D	B
Hu3G8VL-41	B	B	A	J	B	D	B
Hu3G8VL-42	B	C	A	J	B	D	B
Hu3G8VL-43	B	E	A	J	B	D	B
Hu3G8VL-44	B	A	A	K	B	A	B

* Букви в таблиці 6А позначають послідовності, представлені в таблицях 6 B-H

Таблиця 6B

FR1

A	B	Залишок
D	D	1
T	I	2
V	V	3
L	M	4
T	T	5
Q	Q	6
S	S	7
P	P	8
A	D	9
S	S	10
L	L	11
A	A	12
V	V	13
S	S	14
L	L	15
G	G	16
Q	E	17
R	R	18
A	A	19
T	T	20
I	I	21
S	N	22
C	C	23
168	**169**	**SEQ ID NO**

SEQ ID NO.	Послідовність
168	DTVLTQSPASLAVSL
169	DIVMTQSPDSLAVSL

Таблиця 6С

CDR1

A	B	C	D	E	F	G	Залишок
K	R	K	K	K	K	K	24
A	A	S	A	A	A	A	25
S	S	S	S	S	S	S	26
Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	27
S	S	S	S	S	S	S	27A
V	V	V	V	V	V	V	27B
D	D	D	D	D	D	D	27C
F	F	F	F	F	F	F	27D
D	D	D	D	D	D	D	28
G	G	G	G	G	G	G	29
D	D	D	D	D	D	D	30
S	S	S	S	S	S	S	31
F	F	F	Y	F	F	Y	32
M	M	M	M	L	M	L	33
N	N	N	N	N	A	A	34
170	**171**	**172**	**173**	**174**	**175**	**176**	**27 SEQ ID NO**
177	**178**	**179**	**180**	**181**	**182**	**183**	**27A SEQ ID NO**
184	**185**	**186**	**187**	**188**	**189**	**190**	**27B SEQ ID NO**
191	**192**	**193**	**194**	**195**	**196**	**197**	**27C SEQ ID NO**
198	**199**	**200**	**201**	**202**	**203**	**204**	**27D SEQ ID NO**

SEQ ID NO.	Послідовність
170	KASQDGDSFMN
171	RASQDGDSFMN
172	KSSQDGDSFMN
173	KASQDGDSYMN
174	KASQDGDSFLN
175	KASQDGDSFMA
176	KASQDGDSYLA
177	KASSDGDSFMN
178	RASSDGDSFMN
179	KSSSDGDSFMN
180	KASSDGDSYMN
181	KASSDGDSFLN
182	KASSDGDSFMA
183	KASSDGDSYLA
184	KASVDGDSFMN
185	RASVDGDSFMN
186	KSSVDGDSFMN
187	KASVDGDSYMN
188	KASVDGDSFLN
189	KASVDGDSFMA
190	KASVDGDSYLA
191	KASDDGDSFMN

SEQ ID NO.	Послідовність
192	RASDDGDSFMN
193	KSSDDGDSFMN
194	KASDDGDSYMN
195	KASDDGDSFLN
196	KASDDGDSFMA
197	KASDDGDSYLA
198	KASFDGDSFMN
199	RASFDGDSFMN
200	KSSFDGDSFMN
201	KASFDGDSYMN
202	KASFDGDSFLN
203	KASFDGDSFMA
204	KASFDGDSYLA

Таблиця 6D

FR2

A	Залишок
W	35
Y	36
Q	37
Q	38
K	39
P	40
G	41
Q	42
P	43
P	44
K	45
L	46
L	47
I	48
Y	49
205	**SEQ ID NO**

SEQ ID NO.	Послідовність
205	WYQQKAPGQPPKLLIY

Таблиця 6E

CDR2

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	Залишок
T	D	W	T	D	D	S	S	S	T	T	50
T	A	A	T	A	A	A	T	T	T	T	51
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	52
N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	53
L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	54
E	E	E	E	E	A	Q	E	Q	Q	Q	55
S	S	S	T	T	T	S	S	S	S	S	56
206	**207**	**208**	**209**	**210**	**211**	**212**	**213**	**214**	**215**	**216**	**SEQ ID NO**

SEQ ID NO.	Послідовність
206	TTSNLES
207	DASNLES
208	WASNLES
209	TTSNLET
210	DASNLET
211	DASNLAT
212	SASNLQS
213	STSNLES
214	STSNLQS
215	TTSNLQS
216	TTSSLQS

Таблиця 6F

FR3

A	B	Залишок
G	G	57
I	V	58
P	P	59
A	D	60
R	R	61
F	F	62
S	S	63
A	G	64
S	S	65
G	G	66
S	S	67
G	G	68
T	T	69
D	D	70
F	F	71
T	T	72
L	L	73
N	T	74
I	I	75
H	S	76
P	S	77
V	L	78

A	B	Залишок
E	Q	79
E	A	80
E	E	81
D	D	82
T	V	83
A	A	84
T	V	85
Y	Y	86
Y	Y	87
C	C	88
217	**218**	**SEQ ID NO**

SEQ ID NO.	Послідовність
217	CIPARFSASCSCTDFTLNIHPVEEEDTATYYC
218	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC

Таблиця 6G

CDR3

A	B	C	D	E	Залишок
Q	Q	Q	Q	Q	89
Q	Q	Q	Q	Q	90
S	S	S	S	S	91
N	Y	Y	N	N	92
E	S	E	S	E	93
D	T	D	D	T	94
P	P	P	P	P	95
Y	Y	Y	Y	Y	96
T	T	T	T	T	97
219	**220**	**221**	**222**	**223**	**SEQ ID NO**

SEQ ID NO.	Послідовність
219	QQSNEDPYT
220	QQSYSTPYT
221	QQSYEDPYT
222	QQSNSDPYT
223	QQSNETPYT

Таблиця 6H

FR4

A	B	Залишок
F	F	98
G	G	99
G	Q	100
G	G	101
T	T	102
K	K	103
L	L	104
E	E	105
I	I	106
K	K	107
224	**225**	**SEQ ID NO**

SEQ ID NO.	Послідовність
224	FGGGTKLEIK
225	FGQGTKLEIK

Репрезентативні VL-домени CD16-зв'язувальних білків відповідно до винаходу мають послідовності 3G8VL, Hu3G8VL-1 або Hu3G8VL-43 (SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 71 і SEQ ID NO: 72, відповідно), як показано в таблицях 5 і 6. Репрезентативні нуклеотидні послідовності, які кодують послідовності 3G8VL (SEQ ID NO:82) і Hu3G8VL-1 (SEQ ID NO: 71), представлені в SEQ ID NO: 83 і SEQ ID NO: 84, відповідно.

VL-домен може мати послідовність, яка відрізняється від Hu3G8VL-1 (SEQ ID NO: 71) відсутністю замін, однією заміною, щонайменше двома, щонайменше 3, щонайменше 4, щонайменше 5 або щонайменше 6, щонайменше 7, щонайменше 8 або щонайменше 9 замінами, вказаними в таблиці 2. Ці заміни, мабуть, обумовлені підвищенням афінності відносно CD16A і/або зниженням імуногенності CD16A-зв'язувального білка при його введенні людині. У деяких варіантах винаходу ступінь ідентичності послідовностей в інших положеннях становить щонайменше приблизно 80 %, щонайменше приблизно 90 %, щонайменше приблизно 95 % або щонайменше приблизно 98 %.

Ілюстративними і необмежувальними прикладами послідовностей VL-доменів ряду CD16A-зв'язувальних білків є послідовності, представлені в таблиці 6. Легкі ланцюги, що містять ці послідовності, приєднані до константного домену людського Ск, були коекспресовані з важким ланцюгом hu3G8VH (описаним вище) для одержання тетрамерних антитіл, і зв'язування цих антитіл з CD16A оцінювали для визначення впливу присутності амінокислотних замін у порівнянні з VL-доменом hu3G8VL-1 (SEQ ID NO: 71), де такі заміни були відсутні. Конструкції, у яких VL-домен має послідовність hu3G8VL-1, 2, 3, 4, 5, 10, 16, 18, 19, 21, 22, 24, 27, 28, 32, 33, 34, 35, 36, 37 і 42, виявляють високу афінність зв'язування, а hu3G8VL-15, 17, 20, 23, 25, 26, 29, 30, 31, 38, 39, 40 і 41 виявляють проміжний рівень зв'язування. Вважається, що CD16A-зв'язувальні білки, що містять VL-домени hu3G8VL-1, hu3G8VL-22 і hu3G8VL-43 (SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73 і SEQ ID NO: 72, відповідно), мають особливо цінні зв'язувальні властивості.

5.1.2.2.1. Комбінації VL- і/або VH-доменів

Як відомо фахівцям і як описано в даній заявці, легкі і важкі ланцюги імуноглобуліну можуть бути рекомбінантно експресовані в умовах, при яких вони асоціюються з утворенням діатіла, або вони можуть бути об'єднані in vitro. Таким чином, слід зазначити, що описані тут VL-домени, які походять від 3G8, можуть бути об'єднані з описаними тут VH-доменами, які походять від 3G8, у результаті чого може бути отримане CD16A-зв'язувальне діатіло і всі розглянуті його комбінації.

Ілюстративним і необмежувальними прикладами придатних CD16A діатіл є діатіла, що містять щонайменше один VH-домен і щонайменше один VL-домен, де вказаний VH-домен походить від hu3G8VH-1, hu3G8VH-22 або hu3G8VH-5 (SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70 і SEQ ID NO: 69, відповідно), а вказаний VL-домен походить від hu3G8VL-1, hu3G8VL-22 або hu3G8VL-43 (SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73 і SEQ ID NO: 41, відповідно). Зокрема, гуманізовані антитіла, що містять hu3G8VH-22 (SEQ ID NO: 22) і або hu3G8VL-1, hu3G8VL-22 або hu3G8VL-43 (SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 70 і SEQ ID NO: 72, відповідно), або hu3G8VH-5 (SEQ ID NO: 69) і hu3G8VL-1 (SEQ ID NO: 71), мають цінні властивості.

Слід зазначити, що послідовності описаних тут VL- і VH-доменів можуть бути також модифіковані відомими методами, такими як дозрівання афінності (див., Schier et al. (1996) "Isolation Of Picomolar Affinity Anti-C-ErbB-2 Single-Chain Fv By Molecular Evolution Of The Complementarity Determining Regions In The Center Of The Antibody Binding Site" J. Mol. Biol. 263:551-567; Daugherty et al. (1998) "Antibody Affinity Maturation Using Bacterial Surface Display" Protein Eng. 11:825-832; Boder et al. (1997) "Yeast Surface Display For Screening Combinatorial Polypeptide Libraries" Nat. Biotechnol. 15:553-557; Boder et al. (2000) "Directed Evolution Of Antibody Fragments With Monovalent Femtomolar Antigen-Binding Affinity" Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:10701-10705; Hudson et al. (2003) "Engineered Antibodies" Nature Medicine 9:129-39). Так, наприклад, CD16A-зв'язувальні білки можуть бути модифіковані методами дозрівання афінності для ідентифікації білків, що мають підвищену афінність відносно CD16A і/або знижену афінність відносно CD16B.

Одним з репрезентативних CD16A-зв'язувальних білків є мишаче антитіло 3G8. Амінокислотна послідовність, що містить VH- і VL-домени гуманізованого 3G8, описана на фіг. 2, 9, 14 і представлена в SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 і SEQ ID NO: 72.

5.2. Діатіла, які містять Fc-ділянки або їхні частини

Даний винахід охоплює молекули діатіл, що містять Fc-домени або їхні частини (наприклад, CH2- або CH3- домен). У деяких варіантах винаходу Fc-домен або частина(и) містять один або більше константних доменів Fc-ділянки IgG2, IgG3 або IgG4 (наприклад, CH2 або CH3). В інших своїх варіантах даний винахід охоплює молекули, що містять Fc-домен або його частину, де вказаний Fc-домен або його частина мають щонайменше одну амінокислотну модифікацію (наприклад, заміну) у порівнянні з Fc-доменом або його частиною дикого типу. Варіанти Fc-доменів добре відомі фахівцям і використовуються, головним чином, для зміни фенотипу антитіла, що містить вказаний варіант Fc-домену, як може бути проаналізовано за допомогою будь-якого добре відомого аналізу на зв'язувальну активність або ефекторну функцію, наприклад, ELISA-аналізу, ППР-аналізу або аналізу на ADCC. Такі варіанти Fc-доменів або його частини, використовувані в даному винаході, надають або модифікують ефекторну функцію, яку має молекула діатіла відповідно до винаходу, що містить Fc-домен (або його частину), як може бути визначено у функціональному аналізі, наприклад, в аналізі, проведеному з використанням NK-клітин або макрофагів. Варіанти Fc-домену, ідентифіковані як Fc-домени зі зміненою ефекторною функцією, описані в міжнародній заявці WO04/063351, у публікаціях заявок на патент США 2005/0037000 і 2005/0064514, у попередній заявці на патент США 60/626510, поданій 10 листопада 2004 р., у попередній заявці на патент США 60/636663, поданій 15 грудня 2004 р., і в попередній заявці на патент США 60/781564, поданій 10 березня 2006 р., а також у заявках на патент США 11/271140, поданій 10 листопада 2005 р., і 11/305787, поданій 15 грудня 2005 р., і в одночасно поданих заявках авторів винаходу, що у всій своїй повноті вводяться в даний опис за допомогою посилання.

В інших своїх варіантах даний винахід охоплює застосування будь-якого відомого Fc-варіанта, такого як варіант, описаний у публікаціях Duncan et al. (1988) "Localization Of The Binding Site For The Human High-Affinity Fc Receptor On IgG" Nature 332:563-564; Lund et al. (1991) "Human Fc Gamma RI And Fc Gamma RII Interact With Distinct But Overlapping Sites On Human IgG" J. Immunol. 147:2657-2662; Lund et al. (1992) "Multiple Binding Sites On The CH2 Domain Of IgG For Mouse Fc Gamma RII" Mol. Immunol. 29:53-59; Alegre et al. (1994) "A Non-Activating "Humanized" Anti-CD3 Monoclonal Antibody Retains Immunosuppressive Properties In Vivo" Transplantation 57:1537-1543; Hutchins et al. (1995) "Improved Biodistribution, Tumor Targeting, And Reduced Immunogenicity In Mice With A Gamma 4 Variant Of Campath-IH" Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 92:11980-11984; Jefferis et al. (1995) "Recognition Sites On Human IgG For Fc Gamma Receptors: The Role Of Glycosylation" Immunol. Lett. 44:111-117; Lund et al. (1995) "Oligosaccharide-Protein Interactions In IgG Can Modulate Recognition By Fc Gamma Receptors" FASEB J. 9:115-119; Jefferis et al. (1996) "Modulation Of Fc(Gamma)R And Human Complement

Activation By IgG3-Core Oligosaccharide Interactions" Immunol. Lett. 54:101-104; Lund et al. (1996) "Multiple Interactions Of Igg With Its Core Oligosaccharide Can Modulate Recognition By Complement And Human Fc Gamma Receptor I And Influence The Synthesis Of Its Oligosaccharide Chains" J. Immunol. 157:4963-4969; Armour et al. (1999) "Recombinant Human IgG Molecules Lacking Fcgamma Receptor I Binding And Monocyte Triggering Activities" Eur. J. Immunol. 29:2613-2624; Idusogie et al. (2000) "Mapping Of The C1Q Binding Site On Rituxan, A Chimeric Antibody With A Human IgG1 Fc" J. Immunol. 164:4178-4184; Reddy et al. (2000) "Elimination OfFc Receptor-Dependent Effector Functions Of A Modified IgG4 Monoclonal Antibody To Human CD 4" J. Immunol. 164:1925-1933; Xu et al. (2000) "In Vitro Characterization Of Five Humanized OKT3 Effector Function Variant Antibodies" Cell. Immunol. 200:16-26; Idusogie et al. (2001) "Engineered Antibodies With Increased Activity To Recruit Complement" J. Immunol. 166:2571-2575; Shields et al. (2001) "High Resolution Mapping Of The Binding Site On Human IgG1 For Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, And FcRn And Design Of IgG1 Variants With Improved Binding To The Fc gamma R" J. Biol. Chem. 276:6591-6604; Jefferis et al. (2002) "Interaction Sites On Human IgG-Fc For FcgammaR: Current Models" Immunol. Lett. 82:57-65; Presta et al. (2002) "Engineering Therapeutic Antibodies For Improved Function" Biochem. Soc. Trans. 30:487-490; у патентах США 5624821; 5885573; 6194551; у заявках PCT WO 00/42072; PCT WO 99/58572; де всі вказані публікації і документи у всій своїй повноті вводяться в даний опис за допомогою посилання.

У деяких варіантах винаходу одна або більше модифікацій амінокислот Fc-ділянки приводять до зниження афінності й авідності Fc-ділянки, і тим самим, молекули діатіла відповідно до винаходу відносно одного або більше FcγR-рецепторів. У своєму конкретному варіанті даний винахід охоплює діатіла, що містять варіант Fc-ділянки або його частину, де вказаний варіант Fc-ділянки має щонайменше одну амінокислотну модифікацію в порівнянні з Fc-ділянкою дикого типу, і де вказаний варіант Fc-ділянки зв'язується тільки з одним FcγR, що являє собою FcγRIIIA. У своєму іншому конкретному варіанті даний винахід охоплює діатіла, що містять варіант Fc-ділянки або його частину, де вказаний варіант Fc-ділянки має щонайменше одну амінокислотну модифікацію в порівнянні з Fc-ділянкою дикого типу, і де вказаний варіант Fc-ділянки зв'язується тільки з одним FcγR, що являє собою FcγRIIA. У своєму іншому конкретному варіанті даний винахід охоплює діатіла, що містять варіант Fc-ділянки або його частину, де вказаний варіант Fc-ділянки має щонайменше одну амінокислотну модифікацію в порівнянні з Fc-ділянкою дикого типу, і де вказаний варіант Fc-ділянки зв'язується тільки з одним FcγR, що являє собою FcγRIIB. У своїх деяких варіантах даний винахід охоплює молекули, що містять варіант Fc-домену, де вказаний варіант надає або опосередковує підвищену ADCC-активність і/або підвищений рівень зв'язування з FcγRIIA (CD32A) у порівнянні з молекулою, що не містить Fc-домену або містить Fc-домен дикого типу, як може бути визначено методами, відомими фахівцям і описаними в даній заявці. У своїх альтернативних варіантах даний винахід охоплює молекули, що містять варіант Fc-домену, де вказаний варіант надає або опосередковує знижену ADCC-активність (або іншу ефекторну функцію) і/або підвищений рівень зв'язування з FcγRIIB (CD32B) у порівнянні з молекулою, що не містить Fc-домену або містить Fc-домен дикого типу, як може бути визначено методами, відомими фахівцям і описаними в даній заявці.

Даний винахід також охоплює застосування Fc-домену, що містить домени або ділянки, які походять від IgG двох або більше ізотипів. Як відомо фахівцям, амінокислотна модифікація Fc-ділянки може значно впливати на Fc-опосередковувану ефекторну функцію і/або зв'язувальну активність. Однак ці зміни функціональних властивостей можуть бути додатково уточнені і/або змінені залежно від IgG вибраних ізотипів. Аналогічним чином, природні властивості ізотипа Fc можуть бути змінені за допомогою введення однієї або більше амінокислотних модифікацій. IgG багатьох ізотипів (тобто, IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4) мають різні фізичні і функціональні властивості, включаючи час напівжиття в сироватці, фіксацію комплементу, афінності зв'язування з FcγR і ефекторні функції (наприклад, ADCC, CDC), що обумовлено розходженнями амінокислотних послідовностей, їхніх шарнірних доменів і/або Fc-доменів. У деяких варіантах винаходу амінокислотну модифікацію і Fc- ділянку IgG незалежно вибирають виходячи з їхній відповідних характерних активностей зв'язування і/або ефекторних функцій, що підходять для конструювання діатіла з потрібними властивостями. У більшості варіантів винаходу вказані амінокислотні модифікації і шарнірні ділянки/Fc-ділянки IgG були окремо проаналізовані на зв'язувальну активність і/або на ефекторну функцію застосовно до IgG1, описані в даній заявці або відомі фахівцям. У деяких варіантах винаходу вказана амінокислотна модифікація і шарнірна ділянка/Fc-ділянка IgG мають аналогічні функціональні властивості, наприклад, підвищеної афінність відносно FcγRIIA, на що вказував їхній окремий аналіз на FcγR-зв'язування або ефекторну функцію застосовно до молекули діатіла або до іншої Fc-вмісної

молекули (наприклад, імуноглобуліну). Отже, комбінація вказаних амінокислотних модифікацій і вибраної Fc-ділянки IgG діє адитивно або, більш переважно, синергічно, що дозволяє змінювати вказані функціональні властивості молекули діатіла відповідно до винаходу в порівнянні з молекулою діатіла відповідно до винаходу, що містить Fc-ділянку дикого типу. В інших варіантах винаходу вказані амінокислотні модифікації і Fc-ділянка IgG мають протилежну функціональну дію, наприклад, вони мають здатність підвищувати і знижувати, відповідно, афінність відносно FcγRIIA, як було проаналізовано окремо на FcγR-зв'язувальну функцію і/або ефекторну функцію застосовно до молекули діатіла або до іншої Fc-вмісної молекули (наприклад, імуноглобуліну), що включає Fc-ділянку дикого типу, описану в даній заявці або відому фахівцям, у результаті чого комбінація вказаної амінокислотної модифікації й вибраної ділянки IgG, що мають "протилежну" дію, буде селективно регулювати або знижувати специфічну функціональну активність діатіла відповідно до винаходу в порівнянні з діатілом відповідно до винаходу, що не містить Fc-ділянку або містить Fc-ділянку дикого типу того ж ізотипу. Альтернативно, даний винахід охоплює варіанти Fc-ділянки, що мають комбінації відомих амінокислотних модифікацій, і вибрані ділянки IgG, які мають нові властивості, де вказані властивості не можуть бути детектовані при проведенні аналізу вказаних модифікацій і/або ділянок окремо, як описано в даній заявці.

Функціональні властивості IgG багатьох ізотипів і їх доменів добре відомі фахівцям. Амінокислотні послідовності IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4 представлені на фіг. 1A-1B. Відбір і/або комбінації двох або більше доменів IgG конкретних ізотипів, використовуваних у способах відповідно до винаходу, можуть бути проведені виходячи з будь-яких відомих параметрів батьківських ізотипів, включаючи афінність відносно FcγR (таблиця 7; див. публікації Flesch et al. (2000) "Functions Of The Fc Receptors For Immunoglobulin G" J. Clin. Lab. Anal. 14:141-156; Chappel et al. (1993) "Identification Of A Secondary Fc Gamma RI Binding Site Within A Genetically Engineered Human IgG Antibody" J. Biol. Chem. 33:25124-25131; Chappel et al. (1991) "Identification Of The Fc Gamma Receptor Class I Binding Site In Human IgG Through The Use Of Recombinant IgG1/IgG2 Hybrid And Point-Mutated Antibodies" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9036-9040, кожна з яких у всій своїй повноті вводиться в даний опис за допомогою посилання). Так, наприклад, ділянки або домени IgG конкретних ізотипів, наприклад, IgG2 або IgG4, що мають обмежену здатність зв'язуватися з FcγRIIB або взагалі не зв'язуються з FcγRIIB, знаходять конкретне застосування при конструюванні потрібного діатіла з метою максимізації зв'язування з активуючим рецептором і мінімізації зв'язування з інгібуючим рецептором. Аналогічним чином, Fc-ділянки або домени IgG конкретних ізотипів, наприклад, IgG3, що, як відомо, зв'язуються переважно з C1q або FcγRIIIA (Bruggemann et al. (1987) "Comparison Of The Effector Functions Of Human Immunoglobulins Using A Matched Set Of Chimeric Antibodies" J. Exp. Med. 166:1351-1361), можуть бути об'єднані з відомими амінокислотними модифікаціями Fc з метою підвищення ADCC при конструюванні молекули діатіла, що буде мати поліпшену ефекторну функцію, тобто, буде максимізувати, наприклад, активацію комплементу або ADCC.

Таблиця 7

Загальні властивості IgG, що зв'язується з FcγR, адаптовані по Flesch & Neppert, 1999, J. Clin. Lab. Anal. 14:141-156

Рецептор	Оцінена афінність відносно IgG (M^{-1})	Відносна афінність
FcγRI	10^8-10^9	IgG3>IgG1>>IgG4 не зв'язується: IgG2
FcγRIIA R^{131A}	$<10^7$	IgG3>IgG1 не зв'язується: IgG2, IgG4
FcγRIIA H^{131A}	$<10^7$	IgG3>IgG1>IgG2 не зв'язується: IgG4
FcγRIIB [A]	$<10^7$	IgG3>IgG1>IgG4 не зв'язується: IgG2
FcγRIII	$<10^7$	IgG3=IgG1 не зв'язується: IgG2, IgG4

[A] зв'язується тільки з комплексним IgG

5.3. Молекулярні кон'югати

Молекули діатіла відповідно до винаходу можуть бути рекомбінантно зв'язані або хімічно кон'юговані (включаючи кон'югування за допомогою ковалентних і нековалентних зв'язків) з гетерологічними поліпептидами (тобто, з неспорідненим поліпептидом або його частиною, де вказаний поліпептид складається переважно щонайменше з 10, щонайменше з 20, щонайменше з 30, щонайменше з 40, щонайменше з 50, щонайменше з 60, щонайменше з 70, щонайменше з 80, щонайменше з 90 або щонайменше з 100 амінокислот) з одержанням злитих білків. Такі злиті білки необов'язково повинні мати безупинну послідовність, і вони можуть бути також утворені за допомогою лінкерних послідовностей.

Крім того, молекули діатіл відповідно до винаходу (тобто, поліпептиди) можуть бути кон'юговані з терапевтичним агентом або з молекулою лікарського засобу, які модифікують дану біологічну відповідь. Як альтернатива прямому кон'югуванню, щонайменше одна зв'язувальна ділянка діатіла, завдяки присутності множини епітоп-зв'язувальних сайтів на полівалентних, наприклад, чотиривалентних молекулах діатіла відповідно до винаходу, може бути сконструйована так, щоб вона зв'язувалася з терапевтичним агентом або з потрібною молекулою лікарського засобу, але не впливала на зв'язування діатіла.

Терапевтичні агенти або молекули лікарських засобів не обмежуються класичними хімічними терапевтичними агентами. Так, наприклад, молекулою лікарського засобу може бути білок або поліпептид, що має потрібну біологічну активність. Такими білками можуть бути, наприклад, токсин, такий як абрин, рицин A, екзотоксин Pseudomonas (тобто, PE-40), або дифтерійний токсин, рицин, гелонін і противірусний білок фітолакі, білок, такий як фактор некрозу пухлини; інтерферони, включаючи, але не обмежуючись ними, α-інтерферон (IFN-α), β-інтерферон (IFN-β), фактор росту нервових клітин (NGF), тромбоцитарний фактор росту (PDGF), тканинний активатор плазміногену (TPA), апоптотичний агент (наприклад, TNF-α, TNF-β, AIM I, описані в публікації PCT № WO 97/33899), AIM II (див. публікацію PCT № WO 97/34911), ліганд Fas і VEGI (публікація PCT № WO 99/23105), тромботичний агент або антиангіогенний агент (наприклад, ангіостатин або ендостатин) або модифікатор біологічної відповіді, наприклад, лімфокін (наприклад, інтерлейкін-1 ("IL-1"), інтерлейкін-2 ("IL-2"), інтерлейкін-6 ("IL-6"), гранулоцитарний-макрофагальний колонієстимулюючий фактор ("GM-CSF") і гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор ("G-CSF"), макрофагальний колонієстимулюючий

фактор ("M-CSF) або фактор росту (наприклад, гормон росту ("GH")), протеази або рибонуклеази.

Молекули діатіла відповідно до винаходу (тобто, поліпептиди) можуть бути приєднані до маркерних послідовностей, таких як пептид, для полегшення очищення. У переважних варіантах винаходу маркерною амінокислотною послідовністю є гексагістидиновий пептид, такий як мітка, яка є у векторі pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), і інші мітки, багато які з яких є комерційно доступними. Як описано в публікації Gentz et al. (1989 "Bioassay For Trans-Activation Using Purified Human Immunodeficiency Virus TAT-Encoded Protein: Trans-Activation Requires mRNA Synthesis" Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:821-824, наприклад, гексагістидин полегшує очищення злитого білка. Іншими пептидними мітками, використовуваними для очищення, є, але не обмежуються ними, гемаглютинінова ("HA") мітка, що відповідає епітопу, який походить від білка гемаглютиніну вірусу грипу (Wilson et al. (1984) "The Structure Of An Antigenic Determinant In A Protein" Cell, 37:767-778) і "flag»-мітка (Knappik et al. (1994) "An Improved Affinity Tag Based On The FLAG Peptide For The Detection And Purification Of Recombinant Antibody Fragments" Biotechniques, 17(4):754-761).

Інші злиті білки можуть бути отримані методами перестановки генів, перестановки мотивів, перестановки екзонів і/або перестановки кодонів (які мають спільну назву методи "перестановки ДНК"). Перестановка ДНК може бути здійснена з метою зміни активності молекул відповідно до винаходу (наприклад, епітоп-зв'язувальних сайтів з більш високими афінностями і з більш низькою швидкістю дисоціації). Загалом див. патенти США №№ 5605793; 5811238; 5830721; 5834252 і 5837458, і публікації Patten et al. (1997) "Applications Of DNA Shuffling To Pharmaceuticals And Vaccines" Curr. Opinion Biotechnol. 8:724-733; Harayama (1998) "Artificial Evolution By DNA Shuffling" Trends Biotechnol. 16:76-82; Hansson et al. (1999) "Evolution Of Differential Substrate Specificities In Mu Class Glutathione Transferases Probed By DNA Shuffling" J. Mol. Biol. 287:265-276; і Lorenzo et al. (1998) "PCR-Based Method For The Introduction Of Mutations In Genes Cloned And Expressed In Vaccinia Virus" BioTechniques 24:308-313 (усі вказані патенти і публікації у всій своїй повноті вводяться в даний опис за допомогою посилання). Молекули діатіла відповідно до винаходу або нуклеїнові кислоти, що кодують молекули відповідно до винаходу, можуть бути також модифіковані методом неспецифічного мутагенезу шляхом проведення ПЛР з імовірністю помилки, шляхом інсерції нуклеотидів у довільно вибраних положеннях або іншими методами, здійснюваними до рекомбінації. Одна або декілька частин полінуклеотиду, що кодує молекулу відповідно до винаходу, можуть бути піддані рекомбінації з одним або більше компонентами, мотивами, сегментами, елементами, доменами, фрагментами і т. п. однієї або більше гетерологічних молекул.

Даний винахід також охоплює молекули діатіла відповідно до винаходу, кон'юговані з діагностичними або терапевтичними агентами або з будь-якою іншою молекулою, або імуноспецифічно розпізнають ці агенти або молекули, що переважно повинні мати підвищений/знижений час напівжиття в сироватці і/або повинні бути націлені на конкретну субпопуляцію клітин. Молекули відповідно до винаходу можуть бути використані для діагностики, наприклад, для моніторингу або розвитку прогресування захворювання, розладу або інфекції при проведенні клінічної тест-процедури, наприклад, для визначення ефективності даної схеми лікування. Детектування можна полегшити шляхом приєднання молекул відповідно до винаходу до детектованої речовини або до молекул, які імуноспецифічно розпізнають детектовану речовину. Прикладами детектованих речовин є різні ферменти, простетичні групи, флуоресцентні речовини, люмінесцентні речовини, біолюмінесцентні речовини, радіоактивні речовини, позитрон-випромінюючі метали й іони нерадіоактивних парамагнітних металів. Детектована речовина може бути зв'язана або кон'югована з молекулами відповідно до винаходу або безпосередньо, або за допомогою проміжної сполуки (такої як, наприклад, відомий лінкер) методами, відомими фахівцям, або вказана молекула може імуноспецифічно розпізнавати детектовану речовину, тобто, імуноспецифічно зв'язуватися з вказаною речовиною. Див., наприклад, патент США № 4741900, де описані іони металів, які можуть бути кон'юговані з антитілами, використовуваними як діагностичні засоби відповідно до винаходу. Такі діагностичні і детектуючі засоби можуть бути отримані шляхом конструювання молекул, які імуноспецифічно розпізнають детектовану речовину, або шляхом приєднання молекул відповідно до винаходу до детектованих речовин, включаючи, але не обмежуючись ними, різні ферменти, включаючи, але не обмежуючись ними, пероксидазу хрону, лужну фосфатазу, бета-галактозидазу або ацетилхолінестеразу; до комплексів простетичних груп, таких як, але не обмежуються ними, стрептавідин/біотин і авідин/біотин; до флуоресцентних речовин, таких як, але які не обмежуються ними, умбеліферон, флуоресцеїн, флуоресцеїн-ізотіоціанат, родамін, дихлортриазиніламін-флуоресцеїн, данзилхлорид або фікоеритрин; до люмінесцентної

речовини, такої як, але яка не обмежується ними, люмінол; до біолюмінесцентних речовин, таких як, але які не обмежуються ними, люцифераза, люциферин і екворин; до радіоактивних речовин, таких як, але які не обмежуються ними, вісмут (^{213}Bi), вуглець (^{14}C), хром (^{51}Cr), кобальт (^{57}Co), фтор (^{18}F), гадоліній (^{153}Gd, ^{159}Gd), галій (^{68}Ga, ^{67}Ga), германій (^{68}Ge), гольмій (^{166}Ho), індій (^{115}In, ^{113}In, ^{112}In, ^{111}In), йод (^{131}I, ^{125}I, ^{123}I, ^{121}I), лантан (^{140}La), лютецій (^{177}Lu), марганець (^{54}Mn), молібден (^{99}Mo), паладій (^{103}Pd), фосфор (^{32}P), празеодим (^{142}Pr), прометій (^{149}Pm), реній (^{186}Re, ^{188}Re), родій (^{105}Rh), рутеній (^{97}Ru), самарій (^{153}Sm), скандій (^{47}Sc), селенів (^{75}Se), стронцій (^{85}Sr), сірка (^{35}S), технецій (^{99}Tc), талій (^{201}Ti), олово (^{113}Sn, ^{117}Sn), тритій (^{3}H), ксенон (^{133}Xe), ітербій (^{169}Yb, ^{175}Yb), ітрій (^{90}Y), цинк (^{65}Zn); до позитрон-випромінюючих металів, застосовуваних у різних методах томографії на основі позитронного випромінювання, і до іонів нерадіоактивних парамагнітних металів.

Молекули діатіла відповідно до винаходу можуть імуноспецифічно розпізнавати терапевтичну молекулу, таку як цитотоксин (наприклад, цитостатичний або цитотоксичний агент), терапевтичний агент або радіоактивний елемент (наприклад, випромінювачі альфа-частинок, випромінювачі гамма-частинок і т. п.), або вони можуть бути кон'юговані з цими молекулами. Цитотоксинами або цитотоксичними агентами є будь-який агент, який чинить токсичний вплив на клітини. Прикладами таких агентів є паклітаксел, цитохалазин B, граміцидин D, етидійбромід, еметин, мітоміцин, етопозид, теніпозид, вінкристин, вінбластин, колхіцин, доксорубіцин, даунорубіцин, дигідроксіантрациндіон, мітоксантрон, мітраміцин, актиноміцин D, 1-дегідротестостерон, глюкокортикоїди, прокаїн, тетракаїн, лідокаїн, пропранолол і пуроміцин і їхні аналоги або гомологи. Терапевтичними агентами є, але не обмежуються ними, антиметаболіти (наприклад, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тіогуанін, цитарабін, 5-фторурацилдекарбазин), алкілуючі агенти (наприклад, мехлоретамін, хлорамбуцил тіотепа, мелфалан, кармустин (BSNU) і ломустин (CCNU)), циклофосфамід, бусульфан, дибромманіт, стрептозотоцин, мітоміцин C і цис-дихлордіамін-платина (II) (DDP) (цисплатин), антрацикліни (наприклад, даунорубіцин (колишня назва "дауноміцин") і доксорубіцин), антибіотики (наприклад, дактиноміцин (колишня назва "актиноміцин"), блеоміцин, мітраміцин і антраміцин (AMC)), і антимітотичні агенти (наприклад, вінкристин і вінбластин).

Крім того, молекула діатіла відповідно до винаходу може бути кон'югована з терапевтичними молекулами, такими як радіоактивні речовини або макроциклічні хелатоутворювальні речовини, використовувані для кон'югування з іонами радіоактивних металів (приклади радіоактивних речовин див. вище), або вони можуть імуноспецифічно розпізнавати такі молекули. У деяких варіантах винаходу макроциклічною хелатоутворвальною речовиною є 1,4,7,10-тетраазациклододекан-N, N',N'',N'''-тетраоцтова кислота (DOTA), яка може бути приєднана до поліпептиду за допомогою лінкерної молекули. Такі лінкерні молекули добре відомі фахівцям і описані в публікаціях Denardo et al. (1998) "Comparison Of 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-N, N',N'',N'''-Tetraacetic Acid (DOTA)-Peptide-ChL6, A Novel Immunoconjugate With Catabolizable Linker, To 2-Iminothiolane-2-[p-(bromoacetamido)benzyl]-DOTA-ChL6 In Breast Cancer Xenografts" Clin. Cancer Res. 4:2483-2490; Peterson et al. (1999) "Enzymatic Cleavage Of Peptide-Linked Radiolabels From Immunoconjugates" Bioconjug. Chem. 10:553-; і Zimmerman et al, (1999) "A Triglycine Linker Improves Tumor Uptake And Biodistributions Of 67-Cu-Labeled Anti-Neuroblastoma mAb chCE7 F(ab')^2 Fragments" Nucl. Med. Biol. 26:943-950, кожна з яких у всій своїй повноті вводиться в даний опис за допомогою посилання.

Методи кон'югування таких терапевтичних молекул з поліпептидами, включаючи, наприклад, Fc-домени, добре відомі фахівцям; див., наприклад, Arnon et al. "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), 1985, pp. 243-56, Alan R. Liss, Inc.); Hellstrom et al. "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), 1987, pp. 623-53, Marcel Dekker, Inc.); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), 1985, pp. 475-506); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), 1985, pp. 303-16, Academic Press; і Thorpe et al. (1982) "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates" Immunol. Rev., 62:119-158.

Молекула діатіла відповідно до винаходу може бути введена разом з кон'югованою з нею терапевтичною молекулою, або без неї, або вона може бути введена окремо або в комбінації з цитотоксичним(и) фактором(ами) і/або з цитокіном(ами), використовуваними для терапевтичного лікування. При окремому введенні, щонайменше один епітоп полівалентної, наприклад, чотиривалентної молекули діатіла може бути сконструйований так, щоб він імуноспецифічно розпізнавав терапевтичний агент, наприклад, цитотоксичний(і) фактор(и) і/або

цитокін(и), які можуть бути введені одночасно з уведенням молекули відповідно до винаходу або після її введення. Таким чином, молекула діатіла може специфічно націлювати терапевтичний агент способом, аналогічним способу прямого кон'югування. Альтернативно, молекула відповідно до винаходу може бути кон'югована з антитілом з утворенням гетерокон'югата антитіла, описаного Segal у патенті США № 4676980, що у всій своїй повноті вводиться в даний опис за допомогою посилання. Молекули діатіла відповідно до винаходу можуть бути також приєднані до твердих носіїв, які є особливо придатними для проведення імуноаналізів або очищення антигену-мішені. Такими твердими носіями є, але не обмежуються ними, скло, целюлоза, поліакриламід, нейлон, полістирол, полівінілхлорид або поліпропілен.

Характеризація зв'язування молекул діатіл

Молекули діатіл відповідно до винаходу можуть бути охарактеризовані різними способами. Зокрема, молекули відповідно до винаходу можуть бути проаналізовані на їхню здатність імуноспецифічно зв'язуватися з антигеном, наприклад, з FcγRIIIA або FcγRIIB, або у випадку, якщо молекула містить Fc-домен (або його частину), вони можуть бути проаналізовані на Fc-FcγR-взаємодії, тобто на здатність Fc-домену (або його частини) специфічно зв'язуватися з FcγR. Такий аналіз може бути здійснений у розчині (див., наприклад, Houghten (1992) "The Use Of Synthetic Peptide Combinatorial Libraries For The Identification Of Bioactive Peptides" BioTechniques, 13:412-421), на сферах (Lam (1991) "A New Type Of Synthetic Peptide Library For Identifying Ligand-Binding Activity" Nature, 354:82-84), на чипах (Fodor (1993) "Multiplexed Biochemical Assays With Biological Chips" Nature, 364:555-556), на бактеріях (патент США № 5223409), на суперечках (патенти США №№ 5571698; 5403484 і 5223409), на плазмідах (Cull et al. (1992) "Screening For Receptor Ligands Using Large Libraries Of Peptides Linked To The C Terminus Of The Lac Repressor" Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:1865-1869) або на фагу (Scott et al. (1990) "Searching For Peptide Ligands With An Epitope Library" Science, 249:386-390; Devlin (1990) "Random Peptide Libraries: A Source Of Specific Protein Binding Molecules" Science, 249:404-406; Cwirla et al. (1990) "Peptides On Phage: A Vast Library Of Peptides For Identifying Ligands" Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378-6382; і Felici (1991) "Selection Of Antibody Ligands From A Large Library Of Oligopeptides Expressed On A Multivalent Exposition Vector" J. Mol. Biol, 222:301-310 (кожна з цих публікацій у всій своїй повноті вводиться в даний опис за допомогою посилання). Молекули, які були ідентифіковані як молекули, які імуноспецифічно зв'язуються з антигеном, наприклад, з FcγRIIIA, можуть бути потім проаналізовані на їхню специфічність і афінність до антигену.

Молекули відповідно до винаходу, що були сконструйовані так, щоб вони містили множину епітоп-зв'язувальних доменів, можуть бути проаналізовані на імуноспецифічне зв'язування з одним або більше антигенами (наприклад, з раковим антигеном) і на перехресну реактивність з іншим антигеном (наприклад, FcγR), або, якщо такі молекули містять Fc-домен (або його частину), то вони можуть бути проаналізовані на Fc-FcγR-взаємодії будь-яким методом, відомим фахівцям. Імуноаналізами, які можуть бути проведені для аналізу на імуноспецифічне зв'язування, перехресну реактивність і Fc-FcγR-взаємодії, є, але не обмежуються ними, системи конкурентних і неконкурентних аналізів із застосуванням таких технологій, як вестерн-блот-аналізи, радіоімуноаналізи, ELISA (твердофазний імуноферментний аналіз), "сендвіч»-імуноаналізи, аналізи методом імунопреципітації, аналізи на реакцію преципітації, аналізи на реакцію преципітину, аналізи на реакцію дифузії преципітину з гелю, імунодифузійні аналізи, аналізи на реакцію аглютинації, аналіз на фіксацію комплементу, імунорадіометричні аналізи, аналізи на флуоресценцію, імуноаналізи на білку А і багато які інші. Такі аналізи є рутинними і добре відомі фахівцям (див., наприклад, посібник Ausubel et al., eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York, що у всій своїй повноті вводиться в даний опис за допомогою посилання).

Афінність зв'язування і швидкість дисоціації комплексу антиген-зв'язувальний домен або комплексу Fc-FcγR можуть бути визначені за допомогою аналізів на конкурентне зв'язування. Одним із прикладів аналізу на конкурентне зв'язування є радіоімуноаналіз, що включає інкубування міченого антигену, такого як тетрамерний FcγR (наприклад, міченого ^{3}H або ^{125}I, див. розділ 5.4.1), з молекулою, що представляє інтерес (наприклад, з молекулами відповідно до винаходу, що містять множину епітоп-зв'язувальних доменів), у присутності зростаючих кількостей немміченого епітопа, такого як тетрамерний FcγR (див. розділ 5.4.1), і детектування молекули, зв'язаної з міченим антигеном. Афінність молекули відповідно до винаходу відносно антигену і швидкість дисоціації можуть бути визначені виходячи з даних насичення, отриманих в аналізі Скетчарда.

Афінності і зв'язувальні властивості молекул відповідно до винаходу відносно антигену або FcγR можуть бути попередньо визначені за допомогою відомих in vitro аналізів (біохімічних або

імунологічних аналізів) на взаємодію "антиген-зв'язувальний домен" або "Fc-FcγR", включаючи, але не обмежуючись ними, ELISA-аналіз, аналіз методом поверхневого плазмонного резонансу й аналізи на імунопреципітацію. Переважно, зв'язувальні властивості молекул відповідно до винаходу можуть бути також охарактеризовані за допомогою функціональних аналізів in vitro по визначенню однієї або декількох FcγR-опосередковуваних функцій ефекторних клітин, як описано в розділі 5.4.2. У найбільш переважних варіантах винаходу, при оцінці з використанням моделей in vivo (які описані і розкриваються в даній заявці), молекули відповідно до винаходу мали такі ж зв'язувальні властивості, як і в аналізах in vitro. Однак даний винахід не виключає розгляд молекул відповідно до винаходу, що не мають потрібного фенотипу в аналізах in vitro, але мають потрібний фенотип in vivo.

У деяких варіантах винаходу скринінг і ідентифікацію молекул, що містять множину епітоп-зв'язувальних доменів і, необов'язково, Fc-домени (або їхні частини), здійснюють за допомогою функціональних аналізів, переважно великомасштабних аналізів. Функціональними аналізами можуть бути будь-які відомі аналізи, що включають характеризацію однієї або більше FcγR-опосередковуваних функцій ефекторних клітин, таких як функції, описані тут у розділах 5.4.2 і 5.4.3. Необмежувальними прикладами функцій ефекторних клітин, які можуть бути використані в способах відповідно до винаходу, є, але не обмежуються ними, антитіло-залежна клітинно-опосередковувана цитотоксичність (ADCC), антитіло-залежний фагоцитоз, фагоцитоз, опсонізація, опсонофагоцитоз, зв'язування клітин, розеткоутворення, зв'язування з C1q і комплемент-залежна клітинно-опосередковувана цитотоксичність.

У переважному варіанті винаходу кінетичний аналіз BIAcore застосовують для визначення швидкості асоціації і дисоціації молекул відповідно до винаходу, що зв'язуються з антигеном і/або FcγR. Кінетичний аналіз BIAcore включає аналіз на зв'язування антигену або FcγR з чипами і їхнє відділення від чипів з іммобілізованими молекулами (наприклад, молекулами, що містять епітоп-зв'язувальні домени або Fc-домени (або їхні частини), відповідно), які присутні на їхнє поверхні. Аналіз BIAcore описаний у розділі 5.4.3.

Переважно, клітинний сортинг з активацією флуоресценції (FACS), проведений будь-якими відомими методами, застосовується в імунологічних або функціональних аналізах для характеризації молекул відповідно до винаходу. Протокові сортери дозволяють швидко оцінювати велике число окремих клітин, які зв'язані (наприклад, опсонізовані) з молекулами відповідно до винаходу (наприклад, 10-100 мільйонів клітин на годину) (Shapiro et al. (1995) Practical Flow Cytometry). Крім того, конкретними параметрами, використовуваними для оптимізації поводження діатіла, є, але не обмежуються ними, концентрація антигену (тобто, FcγR-тетрамерного комплексу, див. розділ 5.4.1), час кінетичної реакції конкурентного зв'язування або твердість умов проведення FACS-аналізу, і кожний з цих параметрів може бути змінений для відбору молекул діатіла, які містять молекули відповідно до винаходу, що мають специфічні зв'язувальні властивості, наприклад, здатність конкурентно зв'язуватися с множиною епітопів. Протокові цитометри, застосовувані для сортингу й оцінки біологічних клітин, добре відомі фахівцям. Відомі протокові цитометри описані, наприклад, у патентах США №№ 4347935; 5464581; 5483469; 5602039; 5643796 і 6211477, кожний з який у всій своїй повноті вводиться в даний опис за допомогою посилання. Іншими відомими протоковими цитометрами є FACS-система Vantage™, що виготовляється Becton Dickinson & Company, і система COPAS™, що виготовляється Union Biometrica.

Характеризація афінності зв'язування з антигеном-мішенню або афінності зв'язування Fc-FcγR, і оцінка щільності антигена-мішені або FcγR на клітинній поверхні можуть бути здійснені добре відомими методами, такими як аналіз Скетчарда, або методами, які проводяться з використанням наборів відповідно до інструкцій виробників, таких як Quantum™ Simply Cellular ® (Bangs Laboratories, Inc., Fishers, IN). Один або більше функціональних аналізів можуть являти собою будь-який відомий аналіз по характеризації однієї або більше FcγR-опосередковуваних функцій ефекторних клітин, відомих фахівцям або описаних у даній заявці. У конкретних варіантах винаходу молекули відповідно до винаходу, що містять множину епітоп-зв'язувальних доменів, і необов'язково Fc-домен (або його частину) аналізують у ELISA-аналізі на зв'язування з одним або більше антигеном-мішенями або з одним або більше FcγR, наприклад, FcγRIIIA, FcγRIIA, FcγRIIB, а потім в одному або більше аналізах на ADCC. У деяких варіантах винаходу молекули відповідно до винаходу також аналізують за допомогою аналізу методом поверхневого плазмонного резонансу, наприклад, BIAcore. Аналізи методом поверхневого плазмонного резонансу добре відомі фахівцям, а також обговорюються в розділі 5.4.3 і описані в даній заявці, наприклад, у прикладі 6.1.

У найбільш переважних варіантах винаходу молекули відповідно до винаходу, що містять множину епітоп-зв'язувальних доменів, і необов'язково Fc-домен (або його частину) додатково

охарактеризовують у тварини-моделі на взаємодію з антигеном-мішенню (наприклад, з FcγR) або на Fc-FcγR-взаємодії. При аналізі Fc-FcγR-взаємодій переважними тваринами-моделями, використовуваними в способах відповідно до винаходу, є, наприклад, трансгенні миші, експресуючі людські FcγR, наприклад, будь-які миші-моделі, описані в патентах США №№ 5877397 і 6676927, що у всій своїй повноті вводяться в даний опис за допомогою посилання. Іншими трансгенними мишами, використовуваними в таких способах, є, але не обмежуються ними, "голі" FcγRIIIA-дефіцитні миші, що несуть людський FcγRIIIA; "голі" FcγRIIIA-дефіцитні миші, що несуть людський FcγRIIA; "голі" FcγRIIIA-дефіцитні миші, що несуть людський FcγRIIB і людський FcγRIIIA; "голі" FcγRIIIA-дефіцитні миші, що несуть людський FcγRIIB і людський FcγRIIA; "голі" FcγRIIIA- і FcγRIIA-дефіцитні миші, що несуть людський FcγRIIIA і FcγRIIA; і "голі" FcγRIIIA-, FcγRIIA- і FcγRIIB-дефіцитні миші, що несуть людські FcγRIIIA, FcγRIIA і FcγRIIB.

5.3.1. Аналізи на зв'язування, які проводяться з використанням FcγR

Характеризація зв'язування FcγR з молекулами, що містять Fc-домен (або його частину) і/або містять епітоп-зв'язувальний домен, специфічний до FcγR, може бути проведена з використанням будь-якого FcγR, включаючи але не обмежуючи ними, поліморфні варіанти FcγR. У деяких варіантах винаходу використовується поліморфний варіант FcγRIIIA, що містить фенілаланін у положенні 158. В інших варіантах винаходу характеризацію здійснюють з використанням поліморфного варіанта FcγRIIIA, що містить валін у положенні 158. FcγRIIIA 158V має більш високу афінність відносно IgG1, ніж 158F і більш високу ADCC-активність (див., наприклад, публікації Koene et al. (1997) "Fc gammaRIIIa-158V/F Polymorphism Influences The Binding Of Ig By Natural Killer Cell Fc gammaRIIIa, Independently Of The Fc gammaRIIIa-48L/R/H Phenotype" Blood, 90:1109-14; Wu et al. (1997) "A Novel Polymorphism Of FcgammaRIIIa (CD16) Alters Receptor Function And Predisposes To Autoimmune Disease" J. Clin. Invest. 100:1059-70, що у всій своїй повноті вводяться в даний опис за допомогою посилання); причому цей залишок фактично безпосередньо взаємодіє з нижерозташованою шарнірною ділянкою IgG1, як було нещодавно виявлено при проведенні досліджень по спільній кристалізації IgG1-FcγRIIIA, див. наприклад, публікацію Sondermann et al. (2000) "The 3.2-A Crystal Structure Of The Human IgG1 Fc Fragment-Fc gammaRIII complex" Nature, 406(6793):267-273, що у всій своїй повноті вводиться в даний опис за допомогою посилання. Проведені дослідження показали, що в деяких випадках терапевтичні антитіла мали підвищену ефективність у FcγRIIIA-158V-гомозиготних пацієнтів. Так, наприклад, гуманізоване моноклональне анти-CD20 антитіло ритуксимаб є терапевтично більш ефективним у FcγRIIIA-158V-гомозиготних пацієнтів у порівнянні з FcγRIIIA-158F-гомозиготними пацієнтами (див., наприклад, Cartron et al. (2002) "Therapeutic Activity Of Humanized Anti-CD20 Monoclonal Antibody And Polymorphism In Ig Fc Receptor FcgammaRIIIA Gene" Blood, 99(3):754-758). В інших варіантах винаходу терапевтичні молекули, що містять цю ділянку, можуть бути також більш ефективними в пацієнтів, гетерозиготних по FcγRIIIA-158V і FcγRIIIA-158F, і в пацієнтів з FcγRIIA-131H. Не маючи на увазі який-небудь конкретний механізм дії, автори даного винаходу лише відзначають, що вибір молекул відповідно до винаходу з альтернативними алотипами дозволяє одержати варіанти, що, після їхнього перетворення в терапевтичні діатіла, будуть клінічно більш ефективними в пацієнтів, гомозиготних по вказаному алотипу.

Аналіз на зв'язування з FcγR був розроблений для визначення рівня зв'язування молекул відповідно до винаходу з FcγR і, зокрема, для визначення рівня зв'язування Fc-доменів з FcγR. Цей аналіз дозволяє детектувати і кількісно визначити взаємодії Fc-FcγR, незважаючи на природну низьку афінність рецептора відносно його ліганду, наприклад, у мікромолярному інтервалі для FcγRIIB і FcγRIIIA. Цей метод докладно описаний у міжнародній заявці WO04/063351 і в публікаціях заявок на патенти США 2005/0037000 і 2005/0064514, кожна з який у всій своїй повноті вводиться в даний опис за допомогою посилання. Коротко, цей метод включає одержання FcγR-комплексу, що може бути використаний у будь-якому стандартному імуноаналізі, відомому фахівцям, наприклад, у FACS-аналізі, у ELISA-аналізі, в аналізі методом поверхневого плазмонного резонансу і т. п. Крім того, FcγR-комплекс має підвищену авідність до Fc-ділянки в порівнянні з некомплексним FcγR. Відповідно до даного винаходу переважним молекулярним комплексом є тетрамерний імунний комплекс, що включає: (a) розчинну ділянку FcγR (наприклад, розчинну ділянку FcγRIIIA, FcγRIIA або FcγRIIB); (b) біотинільовану послідовність AVITAG, що складається з 15 амінокислот (AVITAG), функціонально приєднану до С-кінця розчинної ділянки FcγR (наприклад, розчинної ділянки FcγRIIIA, FcγRIIA або FcγRIIB); і (c) стрептавідин-фікоеритрин (SA-PE) у молярному відношенні, що підходить для утворення тетрамерного FcγR-комплексу (переважно, у молярному відношенні 5:1). Злитий білок був ферментативно біотинільований з використанням, наприклад, ферменту Bir A E. coli, тобто біотин-лігази, яка специфічно біотинілює лізиновий залишок у послідовності AVITAG з 15

амінокислот. Потім біотинільовані розчинні білки FcγR змішують з SA-PE у молярному відношенні 1×SA-PE:5x біотинільований розчинний FcγR з одержанням тетрамерного FcγR-комплексу.

Було показано, що поліпептиди, які містять Fc-ділянки, зв'язуються з тетрамерними FcγR-комплексами з афінністю зв'язування, що щонайменше в 8 разів перевищує афінність зв'язування з мономерним некомплексним FcγR. Зв'язування поліпептидів, що містять Fc-ділянки, з тетрамерними FcγR-комплексами може бути визначено відомими стандартними методами, такими як, наприклад, клітинний сортинг з активацією флуоресценції (FACS), радіоімуноаналізи, ELISA-аналіз і т. п.

Даний винахід охоплює застосування імунних комплексів, що містять молекули відповідно до винаходу й отриманих описаними вище способами, з метою визначення функціональних властивостей молекул, що містять Fc-ділянку, у клітинних або в неклітинних аналізах.

Для зручності реагенти можуть поставлятися в аналітичному наборі, тобто в упаковці, що містить комбінацію реагентів для аналізу на здатність молекул, що містять Fc-ділянки, зв'язуватися з тетрамерними FcγR-комплексами. Інші форми молекулярних комплексів, застосовуваних для визначення взаємодій Fc-FcγR, також можуть бути використані в способах відповідно до винаходу, наприклад, такими формами є злиті білки, отримані, як описано в попередній заявці на патент США 60/439709, поданій 13 січня 2003 р., що у всій своїй повноті вводиться в даний опис за допомогою посилання.

5.3.2. Функціональні аналізи молекул з варіантами важких ланцюгів

Даний винахід охоплює характеризацію молекул відповідно до винаходу, які містять множину епітоп-зв'язувальних доменів, і необов'язково, Fc-доменів (або їхніх частин) за допомогою відомих аналізів по ідентифікації молекул, що мають функції ефекторних клітин. Зокрема, даний винахід охоплює характеризацію молекул відповідно до винаходу на FcγR-опосередковувану функцію ефекторних клітин. Крім того, якщо щонайменше один з антигенів-мішеней для молекул діатіла відповідно до винаходу являє собою FcγR, то зв'язування FcγR з молекулою діатіла може активувати FcγR-опосередковувані шляхи, аналогічні шляхам зв'язування FcγR-Fc. Таким чином, якщо щонайменше один епітоп-зв'язувальний домен молекули діатіла розпізнає FcγR, то молекула діатіла може мати FcγR-опосередковувану функцію ефекторних клітин, що не містять Fc-домену (або його частини), або в яких не відбувається наступного зв'язування Fc-FcγR. Прикладами функцій ефекторних клітин, що можуть бути проаналізовані відповідно до даного винаходу, є, але не обмежуються ними, антитіло-залежна клітинно-опосередковувана цитотоксичність, фагоцитоз, опсонізація, опсонофагоцитоз, зв'язування з C1q і комплемент-комплемент-залежна клітинно-опосередковувана цитотоксичність. Можуть бути проведені будь-які відомі клітинні або неклітинні аналізи на визначення функціональної активності ефекторних клітин (опис аналізів ефекторних клітин можна знайти в публікаціях Perussia et al. (2000) "Assays For Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity (ADCC) And Reverse ADCC (Redirected Cytotoxicity) In Human Natural Killer Cells" Methods Mol. Biol. 121:179-92; Baggiolini et al. (1988) "Cellular Models For The Detection And Evaluation Of Drugs That Modulate Human Phagocyte Activity" Experientia, 44(10):841-848; Lehmann et al. (2000) "Phagocytosis: Measurement By Flow Cytometry" J. Immunol. Methods, 243(1-2):229-42; Brown (1994) "In Vitro Assays Of Phagocytic Function Of Human Peripheral Blood Leukocytes: Receptor Modulation And Signal Transduction" Methods Cell Biol, 45:147-64; Munn et al. (1990) "Phagocytosis Of Tumor Cells By Human Monocytes Cultured In Recombinant Macrophage Colony-Stimulating Factor" J. Exp. Med., 172:231-237, Abdul-Majid et al. (2002) "Fc Receptors Are Critical For Autoimmune Inflammatory Damage To The Central Nervous System In Experimental Autoimmune Encephalomyelitis" Scand. J. Immunol. 55:70-81; Ding et al. (1998) "Two Human T Cell Receptors Bind In A Similar Diagonal Mode To The HLA-A2/Tax Peptide Complex Using Different TCR Amino Acids" Immunity 8:403-411, кожна з який у всій своїй повноті вводиться в даний опис за допомогою посилання).

В одному з варіантів винаходу молекули відповідно до винаходу можуть бути проаналізовані на FcγR-опосередкований фагоцитоз у людських моноцитах. Альтернативно, FcγR-опосередкований фагоцитоз молекул відповідно до винаходу може бути проаналізований в інших фагоцитах, наприклад, у нейтрофілах (поліморфонуклеарних лейкоцитах; PMN); у людських моноцитах периферичній крові й у макрофагах, які походять від моноцитів, що можуть бути отримані стандартними методами, відомими фахівцям (наприклад, див. Brown (1994) "In Vitro Assays Of Phagocytic Function Of Human Peripheral Blood Leukocytes: Receptor Modulation And Signal Transduction" Methods Cell Biol., 45:147-164). В одному з варіантів винаходу функцію молекул відповідно до винаходу характеризують шляхом оцінки здатності клітин THP-1 до фагоцитозу мічених флуоресцеїном IgG-опсонізованих овечих еритроцитів (SRBC) раніше

описаними методами (Tridandapani et al. (2000) "The Adapter Protein LAT Enhances Fcgamma Receptor-Mediated Signal Transduction In Myeloid Cells" J. Biol. Chem. 275:20480-20487).

Іншим репрезентативним аналізом на визначення фагоцитозу молекул відповідно до винаходу є аналіз на антитіло-залежний опсонофагоцитоз (ADCP), який може включати: покриття біочастинки-мішені, такий як ФІТЦ-мічена Escherichia coli (Molecular Probes) або ФІТЦ-мічена бактерія Staphylococcus aureus, (i) антитілом 4-4-20 дикого типу, тобто антитілом проти флуоресцеїну (див. публікацію Bedzyk et al. (1989) "Comparison Of Variable Region Primary Structures Within An Anti-Fluorescein Idiotype Family" J. Biol. Chem, 264(3):1565-1569, що у всій своїй повноті вводиться в даний опис за допомогою посилання), використовуваним як контрольне антитіло для аналізу на FcγR-залежний ADCP; або (ii) антитілом 4-4-20, що має мутацію D265A, яка приводить до запобігання зв'язування з FcγRIII, і використовуваним як фонове контрольне антитіло для аналізу на FcγR-залежний ADCP; (iii) діатілом, яке містить епітоп-зв'язувальний домен антитіла 4-4-20 і Fc-домен і/або епітоп-зв'язувальний домен, специфічний до FcγRIII; і утворення опсонізованої частинки; додавання будь-якої з описаних опсонізованих частинок (i-iii) до ефекторних клітин THP-1 (моноцитарної клітинної лінії, що поставляється з ATCC) у відношенні 1:1, 10:1, 30:1, 60:1, 75:1 або 100:1, що приводить до FcγR-опосередковуваного фагоцитозу; переважно інкубування клітин з E. coli-ФІТЦ/антитілом при 37°C протягом 1,5 години; додавання трипанового синього після інкубування (переважно протягом 2-3 хвилин при кімнатній температурі) до клітин для гасіння флуоресценції бактерій, які прилипали до зовнішньої клітинної поверхні, але не інтерналізувались у клітини; перенесення клітин у FACS-буфер (наприклад, 0,1 % BSA у PBS, 0,1 % азид натрію) і аналіз інтенсивності флуоресценції клітин THP1 з використанням FACS (наприклад, BD FACS Calibur). Переважно, клітини THP-1, використовувані в цьому аналізі, аналізують за допомогою FACS на експресію FcγR на клітинній поверхні. Клітини THP-1 експресують CD32A і CD64. CD64 являє собою високоафінний FcγR, який був блокований, на що вказував аналіз на ADCP, проведений способами відповідно до винаходу. Клітини THP-1 переважно блокують 100 мкг/мл розчинного IgG1 або 10 % людською сироваткою. Для аналізу рівня ADCP, на клітини THP-1 переважно подають сигнал збудження і вимірюють середню інтенсивність флуоресценції. Потім обчислювали ADCP-активність окремих мутантів, і отримані дані виражають як величину, нормалізовану по величині, отриманій для chMab 4-4-20 дикого типу. Опсонізовані частинки додають до клітин THP-1 так, щоб відношення опсонізованих частинок до клітин THP-1 складало 30:1 або 60:1. У найбільш переважних варіантах винаходу аналіз на ADCP проводять з використанням контролю, такого як E. coli-ФІТЦ у середовищі, E. coli-ФІТЦ і клітин THP-1 (для аналізу на FcγR-незалежну ADCP-активність), E. coli-ФІТЦ, клітини THP-1 і антитіло 4-4-20 дикого типу (для аналізу на FcγR-залежну ADCP-активність), E. coli-ФІТЦ, клітини THP-1 і антитіло 4-4-20 D265A (як фоновий контроль для аналізу на FcγR-залежну ADCP-активність).

В іншому варіанті винаходу молекули відповідно до винаходу можуть бути проаналізовані на FcγR-опосередковану ADCC-активність у ефекторних клітинах, наприклад, у природних клітинах-кілерах, із застосуванням будь-якого стандартного методу, відомого фахівцям (див., наприклад, Perussia et al. (2000) "Assays For Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity (ADCC) And Reverse ADCC(Redirected Cytotoxicity) In Human Natural Killer Cells" Methods Mol. Biol. 121:179-92; Weng et al. (2003) "Two Immunoglobulin G Fragment C Receptor Polymorphisms Independently Predict Response To Rituximab In Patients With Follicular Lymphoma" J. Clin. Oncol. 21:3940-3947; Ding et al. (1998) "Two Human T Cell Receptors Bind In A Similar Diagonal Mode To The HLA-A2/Tax Peptide Complex Using Different TCR Amino Acids" Immunity 8:403-411). Репрезентативний аналіз на визначення ADCC-активності молекул відповідно до винаходу являє собою аналіз на вивільнення ^{51}Cr, що включає: мічення клітин-мішеней молекулою $[^{51}Cr]Na_2CrO_4$ (ця молекула, що проходить через клітинну мембрану, звичайно використовується для мічення, оскільки вона зв'язується з цитоплазматичними білками і, незважаючи на її спонтанне вивільнення з клітин з низькою кінетикою, вона усе-таки вивільняється в значній кількості після некрозу клітин-мішеней); опсонізацію клітин-мішеней молекулами відповідно до винаходу, що містять варіанти важких ланцюгів; об'єднання опсонізованих радіоактивно мічених клітин-мішеней з ефекторними клітинами в мікротитраційному планшеті у відповідному відношенні клітин-мішеней до ефекторних клітин; інкубування суміші клітин протягом 16-18 годин при 37°C; збір супернатантів і аналіз радіоактивності. Потім цитотоксичність молекул відповідно до винаходу може бути визначена, наприклад, по наступній формулі: % лізису=(експеримент, число імпульсів на хвилину (імп./хв.) - вивільнення мішені (імп./хв.)/(лізис детергенту (імп./хв.) - вивільнення мішені (імп./хв.))×100 %. Альтернативно, % лізису=(ADCC-AICC)/(максимальне вивільнення - спонтанне вивільнення). Специфічний лізис може бути визначений по наступній формулі: специфічний лізис = % лізису під дією молекул відповідно до

винаходу - % лізису під час відсутності молекул відповідно до винаходу. Графік може бути побудований шляхом варіювання відношення "мішень-клітина-мішень:ефекторна клітина" або концентрації антитіл.

Переважно, ефекторними клітинами, використовуваними в аналізах на ADCC відповідно до винаходу, є мононуклеарні клітини периферичної крові (МКПК), що переважно виділяють з нормальної людської крові відомими стандартними методами, наприклад, шляхом центрифугування в градієнті щільності фікола-пака. Переважні ефекторні клітини, використовувані в способах відповідно до винаходу, експресують різні активуючі FcγR-рецептори. Даний винахід охоплює ефекторні клітини, THP-1, експресуючі FcγR, FcγRIIA і FcγRIIB, і первинні макрофаги, які походять від моноцитів, виділені з людської цільної крові, і експресуючі FcγRIIIA і FcγRIIB, де вказані клітини були використані для того, щоб визначити, чи можуть мутанти важкого ланцюга антитіл підвищувати ADCC-активність і фагоцитоз у порівнянні з антитілами IgG1 дикого типу.

Людська моноцитарна клітинна лінія THP-1 активує фагоцитоз за допомогою експресії високоафіного рецептора FcγRI і низькоафіного рецептора FcγRIIA (Fleit et al. (1991) "The Human Monocyte-Like Cell Line THP-1 Expresses Fc Gamma RI And Fc Gamma RII" J. Leuk. Biol. 49:556-565). Клітини THP-1 не експресують конститутивно FcγRIIA або FcγRIIB. Стимуляція цих клітин цитокінами негативно впливає на характер експресії Fc (Pricop et al. (2001) "Differential Modulation Of Stimulatory And Inhibitory Fc Gamma Receptors On Human Monocytes By Thl And Th2 Cytokines" J. of Immunol., 166:531-537). Ріст клітин THP-1 у присутності цитокіну IL4 індукує експресію FcγRIIB і приводить до зниження рівня експресії FcγRIIA і FcγRI. Експресія FcγRIIB може бути також посилена при підвищеній клітинній щільності (Tridandapani et al. (2002) "Regulated Expression And Inhibitory Function Of Fcgamma RUB In Human Monocytic Cells" J. Biol. Chem., 277(7):5082-5089). На противагу цьому, повідомлялося, що IFNγ може індукувати експресію FcγRIIIA (Pearse et al. (1993) "Interferon Gamma-Induced Transcription Of The High-Affinity Fc Receptor For Ig Requires Assembly Of A Complex That Includes The 91-кДа Subunit Of Transcription Factor ISGF3" Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90:4314-4318). Присутність або відсутність рецепторів на клітинній поверхні може бути визначена за допомогою FACS загальновідомими методами. Індукована цитокіном експресія FcγR на клітинній поверхні забезпечує систему тестування активації і інгібування в присутності FcγRIIB. Якщо клітини THP-1 не здатні експресувати FcγRIIB, то даний винахід також охоплює іншу людську моноцитарну клітинну лінію U937. Було показано, що ці клітини знаходяться в термінальній стадії диференціювання в макрофагах у присутності IFNγ і TNF (Koren et al. (1979) "In Vitro Activation Of A Human Macrophage-Like Cell Line" Nature 279:328-331).

FcγR-залежний цитоліз клітин-мішеней опосередковується макрофагами і NK-клітинами в мишей з моделлю пухлини (Clynes et al. (1998) "Fc Receptors Are Required In Passive And Active Immunity To Melanoma" Proc. Nat. Acad. Sci. USA 95:652-656). Даний винахід охоплює застосування виснажених моноцитів, узятих у донорів, як ефекторних клітин для аналізу на ефективність Fc-мутантів відносно стимуляції цитотоксичності клітин-мішеней в аналізах на фагоцитоз і ADCC. На характер експресії FcγRI, FcγRIIIA і FcγRIIB впливають різні умови культивування. Експресія FcγR із заморожених виснажених моноцитів, зі свіжих виснажених моноцитів, з моноцитів, що містяться в 10 % FBS, і моноцитів, культивованих у FBS+GM-CSF і/або в людській сироватці, може бути визначена загальновідомими методами. Так, наприклад, клітини можуть бути забарвлені в FcγR-специфічними антитілами і проаналізовані за допомогою FACS-аналізу для визначення FcR-профілів. У способах відповідно до винаходу були використані умови, що найбільш точно імітують експресію FcγR у макрофагах in vivo.

У деяких своїх варіантах даний винахід охоплює використання мишачих клітин, особливо в тих випадках, коли неможливо одержати людські клітини з "правильними" профілями експресії FcγR. У деяких своїх варіантах даний винахід охоплює клітинну лінію мишачих макрофагів RAW264.7(ATCC), яка може бути трансфікована людським FcγRIIIA, після чого стабільні трансфектанти виділяють відомими методами, див., наприклад, Ralph et al. (1977) "Antibody-Dependent Killing Of Erythrocyte And Tumor Targets By Macrophage-Related Cell Lines: Enhancement By PPD And LPS" J. Immunol. 119:950-4. Трансфектанти можуть бути кількісно оцінені на експресію FcγRIIIA за допомогою FACS-аналізу за допомогою рутинного експериментування, і клітини з високим рівнем експресії можуть бути використані в аналізах ADCC відповідно до винаходу. В інших своїх варіантах даний винахід охоплює виділення перитонеальних макрофагів селезінки, експресуючих людський FcγR у дефіцитних трансгенних мишей, описаних у даній заявці.

Лімфоцити можуть бути зібрані з периферичної крові донорів (PBM) у градієнті фікола-пака (Pharmacia). У виділених клітинах популяції мононуклеарних клітин, у більшості випадків, ADCC-

активність забезпечується природними клітинами-кілерами (NK), що містять FcγRIIIA, але не FcγRIIB, на своїй поверхні. Результати, отримані з використанням цих клітин, указували на ефективність мутантів відносно запуску ADCC NK-клітинами і дозволяють вибрати реагенти для проведення тестів з використанням виснажених моноцитів.

Клітинами-мішенями, використовуваними в аналізах на ADCC відповідно до винаходу, є, але не обмежуються ними, клітинні лінії раку молочної залози, наприклад, SK-BR-3 з реєстраційним номером ATCC HTB-30 (див., наприклад, Tremp et al. (1976) "Human Breast Cancer In Culture" Recent Results Cancer Res. 33-41); В-лімфоцити; клітини, які походять від лімфоми Беркітта, наприклад, клітини Raji з реєстраційним номером CCL-86 (див., наприклад, Epstein et al. (1965) "Characteristics And Mode Of Growth Of Tissue Culture Strain (EB1) Of Human Lymphoblasts From Burkitt's Lymphoma" J. Natl. Cancer Inst. 34:231-240), і клітини Дауди з реєстраційним номером ATCC CCL-213 (див., наприклад, Klein et al. (1968) "Surface IgM-Kappa Specificity On A Burkitt Lymphoma Cell In Vivo And In Derived Culture Lines" Cancer Res. 28:1300-1310). Ці клітини-мішені повинні розпізнаватися антигензв'язувальним сайтом аналізованої молекули діатіла.

Аналіз на ADCC оснований на здатності NK-клітин опосередковувати клітинну загибель по апоптотичному шляху. NK-клітини опосередковують клітинну загибель частково завдяки розпізнаванню FcγRIIIA Fc-доменом IgG, зв'язаним з антигеном на клітинній поверхні. Аналізи на ADCC, проведені способами відповідно до винаходу, можуть являти собою аналізи з використанням радіоактивних речовин або з використанням флуоресценції. Аналіз на ADCC, здійснюваний для характеризації молекул відповідно до винаходу, що містять варіанти Fc-ділянок, включає мічення клітин-мішеней, наприклад, SK-BR-3, MCF-7, OVCAR3, Raji, клітин Дауді, опсонізуючих клітин-мішеней антитілом, що дозволяє розпізнавати рецептор клітинної поверхні на клітині-мішені за допомогою антигензв'язувального сайта цього антитіла; об'єднання мічених опсонізованих клітин-мішеней і ефекторних клітин у відповідному співвідношенні, що може бути визначене шляхом рутинного експериментування; збір клітин і детектування мітки в супернатанті лізованих клітин-мішеней по відповідній схемі детектування, яка проводиться по використовуваній мітці. Клітини-мішені можуть бути позначені радіоактивною міткою або флуоресцентною міткою стандартними методами, відомими фахівцям. Так, наприклад, такими мітками є, але не обмежуються ними, [^{51}Cr]Na_2CrO_4; і ацетоксиметиловий ефір ліганду, що підсилює флуоресценцію, 2,2':6',2”-терпіридин-6-6”-дикарбоксилат (TDA).

У конкретному переважному варіанті винаходу, флуориметричний аналіз з часовим розділенням використовується для визначення ADCC-активності, спрямованої проти клітин-мішеней, які були позначені ацетоксиметиловим ефіром ліганду, що підсилює флуоресценцію, 2,2':6',2”-терпіридин-6-6”-дикарбоксилатом (TDA). Такі флуориметричні аналізи відомі фахівцям, див., наприклад, публікацію Blomberg et al. (1996) "Time-Resolved Fluorometric Assay For Natural Killer Activity Using Target Cells Labelled With A Fluorescence Enhancing Ligand" Journal of Immunological Methods, 193:199-206, що у всій своїй повноті вводиться в даний опис за допомогою посилання. Коротко, клітини-мішені мітять мембранопроникним ацетоксиметиловим ефіром TDA біс(ацетоксиметил)2,2':6',2”-терпіридин-6-6”-дикарбоксилатом (BATDA), що швидко дифундує через клітинну мембрану життєздатних клітин. Внутрішньоклітинні естерази розщеплюють складноефірні групи, у результаті чого регенерована мембранонепроникна молекула TDA захоплюється усередину клітини. Після інкубування ефекторних клітин і клітин-мішеней, наприклад, щонайменше протягом періоду часу від двох годин до 3,5 години при 37°C в 5 % CO_2, TDA, що вивільняється з лізованих клітин-мішеней, піддають реакції утворення хелатного комплексу з Eu3+, після чого флуоресценцію утворених хелатних комплексів європій-TDA кількісно оцінюють на флуориметрі з часовим розділенням (наприклад, Victor 1420, Perkin Elmer/Wallace).

В іншому конкретному варіанті винаходу аналіз на ADCC, проведений для характеризації молекул відповідно до винаходу, які містять множину епітоп-зв'язувальних сайтів і, необов'язково, Fc-домен (або його частина), включає наступні стадії: переважно 4-5×10^6 клітин-мішеней (наприклад, SK-BR-3, MCF-7, OVCAR3, клітин Raji) мітять біса(ацетоксиметил)2,2':6',2”-терпіридин-6-6”-дикарбоксилатом (реагентом BATDA DELFIA, Perkin Elmer/Wallac). Для досягнення оптимальної ефективності мічення, число клітин-мішеней, використовуваних в аналізі на ADCC переважно не повинно перевищувати 5×10^6. Реагент BATDA додають до клітин, і суміш інкубують при 37 °C переважно в 5 % CO_2, щонайменше протягом 30 хвилин. Потім клітини промивають фізіологічним буфером, наприклад, PBS з 0,125 мМ сульфінпіразолу і середовищем, що містить 0,125 мМ сульфінпіразолу. Після цього мічені клітини-мішені опсонізують (покривають) молекулою відповідно до винаходу, що містить епітоп-зв'язувальний

домен, специфічний до FcγRIIA і, необов'язково Fc-домен (або його частину). У переважних варіантах винаходу молекула, використовувана в аналізі на ADCC, також є специфічною до рецептора клітинної поверхні, до пухлинного антигену або до ракового антигену. Молекула діатіла відповідно до винаходу може специфічно зв'язуватися з будь-яким раковим або пухлинним антигеном, таким як антигени, перераховані в розділі 5.6.1. В аналізі на ADCC клітини-мішені відбирають по епітоп-зв'язувальних сайтах, введених у діатіло відповідно до винаходу, а саме, такі клітини-мішені, у яких рецептор, який присутній на їхній клітинній поверхні, специфічно зв'язується з вказаним діатілом.

Клітини-мішені додають до ефекторних клітин, наприклад, до МКПК, так, щоб відношення ефектор:мішень приблизно складало 1:1, 10:1, 30:1, 50:1, 75:1 або 100:1. Ефекторні клітини і клітини-мішені інкубують щонайменше протягом періоду часу від двох годин до 3,5 години при 37°C в 5 % CO_2. Клітинні супернатанти збирають і додають у кислотний розчин європію (наприклад, у розчин європію DELFIA, Perkin Elmer/Wallac). Флуоресценцію утворених хелатних комплексів "європій-TDA" кількісно оцінюють на флуориметрі з часовим розділенням (наприклад, Victor 1420, Perkin Elmer/Wallace). Максимальне вивільнення (MR) і спонтанне вивільнення (SR) визначають шляхом інкубування клітин-мішеней з 1 % TX-100 і тільки із середовищем, відповідно. Антитіло-незалежну клітинну цитотоксичність (AICC) визначають шляхом інкубування клітин-мішеней і ефекторних клітин під час відсутності тест-молекули, наприклад, діатіла відповідно до винаходу. Кожен аналіз переважно здійснюють із трьома повторностями. Середній відсоток специфічного лізису обчислюють по формулі: Експериментальне вивільнення (ADCC)-AICC)/(MR-SR)×100.

Даний винахід охоплює аналізи, відомі фахівцям і описані в даній заявці, де вказані аналізи здійснюють з метою характеризації зв'язування C1q і опосередкування комплемент-залежної цитотоксичності (CDC) молекулами відповідно до винаходу, що містять Fc-домени (або їхні частини). Для визначення рівня зв'язування з C1q може бути проведений ELISA-аналіз на зв'язування з C1q. Репрезентативний аналіз може включати покриття аналітичних планшетів протягом ночі при 4°C поліпептидом, що містить молекулу відповідно до винаходу, або вихідним поліпептидом (контролем) у буфері для нанесення покрить. Потім планшети можуть бути промиті і блоковані. Після промивання аліквота людського C1q може бути додана в кожну ямку з наступним інкубуванням протягом 2 годин при кімнатній температурі. Після додаткового промивання в кожну ямку може бути додано 100 мкл кон'югованого з пероксидазою овечого антитіла проти комплементу C1q з наступним інкубуванням протягом 1 години при кімнатній температурі. Потім планшет знову може бути промитий промивним буфером, і в кожну ямку може бути доданий 100 мкл буфери для субстрату, що містить OPD (дигідрохлорид о-фенілендіаміну (Sigma)). Реакція окислювання, що спостерігається по появі жовтого забарвлення, може проходити протягом 30 хвилин, а потім вона може бути припинена додаванням 100 мкл 4,5 н. H_2SO_4. Оптична густина може бути обрахована при 492-405 нм.

Для оцінки активації комплементу може бути здійснений аналіз на комплемент-залежну цитотоксичність (CDC), наприклад, як описано в публікації Gazzano-Santoro et al. (1997) "A Non-Radioactive Complement-Dependent Cytotoxicity Assay For Anti-CD20 Monoclonal Antibody" J. Immunol. Methods 202:163-171, що у всій своїй повноті вводиться в даний опис за допомогою посилання. Коротко, різні концентрації молекули, яка містить Fc-домен (варіант) (або його частину) і людський комплемент, можуть бути розведені буфером. Клітини, експресуючі антиген, з яким зв'язується молекула діатіла, можуть бути розведені до щільності приблизно 1×10^6 клітин/мл. Суміші молекул діатіла, що містять Fc-домен (варіант) (або його частину), розведеного людського комплементу і клітин, експресуючих антиген, можуть бути додані в плоскодонний 96-ямковий планшет для культивування тканини, що потім залишають на 2 години при 37°C і 5 % CO_2 для інкубування з метою полегшення лізису клітин, опосередковуваного комплементом. Потім у кожну ямку може бути додано 50 мкл аламарового синього (Accumed International) з наступним інкубуванням протягом ночі при 37 °C. Оптичну густину вимірюють на 96-ямковому флуориметрі при збудженні при довжині хвилі 530 нм і випромінюванні при довжині хвилі 590 нм. Результати можуть бути виражені у відносних одиницях флуоресценції (RFU). Концентрації зразків можуть бути обчислені по стандартній кривій шляхом порівняння активності (відсотків) варіанта, що представляє інтерес, з активністю немодифікованої молекули, тобто молекули, що не містить Fc-домену або містить немодифікований Fc-домен.

5.3.3. Інші аналізи

Молекули відповідно до винаходу, що містять множину епітоп-зв'язувальних доменів і необов'язково Fc-домен, можуть бути проаналізовані за допомогою будь-якого відомого аналізу, проведеного методом поверхневого плазмонного резонансу для характеризації кінетичних

параметрів антигензв'язувального домену або зв'язування Fc-FcγR. Таким комерційно доступним обладнанням, яке може бути використане в даному винаході для проведення ППР-аналіза, є, але не обмежується ними, обладнання для BIAcore AB, що поставляється Biacore AB (Uppsala, Sweden); обладнання для IAsys, що поставляється Affinity Sensors (Franklin, MA.); система IBIS, що поставляється Windsor Scientific Limited (Berks, UK), системи SPR-CELLIA, що поставляються Nippon Laser і Electronics Lab (Hokkaido, Japan), і детектор для ППР (SPR) Detector Spreeta, що поставляється Texas Instruments (Dallas, TX). Опис ППР-технології можна знайти в публікаціях Mullet et al. (2000) "Surface Plasmon Resonance-Based Immunoassays" Methods 22:77-91; Dong et al. (2002) "Some new aspects in biosensors" Reviews in Mol. Biotech. 82:303-23; Fivash et al. (1998) "BIAcore For Macromolecular Interaction" Current Opinion in Biotechnology 9:97-101; Rich et al. (2000) "Advances In Surface Plasmon Resonance Biosensor Analysis" Current Opinion in Biotechnology 11:54-61; кожна з який у всій своїй повноті вводиться в даний опис за допомогою посилання. Крім того, у способах відповідно до винаходу розглядається будь-яке обладнання для ППР і будь-які методи ППР для оцінки білок-білкових взаємодій, описані в патентах США №№ 6373577; 6289286; 5322798; 5341215; 6268125, що у всій своїй повноті вводяться в даний опис за допомогою посилання.

Коротко, ППР-аналізи включають іммобілізацію члена зв'язувальної пари на поверхні і моніторинг їхньої взаємодії з іншим членом зв'язувальної пари в розчині в реальному часі. ППР-аналіз оснований на вимірюванні зміни коефіцієнта переломлення розчинника, що знаходиться біля поверхні, що формується після утворення або дисоціації комплексу. Поверхня, на якій відбувається іммобілізація, являє собою сенсорний чип, що є головним атрибутом ППР-технології, і цей чип складається зі скляної поверхні, покритої тонким шаром золота, і є основою для ряду поверхонь, спеціально сконструйованих для оптимізації зв'язування молекули з поверхнею. У продажу є ряд сенсорних чипів, які спеціально поставляються компаніями, перерахованими вище, і всі ці чипи можуть бути використані в способах відповідно до винаходу. Прикладами сенсорних чипів є чипи, що поставляються компаніями BIAcore AB, Inc., наприклад, сенсорні чипи CM5, SA, NTA і HPA. Молекула відповідно до винаходу може бути іммобілізована на поверхні сенсорного чипа будь-якими відомими методами іммобілізації і хімічних методів, включаючи, але не обмежуючись ними, пряме ковалентне зв'язування за допомогою аміногруп, пряме ковалентне зв'язування за допомогою сульфгідрильних груп, приєднання біотину до покритої авідином поверхні, зв'язування альдегідних груп з вуглеводними групами і приєднання за допомогою гістидинової мітки до чипів NTA.

У деяких варіантах винаходу кінетичні параметри зв'язування молекул відповідно до винаходу, що містять множину епітоп-зв'язувальних сайтів і необов'язково Fc-домен, з антигеном або FcγR можуть бути визначені на обладнанні BIAcore (наприклад, на обладнанні BIAcore 1000, BIAcore Inc., Piscataway, NJ). Як обговорюється вище в розділі 5.4.1, для аналізу на зв'язування молекул відповідно до винаходу може бути використаний будь-який FcγR, де щонайменше один епітоп-зв'язувальний сайт молекули діатіла імуноспецифічно розпізнає FcγR, і/або де вказана молекула діатіла містить Fc-домен (або його частину). У конкретному варіанті винаходу FcγR являє собою FcγRIIIA, переважно розчинний мономерний FcγRIIIA. Так, наприклад, в одному з варіантів винаходу розчинний мономерний FcγRIIIA являє собою позаклітинну ділянку FcγRIIIA, зв'язану з лінкером-послідовністю AVITAG (див. попередню заявку на патент США № 60/439498, подану 9 січня 2003 р., і попередню заявку на патент США № 60/456041, подану 19 березня 2003 р., що у всій своїй повноті вводяться в даний опис за допомогою посилання). В іншому конкретному варіанті винаходу FcγR являє собою FcγRIIB, переважно розчинний димерний FcγRIIB. Так, наприклад, в одному з варіантів винаходу розчинний димерний FcγRIIB одержують методами, описаними в попередній заявці на патент США № 60/439709, поданої 13 січня 2003 р., що у всій своїй повноті вводиться в даний опис за допомогою посилання.

У всіх імунологічних аналізах розпізнавання FcγR/зв'язування з FcγR за допомогою молекули відповідно до винаходу може бути здійснене з використанням множини доменів, а саме, у деяких варіантах винаходу молекули відповідно до винаходу імуноспецифічно розпізнають FcγR за допомогою одного з множини епітоп-зв'язувальних доменів; в інших варіантах винаходу, у яких молекула відповідно до винаходу містить Fc-домен (або його частину), молекула діатіла може імуноспецифічно розпізнавати FcγR за допомогою взаємодій Fc-FcγR; а в інших варіантах винаходу, у яких молекула відповідно до винаходу містить Fc-домен (або його частину) і епітоп-зв'язувальний сайт, що імуноспецифічно розпізнає FcγR, молекула діатіла може розпізнавати FcγR за допомогою одного або обох епітоп-зв'язувальних доменів і Fc-доменів (або їх частини). Репрезентативний аналіз для визначення кінетичних параметрів зв'язування молекули, що містить множину епітоп-зв'язувальних доменів і

необов'язково Fc-домен (або його частину), з антигеном і/або з FcγR на обладнанні BIAcore включає наступну процедуру: перший антиген іммобілізують на одній з чотирьох протокових кювет поверхні сенсорного чипа, переважно з застосуванням хімічного методу зв'язування з аміном так, щоб приблизно 5000 одиниць відгуку (RU) вказаного першого антигену іммобілізувалось на поверхні. Після приготування придатної поверхні, молекули відповідно до винаходу, що імуноспецифічно розпізнають вказаний перший антиген, пропускають по всій поверхні, переважно, шляхом 1-хвилинного упорскування 20 мкг/мл розчину в протокову кювету ємністю 5 мкл/мл. На цій стадії рівні зв'язування молекул відповідно до винаходу з поверхнею звичайно становлять у межах від 400 до 700 RU. Потім серії розведень другого антигену (наприклад, FcγR) або рецептора FcγR у буфері HBS-P (20 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 3 мМ EDTA, pH 7,5) наносять на поверхню шляхом упорскування зі швидкістю 100 мкл/хв. Регенерацію молекул між розведеннями іншого другого антигену або рецептора здійснюють переважно шляхом разових 5-секундних упорскувань 100 мМ $NaHCO_3$, pH 9,4; 3М NaCl. У способі відповідно до винаходу розглядається будь-який відомий метод регенерації.

Після збору всіх даних будували результуючі загальні криві зв'язування з використанням комп'ютерних алгоритмів, що поставляються виробниками до обладнання для ППР, наприклад, BIAcore, Inc. (Piscataway, NJ). Ці алгоритми дозволяють обчислювати K_{on} і K_{off}, з яких була виведена удавана константа рівноважного зв'язування k_d, що виражається як відношення двох констант швидкості (тобто, K_{off}/K_{on}). Більш докладний опис обчислення окремих констант швидкості можна знайти в довідковому посібнику BIAevaluaion Software Handbook (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ). Аналіз отриманих даних може бути проведений будь-яким відомим методом. Опис різних методів інтерпретації отриманих кінетичних даних можна знайти в публікаціях Myszka (1997) "Kinetic Analysis Of Macromolecular Interactions Using Surface Plasmon Resonance Biosensors" Current Opinion in Biotechnology 8:50-7; Fisher et al. (1994) "Surface Plasmon Resonance Based Methods For Measuring The Kinetics And Binding Affinities Of Biomolecular Interactions" Current Opinion in Biotechnology 5:389-95; O'Shannessy (1994) "Determination Of Kinetic Rate And Equilibrium Binding Constants For Macromolecular Interactions: A Critique Of The Surface Plasmon Resonance Literature" Current Opinion in Biotechnology, 5:65-71; Chaiken et al. (1992) "Analysis Of Macromolecular Interactions Using Immobilized Ligands" Analytical Biochemistry, 201:197-210; Morton et al. (1995) "Interpreting Complex Binding Kinetics From Optical Biosensors: A Comparison Of Analysis By Linearization, The Integrated Rate Equation, And Numerical Integration" Analytical Biochemistry 227:176-85; O'Shannessy et al., 1996, Analytical Biochemistry 236:275-83; які у всій своїй повноті вводяться в даний опис за допомогою посилання.

У переважних варіантах винаходу кінетичні параметри, отримані за допомогою ППР-аналіза, наприклад, BIAcore, можуть бути використані як прогнозованої оцінки функції молекули відповідно до винаходу у функціональному аналізі, наприклад, в аналізі на ADCC. Репрезентативний метод прогнозування ефективності молекули відповідно до винаходу виходячи з кінетичних параметрів, отриманих за допомогою ППР-аналіза, може включати: визначення величин K_{off} для зв'язування молекули відповідно до винаходу з FcγRIIIA і FcγRIIB (за допомогою епітоп-зв'язувальний домену і/або Fc-домену (або його частини); побудова графіка залежності даних (1) K_{off}(дикого типу)/K_{off} (з мутацією) для FcγRIIIA; (2) K_{off}(дикого типу)/K_{off} (з мутацією) для FcγRIIB від даних по ADCC. Значення більше одиниці вказують на зниження швидкості дисоціації для FcγRIIIA і збільшення швидкості дисоціації для FcγRIIB у порівнянні з молекулами дикого типу, і на наявність у них ADCC-функції і на підвищену ADCC-функцію.

5.4. Способи одержання молекул діатіл відповідно до винаходу

Молекули діатіл відповідно до винаходу можуть бути отримані різними добре відомими методами, включаючи синтез білка de novo і рекомбінантну експресію нуклеїнових кислот, що кодують зв'язувальні білки. Потрібні послідовності нуклеїнової кислоти можуть бути отримані рекомбінантними методами (наприклад, шляхом ПЛР-мутагенезу отриманого раніше варіанта потрібного полінуклеотиду) або твердофазним методом синтезу ДНК. При цьому найчастіше застосовуються рекомбінантні методи експресії. В одному зі своїх аспектів даний винахід стосується полінуклеотиду, що містить послідовність, яка кодує VH і/або VL анти-CD16A антитіла, а в іншому своєму аспекті даний винахід стосується полінуклеотиду, що містить послідовність, яка кодує VH і/або VL анти-CD32B антитіла. Через виродженість генетичний код різні послідовності нуклеїнової кислоти кодують кожну амінокислотну послідовність імуноглобуліну, і даний винахід включає всі нуклеїнові кислоти, що кодують описані тут зв'язувальні білки.

5.4.1. Полінуклеотиди, які кодують молекули відповідно до винаходу

Даний винахід також включає полінуклеотиди, які кодують молекули відповідно до винаходу, включаючи поліпептиди й антитіла. Можуть бути отримані полінуклеотиди, які кодують молекули відповідно до винаходу, і нуклеотидні послідовності цих полінуклеотидів можуть бути визначені будь-якими відомими методами.

Після визначення нуклеотидної послідовності молекул, ідентифікованих способами відповідно до винаходу, ця нуклеотидна послідовність може бути модифікована відомими методами, наприклад, методами рекомбінантних ДНК, сайт-направленого мутагенезу, ПЛР і т. п. (див., наприклад, методи, описані в посібнику Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; і в посібнику Ausubel et al, eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY, що у всій своїй повноті вводяться в даний опис за допомогою посилання), з метою продукування, наприклад, антитіл, що мають різні амінокислотні послідовності, наприклад, шляхом введення амінокислотних замін, делецій і/або інсерцій.

В одному з варіантів винаходу людські або бібліотеки будь-які інші бібліотеки, відомі фахівцям, можуть бути скриновані відомими стандартними методами для клонування нуклеїнових кислот, що кодують молекули відповідно до винаходу.

5.4.2. Рекомбінантна експресія молекул відповідно до винаходу

Після одержання послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує молекули відповідно до винаходу (тобто, антитіла), може бути отриманий вектор для продукування молекул із застосуванням техніки рекомбінантних ДНК добре відомими методами. Такі добре відомі методи можуть бути застосовані для конструювання експресійних векторів, що містять послідовності, які кодують молекули відповідно до винаходу, і відповідні сигнали регуляції транскрипції і трансляції. Такими методами є, наприклад, техніка рекомбінантних ДНК in vitro, методи синтезу і методи генетичної рекомбінації in vivo. (Див., наприклад, методи, описані Sambrook et al., 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY і Ausubel et al. eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY).

Експресійний вектор, що містить нуклеотидну послідовність молекули, ідентифікованої способами відповідно до винаходу, може бути перенесений у клітину-хазяїна стандартними методами (наприклад, шляхом електропорації, ліпосомної трансфекції і преципітації фосфатом кальцію), а потім трансфіковані клітини можуть бути культивовані стандартними методами з одержанням молекул відповідно до винаходу. У конкретних варіантах винаходу експресія молекул відповідно до винаходу регулюється конститутивним, індуцибельним або тканиноспецифічним промотором.

Клітини-хазяїни, використовувані для експресії молекул, ідентифікованих способами відповідно до винаходу, можуть являти собою бактеріальні клітини, такі як Escherichia coli, або переважно еукаріотичні клітини, зокрема, клітини, що підходять для експресії повнорозмірної рекомбінантної молекули імуноглобуліну. Зокрема, клітини ссавців, такі як клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO), у комбінації з вектором, таким як елемент промотору головного передраннього гена людського цитомегаловіруса, являють собою ефективну систему експресії імуноглобулінів (Foecking et al. (1986) "Powerful And Versatile Enhancer-Promoter Unit For Mammalian Expression Vectors" Gene 45:101-106; Cockett et al. (1990) "High Level Expression Of Tissue Inhibitor Of Metalloproteinases In Chinese Hamster Ovary Cells Using Glutamine Synthetase Gene Amplification" Biotechnology 8:662-667).

Для експресії молекул, ідентифікованих способами відповідно до винаходу, може бути застосований ряд експресійних векторних систем хазяїнів. Такі експресійні системи хазяїнів являють собою носії, за допомогою яких можуть бути продуковані, а потім очищені послідовності, які кодують молекули відповідно до винаходу, а також клітини, що, після їхньої трансформації або трансфекції відповідними нуклеотидними кодуючими послідовностями, можуть експресувати молекули відповідно до винаходу in situ. Такими системами є, але не обмежуються ними, мікроорганізми, такі як бактерії (наприклад, E. coli і B. subtilis), трансформовані векторами, які експресують рекомбінантну ДНК бактеріофага, плазмідну ДНК або космідну ДНК і містять послідовності, які кодують молекули, ідентифіковані способами відповідно до винаходу; дріжджі (наприклад, Saccharomyces pichia), трансформовані рекомбінантними дріжджовими експресійними векторами, що містять послідовності, які кодують молекули, ідентифіковані способами відповідно до винаходу; системи клітин комах, інфіковані рекомбінантними вірусними експресійними векторами (наприклад, бакуловірусними векторами), що містять послідовності, які кодують молекули, ідентифіковані способами відповідно до винаходу; системи клітин рослин, інфіковані рекомбінантними вірусними експресійними векторами (наприклад, вірусом мозаїки кольорової капусти (CaMV) і вірусом мозаїки тютюну

(TMV) або трансформовані рекомбінантними плазмідними експресійними векторами (наприклад, плазмідою Ti), що містять послідовності, які кодують молекули, ідентифіковані способами відповідно до винаходу; або системи клітин ссавців (наприклад, клітин COS, CHO, BHK, 293, 293T, 3T3, лімфатичних клітин (див. патент США 5807715), клітин Per C.6 (людських клітин сітківки, отриманих Crucell)), що містять рекомбінантні експресійні конструкції, що включають промотори, які походять від генома клітин ссавців (наприклад, промотор металотіонеїну) або від вірусів ссавців (наприклад, пізнього промотору аденовірусу; промотору 7.5K вірусу коров'ячої віспи).

У бактеріальних системах ряд експресійних векторів може бути переважно вибраний залежно від мети застосування експресованих молекул. Так, наприклад, при продукуванні великої кількості такого білка, необхідного для одержання фармацевтичних композицій антитіла, можуть виявитися бажаними вектори, що регулюють експресію високих рівнів продуктів злитого білка, які легко піддаються очищенню. Такими векторами є, але не обмежуються ними, експресійний вектор pUR278 (Ruther et al. (1983) "Easy Identification Of cDNA Clones" EMBO J. 2:1791-1794), у якому антитілокодуюча послідовність може бути окремо лігована у вектор у рамці зчитування кодуючої ділянки lac Z з одержанням злитого білка; вектори pIN (Inouye et al. (1985) "Up-Promoter Mutations In The Ipp Gene Of Escherichia Coli" Nucleic Acids Res. 13:3101-3110; Van Heeke et al. (1989) "Expression Of Human Asparagine Synthetase In Escherichia Coli" J. Biol. Chem. 24:5503-5509); і т. п. Вектори pGEX можуть бути також використані для експресії чужорідних поліпептидів у вигляді злитих білків із глутатіон-S-трансферазою (GST). Узагалі говорячи, такі злиті білки є розчинними і можуть бути легко виділені з лізованих клітин за допомогою адсорбції і зв'язування зі сферами-матрицями, що містять глутатіон-агарозу, з наступним елююванням у присутності вільного глутатіону. Вектори pGEX були сконструйовані так, щоб вони включали сайти розщеплення тромбіном або протеазою фактора Xa, і щоб клонований продукт гена-мішені міг вивільнятися з молекули GST.

У системі комах вірус ядерного поліедрозу Autographa californica (AcNPV) використовується як вектор для експресії чужорідних генів. Цей вірус розмножується в клітинах Spodoptera frugiperda. Антитілокодуюча послідовність може бути клонована окремо в не головні ділянки (наприклад, гена поліедрину) вірусу і може знаходитися під контролем промотору AcNPV (наприклад, промотору поліедрину).

У клітинах-хазяях ссавців може бути застосований ряд вірусних експресійних систем. У тих випадках, коли як експресійний вектор використовується аденовірус, то антитілокодуюча послідовність, що представляє інтерес, може бути комплексом з аденовірусним комплексом регуляції транскрипції/трансляції, наприклад, з пізнім промотором і з трикомпонентною лідерною послідовністю. Цей химерний ген може бути потім убудований в аденовірусний геном за допомогою рекомбінації in vitro або in vivo. Інсерція в не-головну ділянку вірусного генома (наприклад, в ділянці E1 або E3) дозволить одержати рекомбінантний вірус, що є життєздатним і має здатність експресувати молекулу імуноглобуліну в інфікованих хазяїнів (див., наприклад, Logan et al. (1984) "Adenovirus Tripartite Leader Sequence Enhances Translation Of mRNAs Late After Infection" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655-3659). Специфічні сигнали ініціації можуть також знадобитися для ефективної трансляції убудованих антитілокодуючих послідовностей. Такі сигнали включають кодон ініціації ATG і суміжні послідовності. Крім того, кодон ініціації повинний знаходитися в одній рамці зчитування з потрібною кодуючою послідовністю для гарантії трансляції усієї вставки. Такі екзогенні сигнали регуляції трансляції і кодони ініціації трансляції можуть походити від різних видів, як природних, так і синтетичних. Ефективність експресії може бути підвищена завдяки включенню відповідних елементів, а саме, енхансерів транскрипції, термінаторів транскрипції і т. п. (див. Bitter et al. (1987) "Expression And Secretion Vectors For Yeast" Methods in Enzymol. 153:516-544).

Крім того, може бути вибраний штам клітини-хазяїна, який модулює експресію убудованих послідовностей або модифікує генний продукт і сприяє процесингу генного продукту по конкретному бажаному механізмі. Такі модифікації (наприклад, глікозилування) і процесинг (наприклад, відщеплення) білкових продуктів можуть відігравати важливу роль у функціонуванні білка. Так, наприклад, у деяких варіантах винаходу поліпептиди, що містять молекулу діатіла відповідно до винаходу, можуть експресуватися у вигляді одного генного продукту (наприклад, у вигляді одного поліпептидного ланцюга, тобто поліпротеїнового попередника) у результаті протеолітичного розщеплення по природному або рекомбінантному механізму з утворенням окремих поліпептидів молекул діатіл відповідно до винаходу. Даний винахід охоплює конструювання послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує молекулу поліпротеїнового попередника, що містить поліпептиди відповідно до винаходу, і яка включає кодуючі послідовності, здатні регулювати посттрансляційне відщеплення вказаного поліпротеїнового

попередника. Посттрансляційне відщеплення поліпротеїнового попередника приводить до утворення поліпептидів відповідно до винаходу. Посттрансляційне відщеплення молекули-попередника, що містить поліпептиди відповідно до винаходу, може відбуватися in vivo (тобто, у клітинах-хазяях під дією природних або рекомбінантних клітинних систем/механізмів, наприклад, розщеплення фурином у відповідному сайті), або воно може відбуватися in vitro (наприклад, при інкубуванні вказаного поліпептидного ланцюга в композиції, що містить протеази або пептидази з відомою активністю і/або в композиції, що містить середовища або реагенти, що, як відомо, надають потрібну протеолітичну дію). Очищення і модифікацію рекомбінантних білків, добре відому фахівцям, здійснюють так, щоб конструкція поліпротеїнового попередника включала ряд варіантів, що можуть бути легко визначені фахівцем-практиком. Для внесення описаних модифікацій молекули-попередника можуть бути використані будь-які відомі протеази або пептидази, наприклад, тромбін (який розпізнає амінокислотну послідовність LVPR^GS (SEQ ID NO: 89)) або фактор Xa (який розпізнає амінокислотну послідовність I(E/D)GR^ (SEQ ID NO: 90) (Nagai et al. (1985) "Oxygen Binding Properties Of Human Mutant Hemoglobins Synthesized In Escherichia Coli" Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82:7252-7255, і ферменти, описані в публікаціях Jenny et al. (2003) "A Critical Review Of The Methods For Cleavage Of Fusion Proteins With Thrombin And Factor Xa" Protein Expr. Purif. 31: 1-11, кожна з який у всій своїй повноті вводиться в даний опис за допомогою посилання)), ентерокіназа (яка розпізнає амінокислотну послідовність DDDDK^ (SEQ ID NO: 91) (Collins-Racie et al. (1995) "Production Of Recombinant Bovine Enterokinase Catalytic Subunit In Escherichia Coli Using The Novel Secretory Fusion Partner Dsb" Biotechnology 13:982-987; вказана публікація у всій своїй повноті вводиться в даний опис за допомогою посилання)), фурин (який розпізнає амінокислотну послідовність RXXR^, переважно RX(K/R)R^ (SEQ ID NO: 92 і SEQ ID NO: 93, відповідно) (додатковий R у положенні P6, ймовірно, підвищує ефективність розщеплення)), і AcTEV (який розпізнає амінокислотну послідовність ENLYFQ^G (SEQ ID NO: 94) (Parks et al. (1994) "Release Of Proteins And Peptides From Fusion Proteins Using A Recombinant Plant Virus Proteinase" Anal. Biochem. 216:413-417; вказана публікація у всій своїй повноті вводиться в даний опис за допомогою посилання)) і протеаза C3 вірусу ящуру. Див., наприклад, вище, розділ 6.4.

Різні клітини-хазяїни мають характеристичні і специфічні механізми здійснення посттрансляційного процесингу і модифікації білків і генних продуктів. Відповідні клітинні лінії або системи хазяїнів можуть бути відповідним чином відібрані для гарантії "правильної" модифікації і "правильного" процесингу експресованого чужорідного білка. Для досягнення цієї мети можуть бути використані еукаріотичні клітини-хазяїни, що мають клітинний механізм "правильного" процесингу первинного транскрипта, глікозилування і фосфорилування генного продукту. Такими клітинами-хазяїнами ссавців є, але не обмежуються ними, клітини CHO, VERY, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 293T, 3T3, WI38, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 і T47D, CRL7030 і Hs578Bst.

Для тривалого і високоефективного продукування рекомбінантних білків переважно повинна досягатися стабільна експресія. Так, наприклад, можуть бути сконструйовані клітинні лінії, стабільно експресуючі антитіло відповідно до винаходу. Замість використання експресійних векторів, що містять вірусні оріджини реплікації, найкраще використовувати клітини-хазяїни, трансформовані ДНК під контролем відповідних елементів регуляції експресії (наприклад, промотору, енхансера, послідовностей термінації транскрипції, сайтів поліаденілування і т. п.) і селективного маркера. Після введення чужорідної ДНК, сконструйовані клітини можуть бути культивовані протягом 1-2 днів у збагаченому середовищі, а потім це середовище може бути замінене селективним середовищем. Селективний маркер у рекомбінантній плазміді надає резистентність до відбору і дозволяє клітинам стабільно інтегрувати плазміду у свої хромосоми, а також рости з утворенням вогнищ, що, у свою чергу, можуть бути клоновані і розмножені з одержанням клітинних ліній. Цей метод переважно використовується для конструювання клітинних ліній, експресуючих антитіла відповідно до винаходу. Такі сконструйовані клітинні лінії можуть бути, зокрема, використані для скринінгу й оцінки сполук, які прямо або опосередковано взаємодіють з молекулами відповідно до винаходу.

Може бути використаний ряд систем відбору, включаючи, але не обмежуючись ними, гени тимідин-кінази вірусу простого герпесу (Wigler et al. (1977) "Transfer Of Purified Herpes Virus Thymidine Kinase Gene To Cultured Mouse Cells" Cell 11: 223-232), гіпоксантин-гуанін-фосфорибозилтрансферази (Szybalska et al. (1992) "Use Of The HPRT Gene And The HAT Selection Technique In DNA-Mediated Transformation Of Mammalian Cells: First Steps Toward Developing Hybridoma Techniques And Gene Therapy" Bioessays 14:495-500), і аденін-фосфорибозилтрансферази (Lowy et al. (1980) "Isolation Of Transforming DNA: Cloning The

Hamster aprt Gene" Cell 22:817-823), які можуть бути використані в tk-, hgprt- або aprt-клітинах, відповідно. Крім того, резистентність до антиметаболітів може бути основою для відбору на наступні гени: dhfr, що надає резистентність до метотрексату (Wigler et al. (1980) "Transformation Of Mammalian Cells With An Amplifiable Dominant-Acting Gene" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:3567-3570; O'Hare et al. (1981) "Transformation Of Mouse Fibroblasts To Methotrexate Resistance By A Recombinant Plasmid Expressing A Prokaryotic Dihydrofolate Reductase" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527-1531); gpt, що надає резистентність до мікофенолової кислоти (Mulligan et al. (1981) "Selection For Animal Cells That Express The Escherichia coli Gene Coding For Xanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072-2076); neo, що надає резистентність до аміноглікозиду G-418 (Tolstoshev (1993) "Gene Therapy, Concepts, Current Trials And Future Directions" Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan (1993) "The Basic Science Of Gene Therapy" Science 260:926-932; і Morgan et al. (1993) "Human Gene Therapy" Ann. Rev. Biochem. 62:191-217), і hygro, що надає резистентність до гігроміцину (Santerre et al. (1984) "Expression Of Prokaryotic Genes For Hygromycin B And G418 Resistance As Dominant-Selection Markers In Mouse L Cells" Gene 30:147-156). Можуть бути застосовані методи, добре відомі фахівцям в галузі техніки рекомбінантних ДНК і описані в публікаціях Ausubel et al. (eds.), 1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, Gene Transfer і Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY; і Chapters 12 і 13, Dracopoli et al. (eds), 1994, Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY.; Colberre-Garapin et al. (1981) "A New Dominant Hybrid Selective Marker For Higher Eukaryotic Cells" J. Mol. Biol. 150:1-14.

Рівні експресії молекули відповідно до винаходу можуть бути підвищені за допомогою ампліфікації вектора (опис цього методу можна знайти в публікації Bebbington і Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning. Vol. 3 (Academic Press, New York, 1987). Якщо маркер у векторній системі, яка експресує антитіло, є ампліфікованим, то підвищення рівня інгібітору, який присутній у культурі клітин-хазяїнів, буде супроводжуватися збільшенням числа копій маркерного гена. Оскільки ампліфікована ділянка асоціюється з нуклеотидною послідовністю поліпептиду молекули діатіла, то в цьому випадку буде також спостерігатися підвищення рівня продукування вказаного поліпептиду (Crouse et al. (1983) "Expression And Amplification Of Engineered Mouse Dihydrofolate Reductase Minigenes" Mol. Cell. Biol. 3:257-266).

Клітина-хазяїн може бути котрансфікована двома експресійними векторами відповідно до винаходу, тобто першим вектором, що кодує перший поліпептид молекули діатіла, і другим вектором, що кодує другий поліпептид молекули діатіла. Ці два вектори можуть містити ідентичні селективні маркери, що в однаковій мірі експресують обидва поліпептиди. Альтернативно, може бути використаний один вектор, що кодує обидва поліпептиди. Послідовності, які кодують поліпептиди молекул відповідно до винаходу, можуть містити кДНК або геномну ДНК.

Після рекомбінантної експресії молекули відповідно до винаходу (тобто, діатіл), вона може бути очищена будь-яким методом, відомим фахівцям в галузі очищення поліпептидів, поліпротеїнів або діатіл (наприклад, за схемою, аналогічною схемі очищення антитіл на основі селективності до антигену), наприклад, за допомогою хроматографії (наприклад, іонообмінної хроматографії, афінної хроматографії, зокрема, на колонці, яка має афінність відносно специфічного антигену (необов'язково після відбору на білку А, де молекула діатіла містить Fc-домен (або його частину)), і ексклюзійної колонкової хроматографії), центрифугування, методом диференціальної розчинності або будь-яким іншим стандартним методом очищення поліпептидів, поліпротеїнів або діатіл.

5.5. Методи профілактики і терапії

Молекули відповідно до винаходу є особливо придатними для лікування і/або попередження захворювання, розладу або інфекції, де бажаною є функція ефекторних клітин (наприклад, ADCC), опосередковувана FcγR (наприклад, у випадку раку й інфекційного захворювання). Як обговорювалося вище, діатіла відповідно до винаходу можуть мати антитілоподібні функціональні властивості, якіолягають у вироблянні ефекторної функції, хоча така молекула антитіла не містить Fc-домену. Молекула діатіла, завдяки тому, що вона містить щонайменше один епітоп-зв'язувальний домен, який імуноспецифічно розпізнає FcγR, може мати FcγR-зв'язувальні властивості й активність, аналогічні таким властивостям, як взаємодія Fc-FcγR. Так, наприклад, молекули відповідно до винаходу можуть зв'язуватися з антигеном клітинної поверхні і FcγR (наприклад, FcγRIIIA) на імунній ефекторній клітині (наприклад, на NK-клітині), тим самим, стимулюючи ефекторну функцію (наприклад, ADCC, CDC, фагоцитоз, опсонізацію і т. п.), спрямовану проти вказаної клітини.

В інших варіантах винаходу молекула діатіла відповідно до винаходу містить Fc-домен (або його частину). У таких варіантах Fc-домен може також мати щонайменше одну амінокислотну модифікацію в порівнянні з Fc-доменом дикого типу (або його частиною), і/або він може містити домени, які походять від IgG одного або більше ізотипів (наприклад, IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4). Молекули відповідно до винаходу, що містять варіанти Fc-доменів, можуть мати надані або змінені фенотипи, у порівнянні з молекулами, що містять Fc-домен дикого типу, такі як надана або змінена активність, а саме, ефекторна функція (наприклад, як може бути проаналізовано в аналізі з використанням NK-клітин або макрофагів). У вказаних варіантах винаходу молекули відповідно до винаходу з наданою або зміненою ефекторною функцією можуть бути використані для лікування і/або попередження захворювання, розладу або інфекції, при яких бажано підвищити ефективність ефекторної функції. У деяких варіантах винаходу молекули діатіла відповідно до винаходу, що містять Fc-домен (або його частину), опосередковують каскад комплемент-залежних реакцій. Варіанти Fc-доменів, ідентифіковані по зміні ефекторної функції, описані в міжнародній заявці WO04/063351, у публікаціях заявок на патент США 2005/0037000 і 2005/0064514, у попередній заявці на патент США 60/626510, поданої 10 листопада 2004 р., у попередній заявці на патент США 60/636663, поданої 15 грудня 2004 р., і в попередній заявці на патент США 60/781564, поданої 10 березня 2006 р., а також у заявках на патент США 11/271140, поданої 10 листопада 2005 р., і 11/305787, поданої 15 грудня 2005 р., і в одночасно поданих заявках авторів винаходу, що у всій своїй повноті вводяться в даний опис за допомогою посилання.

Даний винахід охоплює способи і композиції, застосовувані для лікування, попередження або терапії раку в індивідуума, де вказані способи включають введення індивідууму терапевтично ефективної кількості однієї або більше молекул, що містять один або більше епітоп-зв'язувальних сайтів і необов'язково Fc-домен (або його частину), сконструйовані відповідно до даного винаходу, де вказана молекула також зв'язується з раковим антигеном. Молекули відповідно до винаходу є особливо придатними для попередження, інгібування, зниження росту або регресії первинних пухлин, метастазів ракових клітин і поширення інфекційних захворювань. Не обмежуючи описом якого-небудь конкретного механізму дії, автори лише відзначають, що молекули відповідно до винаходу опосередковують ефекторну функцію, що приводить до знищення пухлини, зменшення пухлини або того й іншого. В альтернативних варіантах винаходу діатіла відповідно до винаходу опосередковують терапевтичну активність за допомогою перехресного зв'язування антигенів і/або рецепторів клітинної поверхні і посилення апоптозу або передачі сигналів придушення росту пухлини.

Не обмежуючи описом якого-небудь конкретного механізму дії, автори лише відзначають, що молекули діатіл відповідно до винаходу мають підвищену терапевтичну активність в порівнянні з відомими терапевтичними антитілами, що, зокрема, зумовлено здатністю діатіла імуноспецифічно зв'язуватися з клітиною-мішенню, що, у результаті такого зв'язування, буде експресувати конкретний антиген (наприклад, FcγR) на більш низьких рівнях, наприклад, завдяки здатності цього діатіла зберігатися на клітині-мішені протягом більш тривалого періоду часу через підвищену авідність взаємодії "діатіло-епітоп".

Діатіла відповідно до винаходу з підвищеною афінністю й авідністю до антигенів (наприклад, до FcγR) є особливо придатними для лікування, попередження або терапії раку або іншого захворювання або розладу в індивідуума, де FcγR експресується в популяції клітин-мішеней на низькому рівні. Використовуваний тут термін "експресія FcγR у клітинах" визначена як щільність таких молекул на клітину, де вказана щільність може бути виміряна відомими стандартними методами. Молекули відповідно до винаходу, що містять множину епітоп-зв'язувальних сайтів і необов'язково FcγR (або його частину), переважно мають надану або підвищену авідність й афінність і/або ефекторні функції в клітинах, що експресують антиген-мішень, наприклад, раковий антиген, при щільності 30000-20000 молекул/клітину, при щільності 20000-10000 молекул/клітину, при щільності 10000 молекул/клітину або менше, при щільності 5000 молекул/клітину або менше, або при щільності 1000 молекул/клітину або менше. Молекули відповідно до винаходу є особливо придатними для лікування, попередження або терапії захворювання або розладу, такого як рак, у субпопуляції ракових клітин, де антиген-мішень експресується в популяції клітин-мішеней на низькому рівні.

Молекули відповідно до винаходу можуть також переважно використовуватися в комбінації з іншими відомими терапевтичними агентами для лікування або попередження захворювань, таких як рак, аутоімунне захворювання, запальні розлади й інфекційні захворювання. У конкретному варіанті винаходу молекули відповідно до винаходу можуть бути використані в комбінації з моноклональними або химерними антитілами, лімфокінами або гемопоетичними факторами росту (наприклад, такими як IL-2, IL-3 і IL-7), що, наприклад, служать для збільшення

числа або підвищення активності ефекторних клітин, які взаємодіють із вказаними молекулами, що приводить до підвищення імунної відповіді. Молекули відповідно до винаходу можуть бути також переважно використані в комбінації з одним або більше лікарськими засобами, застосовуваними для лікування захворювання, розладу або інфекції, такими як, наприклад, протиракові засоби, протизапальні засоби або противірусні засоби, наприклад, докладно описані в розділі 5.7.

5.5.1. Ракові захворювання

Даний винахід охоплює способи і композиції, застосовувані для лікування або попередження раку в індивідуума, де вказані способи включають введення індивідууму терапевтично ефективної кількості однієї або більше молекул, що містять множину епітоп-зв'язувальних доменів. У деяких варіантах винаходу даний винахід охоплює способи і композиції, застосовувані для лікування або попередження раку в індивідуума, у якого спостерігається поліморфізм FcγR, наприклад, гомозиготність по алелях FcγRIIIA-158V або FcγRIIIA-158F. У деяких своїх варіантах даний винахід охоплює конструювання щонайменше одного епітоп-зв'язувальний домену молекули діатіла, імуноспецифічно зв'язується з FcγRIIIA (158F). У деяких своїх варіантах даний винахід охоплює конструювання щонайменше одного епітоп-зв'язувального домену молекули діатіла, що імуноспецифічно зв'язується з FcγRIIIA (158V).

Ефективність стандартної терапії моноклональними антитілами залежить від FcγR-поліморфізму в даного індивідуума (Cartron et al. (2002) "Therapeutic Activity Of Humanized Anti-CD20 Monoclonal Antibody And Polymorphism In Ig Fc Receptor FcRIIIa Gene" Blood 99:754-758; Weng et al. (2003) "Two Immunoglobulin G Fragment C Receptor Polymorphisms Independently Predict Response To Rituximab In Patients With Follicular Lymphoma" J. Clin. Oncol. 21(21):3940-3947, вказані публікації у всій своїй повноті вводяться в даний опис за допомогою посилання). Ці рецептори експресуються на поверхні ефекторних клітин і опосередковують ADCC. Алелі високої афінності генів активуючих рецепторів з низькою афінністю підвищують здатність ефекторних клітин опосередковувати ADCC. На відміну від способів досягнення Fc-FcγR-взаємодій, що здійснюють ефекторну функцію, способи відповідно до винаходу охоплюють конструювання молекул для імуноспецифічного розпізнавання активуючих рецепторів з низькою афінністю, що дозволяє одержати молекули, специфічні до поліморфізму. Альтернативно або додатково, молекула відповідно до винаходу може бути сконструйована так, щоб вона містила варіант Fc-домену, що буде мати підвищену афінність до FcγR (у порівнянні з Fc-доменом дикого типу) на ефекторних клітинах. Такі сконструйовані молекули відповідно до винаходу дають можливість одержати поліпшені імунотерапевтичні реагенти для лікування пацієнтів, незалежно від їхнього FcγR-поліморфізму.

Молекули діатіл, сконструйовані відповідно до даного винаходу, тестують на ADCC з використанням культивованої клітинної лінії або МКПК, узятих у пацієнта, для визначення здатності Fc-мутацій підвищувати ADCC. Стандартний аналіз на ADCC здійснюють описаними тут методами. Лімфоцити виділяють з периферичної крові в градієнті фіколла-пака (Pharmacia). Клітини-мішені, тобто культивовані клітинні лінії або клітини, узяті в пацієнта, навантажують європієм (PerkinElmer) і інкубують з ефекторами протягом 4 годин при 37 °C. Європій, який вивільняється, детектують на флуоресцентному планшет-рідері (Wallac). Отримані дані по ADCC указують на ефективність молекул відповідно до винаходу відносно стимуляції цитотоксичності, опосередковуваної NK-клітинами, і дозволяють установити, які молекули можуть бути протестовані з використанням зразків, узятих у пацієнтів, і виснажених моноцитів. Потім молекули діатіл, що, як передбачається, найбільш ймовірно мають ADCC-активність, були потім протестовані на ADCC з використанням МКПК, узятих у пацієнтів. МКПК, узяті в здорових донорів, були використані як ефекторні клітини.

Відповідно до цього даний винахід стосується способів або попередження лікування ракового захворювання, що характеризується присутністю ракового антигену, де вказаний спосіб включає конструювання молекули діатіла, яка імуноспецифічно розпізнає вказаний раковий антиген, так, щоб молекула діатіла сама мала цитотоксичність (наприклад, за допомогою перехресного зв'язування з поверхневими рецепторами, що приводить до посилення апоптозу або до інгібування сигналів проліферації) і/або містила Fc-домен відповідно до винаходу і/або опосередковувала одну або більше ефекторних функцій (наприклад, ADCC, фагоцитоз). Діатіла, які були сконструйовані способом відповідно до винаходу, є придатними для попередження або лікування раку, оскільки вони мають цитотоксичну активність (наприклад, підвищену здатність знищувати пухлинні клітини і/або підвищувати, наприклад, ADCC-активність або CDC-активність).

Ракові захворювання, асоційовані з раковим антигеном, можуть бути вилікувані або відвернені шляхом уведення діатіла, що зв'язується з раковим антигеном і є цитотоксичним

і/або яке було сконструйоване способами відповідно до винаходу так, щоб воно мало ефекторну функцію. Так, наприклад, ракові захворювання, асоційовані з нижченаведеними раковими антигенами, можуть бути вилікувані або відвернені з застосуванням способів і композицій відповідно до винаходу, і необмежувальними прикладами таких антигенів є: антиген усіх карцином KS 1/4 (Perez et al. (1989) "Isolation And Characterization Of A Cdna Encoding The Ksl/4 Epithelial Carcinoma Marker" J. Immunol. 142:3662-3667; Moller et al. (1991) "Bispecific-Monoclonal-Antibody-Directed Lysis Of Ovarian Carcinoma Cells By Activated Human T Lymphocytes" Cancer Immunol. Immunother. 33(4):210-216), антиген карциноми яєчника (CA125) (Yu et al. (1991) "Coexpression Of Different Antigenic Markers On Moieties That Bear CA 125 Determinants" Cancer Res. 51(2):468-475), кисла фосфатаза передміхурової залози (Tailor et al. (1990) "Nucleotide Sequence Of Human Prostatic Acid Phosphatase Determined From A Full-Length cDNA Clone" Nucl. Acids Res. 18(16):4928), антиген, специфічний для передміхурової залози (Henttu et al. (1989) "cDNA Coding For The Entire Human Prostate Specific Antigen Shows High Homologies To The Human Tissue Kallikrein Genes" Biochem. Biophys. Res. Comm. 10(2):903-910; Israeli et al. (1993) "Molecular Cloning Of A Complementary DNA Encoding A Prostate-Specific Membrane Antigen" Cancer Res. 53:227-230), асоційований з меланомою антиген p97 (Estin et al. (1989) "Transfected Mouse Melanoma Lines That Express Various Levels Of Human Melanoma-Associated Antigen p97" J. Natl. Cancer Instit. 81(6):445-454), антиген меланоми gp75 (Vijayasardahl et al. (1990) "The Melanoma Antigen Gp75 Is The Human Homologue Of The Mouse B (Brown) Locus Gene Product" J. Exp. Med. 171(4):1375-1380), високомолекулярний антиген меланоми (HMW-MAA) (Natali et al. (1987) "Immunohistochemical Detection Of Antigen In Human Primary And Metastatic Melanomas By The Monoclonal Antibody 140.240 And Its Possible Prognostic Significance" Cancer 59:55-63; Mittelman et al. (1990) "Active Specific Immunotherapy In Patients With Melanoma. A Clinical Trial With Mouse Antiidiotypic Monoclonal Antibodies Elicited With Syngeneic Anti-High-Molecular-Weight-Melanoma-Associated Antigen Monoclonal Antibodies" J. Clin. Invest. 86:2136-2144)), мембранний антиген, специфічний для передміхурової залози, карциноембріональний антиген (CEA) (Foon et al. (1995) "Immune Response To The Carcinoembryonic Antigen In Patients Treated With An Anti-Idiotype Antibody Vaccine" J. Clin. Invest. 96(l):334-42), поліморфний епітеліальний антиген муцин, антиген жирової глобули людської молочної залози, антигени, асоційовані з пухлиною прямої й ободової кишки, такі як: CEA, TAG-72 (Yokota et al. (1992) "Rapid Tumor Penetration Of A Single-Chain Fv And Comparison With Other Immunoglobulin Forms" Cancer Res. 52:3402-3408), 317-1A (Ragnhammar et al. (1993) "Effect Of Monoclonal Antibody 17-1 A And GM-CSF In Patients With Advanced Colorectal Carcinoma-Long-Lasting, Complete Remissions Can Be Induced" Int. J. Cancer 53:751-758); GICA 19-9 (Herlyn et al. (1982) "Monoclonal Antibody Detection Of A Circulating Tumor-Associated Antigen. I. Presence Of Antigen In Sera Of Patients With Colorectal, Gastric, And Pancreatic Carcinoma" J. Clin. Immunol. 2:135-140), CTA-1 і LEA, антиген лімфоми Беркітта - 38.13, CD19 (Ghetie et al. (1994) "Anti-CD 19 Inhibits The Growth Of Human B-Cell Tumor Lines In Vitro And Of Daudi Cells In SCID Mice By Inducing Cell Cycle Arrest" Blood 83:1329-1336), антиген людської В-лімфоми - CD20 (Reff et al. (1994) "Depletion Of B Cells In Vivo By A Chimeric Mouse Human Monoclonal Antibody To CD20" Blood 83:435-445), CD33 (Sgouros et al. (1993) "Modeling And Dosimetry Of Monoclonal Antibody Ml 95 (Anti-CD33) In Acute Myelogenous Leukemia" J. Nucl. Med. 34:422-430), специфічні для меланоми антигени, такі як гангліозид GD2 (Saleh et al. (1993) "Generation Of A Human Antiidiotypic Antibody That Mimics The GD2 Antigen" J.Immuno, 151, 3390-3398), гангліозид GD3 (Shitara et al. (1993) "A Mouse/Human Chimeric Anti-(Ganglioside GD3) Antibody With Enhanced Antitumor Activities" Cancer Immunol. Immunother. 36:373-380), гангліозид GM2 (Livingston et al. (1994) "Improved Survival In Stage III Melanoma Patients With GM2 Antibodies: A Randomized Trial Of Adjuvant Vaccination With GM2 Ganglioside" J. Clin. Oncol. 12:1036-1044), гангліозид GM3 (Hoon et al. (1993) "Molecular Cloning Of A Human Monoclonal Antibody Reactive To Ganglioside GM3 Antigen On Human Cancers" Cancer Res. 53:5244-5250), пухлиноспецифічні антигени клітинної поверхні, які продукуються при трансплантації (TSTA), такі як індуковані вірусом пухлинні антигени, включаючи Т-антиген пухлинних ДНк-вірусів і антигени оболонок пухлинних РНК-вірусів, альфа-фетопротеїн онкофетального антигену, такий як CEA товстої кишки, онкофетальний антиген пухлини сечового міхура (Hellstrom et al. (1985) "Monoclonal Antibodies To Cell Surface Antigens Shared By Chemically Induced Mouse Bladder Carcinomas" Cancer. Res. 45:2210-2188), антиген диференціювання, такий як антиген людської карциноми легень L6, L20 (Hellstrom et al. (1986) "Monoclonal Mouse Antibodies Raised Against Human Lung Carcinoma" Cancer Res. 46:3917-3923), антигени фібросаркоми, антиген людського Т-клітинного лейкозу - Gp37 (Bhattacharya-Chatterjee et al. (1988) "Idiotype Vaccines Against Human T Cell Leukemia. II. Generation And Characterization Of A Monoclonal Idiotype Cascade (Abl, Ab2 and Ab3)» J. Immunol.

141:1398-1403), неоглікопротеїн, сфінголіпіди, антиген раку молочної залози, такий як EGFR (рецептор епідермального фактора росту), антиген HER2 ($pI85^{HER2}$), поліморфний епітеліальний муцин (PEM) (Hilkens et al. (1992) "Cell Membrane-Associated Mucins And Their Adhesion-Modulating Property" Trends in Biochem. Sci. 17:359-363), антиген злоякісного людського лімфоцитарного лейкозу -APO-1 (Trauth et al. (1989) "Monoclonal Antibody-Mediated Tumor Regression By Induction Of Apoptosis" Science 245:301-304), антиген диференціювання (Feizi (1985) "Demonstration By Monoclonal Antibodies That Carbohydrate Structures Of Glycoproteins And Glycolipids Are Onco-Developmental Antigens" Nature 314:53-57), такий як антиген I, який присутній у фетальних еритроцитах і в первинній ендодермі; I(Ma), який присутній в аденокарциномі кишечнику; M18 і M39, який присутній у епітелії молочної залози; SSEA-1, який присутній у мієлоїдних клітинах, VEP8, VEP9, Myl, VIM-D5 і $D_1$56-22, який присутній у раковій пухлині прямої й ободової кишки; TRA-1-85 (групи крові H); C14, який присутній в аденокарциномі ободової кишки; F3, який присутній в аденокарциномі легень, AH6, який присутній у раковій пухлині кишечнику; гаптен Y, Le^y, який присутній у клітинах ембріональної карциноми, TL5 (групи крові A), рецептор EGF, який присутній у клітинах A431; антигени серії E_1 (групи крові B), який присутній у раковій пухлині підшлункової залози; FC10.2, який присутній у клітинах ембріональної карциноми й в аденокарциномі кишечнику, CO-514 (групи крові Le^a), який присутній в аденокарциномі; NS-10, який присутній в аденокарциномах; CO-43 (групи крові Le^b), G49, рецептор EGF (групи крові ALe^b/Le^y), який присутній в аденокарциномі ободової кишки; антиген 19.9, який присутній у раковій пухлині товстої кишки, муцини ракової пухлини кишечнику, T_5A_7, який присутній у мієлоїдних клітинах; R_{24}, який присутній у меланомі; 4.2, G_{D3}, D1.1, OFA-1, G_{M2}, OFA-2, G_{D2}, Ml:22:25:8, який присутній у клітинах ембріональної карциноми, і SSEA-3, SSEA-4, який присутній в ембріонах клітин у фазі 4-8. В інших варіантах винаходу антиген являє собою пептид Т-клітинного рецептора, який походить від Т-клітинної лімфоми шкіри (див. Edelson (1998) "Cutaneous T-Cell Lymphoma: A Model For Selective Immunotherapy" Cancer J. Sci. Am. 4:62-71).

Раковими і спорідненими захворюваннями, які можуть бути вилікувані або попереджені із застосуванням способів і композицій відповідно до винаходу, є, але не обмежуються ними: лейкози, включаючи, але не обмежуючись ними, гострий лейкоз, гострий лімфоцитарний лейкоз, гострий мієлоцитарний лейкоз, такий як мієлобластний, промієлоцитарний, мієломоноцитарний, моноцитарний лейкоз, еритролейкоз і мієлодиспластичний синдром; хронічні лейкози, такі як, але не обмежувані ними, хронічний мієлоцитарний (гранулоцитарний) лейкоз, хронічний лімфоцитарний лейкоз, ретикулоендотеліоз; справжня поліцитемія; лімфоми, такі як, але не обмежувані ними, хвороба Ходжкіна, неходжкінське захворювання; множинні мієломи, такі як, але не обмежувані ними, млявоплинна ("тліюча") множинна мієлома, несекреторна мієлома, остеосклеротична мієлома, лейкоз клітин плазми, солітарна плазмацитома і екстрамедулярна плазмацитома; макроглобулінемія Вальденстрема; моноклональна гаммопатія незрозумілої етіології; доброякісна моноклональна гаммопатія; хвороба важких ланцюгів; саркоми кісткової і сполучної тканин, такі як, але не обмежувані ними, саркома кістки, остеосаркома, хондросаркома, саркома Юїнга, злоякісна гігантоклітинна пухлина, фібросаркома кістки, хордома, періостеальна саркома, саркоми м'яких тканин, ангіосаркома (гемангіосаркома), фібросаркома, саркома Капоші, лейоміосаркома, ліпосаркома, лімфангіосаркома, нейрилемома, рабдоміосаркома, саркома синовія; пухлини головного мозку, включаючи, але не обмежуючись ними, гліому, астроцитому, гліому стовбура головного мозку, епендимому, олігодендрогліому, пухлина негліальних клітин, акустичну нейриному, краніофарингіому, медулобластому, менінгіому, пінеоцитому, пінеобластому, первинну лімфому головного мозку; ракові пухлини молочної залози, включаючи, але не обмежуючись ними, аденокарциному, лобулярну (дрібноклітинну) карциному, інтрадуктальну карциному, медулярну карциному молочної залози, рак слизової оболонки молочної залози, рак канальців молочної залози, папілярний рак молочної залози, хвороба Педжета і рак молочної залози, що супроводжується запаленням; рак кори надниркової залози, включаючи, але не обмежуючись ними, феохромоцитому й адренокортикальну карциному; рак щитовидної залози, такий як, але не обмежуючи ними, папілярний або фолікулярний рак щитовидної залози, медулярний рак щитовидної залози й анапластичний рак щитовидної залози; рак підшлункової залози, включаючи, але не обмежуючись ними, інсуліному, гастриному, глюкагоному, апудому, пухлину, секретуючу соматостатин, і карциноїд або пухлину панкреатичних острівців; ракові пухлини гіпофіза, включаючи, але не обмежуючись ними, хворобу Кушинга, пухлину, секретуючу пролактин, акромегалію і нецукровий діабет; ракові захворювання очей, включаючи, але не обмежуючись ними, меланоми очей, такі як меланома райдужки, хороїдальну меланому, меланому війчастого тіла і ретинобластому; рак піхви, включаючи, але не обмежуючись ними,

плоскоклітинний ендотеліоз, аденокарциному і меланому; рак вульви, включаючи, але не обмежуючись ними, плоскоклітинну карциному, меланому, аденокарциному, базальноклітинну карциному, саркому і хворобу Педжета; рак шийки матки, включаючи, але не обмежуючись ними, плоскоклітинну карциному й аденокарциному; рак матки, включаючи, але не обмежуючись ними, карциному ендометрія і саркому матки; рак яєчника, включаючи, але не обмежуючись ними, епітеліальну карциному яєчника, пухлину пограничної тканини, пухлину зародкових клітин і пухлину строми; рак стравоходу, включаючи, але не обмежуючись ними, плоскоклітинний рак, аденокарциному, кістозну аденоїдну карциному, мукоепідермоїдну карциному, аденосквамозну карциному, саркому, меланому, плазмацитому, верукозну карциному й вівсяноклітинну (дрібноклітинну) карциному; рак шлунка, включаючи, але не обмежуючись ними, аденокарциному, грибоподібну (поліпоїдну), вкриваючи виразками, поверхнево розсіяну, дифузно розсіяну, злоякісну лімфому, ліпосаркому, фібросаркому і карциносаркому; рак товстої кишки; рак прямої кишки; рак печінки, включаючи, але не обмежуючись ними, гепатоцелюлярну карциному і гепатобластому; рак жовчного міхура, включаючи, але не обмежуючись ними, аденокарциному; холангіокарциноми, включаючи, але не обмежуючись ними, папілярну, нодулярну і дифузійну карциному; рак легень, включаючи, але не обмежуючись ними, недрібноклітинний рак легень, плоскоклітинну карциному (епідермоїдну карциному), аденокарциному, великоклітинну карциному і дрібноклітинний рак легень; рак яєчок, включаючи, але не обмежуючись ними, пухлину зародкових клітин, семіному, анапластичну карциному, класичну (типову) карциному, сперматоцитому, карциному, що не стосується семіноми, ембріональну карциному, тератомну карциному, хоріокарциному (пухлину жовточного мішка); рак передміхурової залози, включаючи, але не обмежуючись ними, аденокарциному, лейоміосаркому і рабдоміосаркому; рак пенісу; рак ротової порожнини, включаючи, але не обмежуючись ними, плоскоклітинну карциному; базальноклітинний рак; рак слинних залоз, включаючи, але не обмежуючись ними, аденокарциному, мукоепідермоїдну карциному й аденоїдкістозну карциному; рак гортані, включаючи, але не обмежуючись ними, плоскоклітинний рак і верукозний рак; рак шкіри, включаючи, але не обмежуючись ними, базальноклітинну карциному, плоскоклітинну карциному і меланому, поверхнево розсіяну меланому, нодулярну меланому, злоякісну лентиго, периферичну лентиго-подібну меланому; рак нирок, включаючи, але не обмежуючись ними, нирково-клітинний рак, аденокарциному, гіпернефрому, фібросаркому, перехідно-клітинний рак (ниркової миски і/або сечоводу); пухлину Вільмса; рак сечового міхура, включаючи, але не обмежуючись ними, перехідно-клітинну карциному, плоскоклітинний рак, аденокарциному, карциносаркому. Крім того, раковими захворюваннями є міксосаркома, остеогенна саркома, саркома ендотелія, лімфангіосаркома ендотелія, мезотеліома, синовіома, гемангіобластома, карцинома епітелію, кістозна аденокарцинома, бронхогенна карцинома, карцинома потових залоз, карцинома сальних залоз, папілярна карцинома і папілярна аденокарцинома (опис таких захворювань можна знайти в публікаціях Fishman et al. (1985) Medicine, 2d Ed., J.B. Lippincott Co., Philadelphia; і Murphy et al. (1997) Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, і Recovery, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., Inc., United States of America).

Відповідно до цього способи і композиції відповідно до винаходу можуть бути також застосовані для лікування або попередження різних ракових або інших захворювань, асоційованих з аномальною проліферацією клітин, включаючи (але не обмежуючи ними), наступні захворювання: саркому, включаючи саркому сечового міхура, молочної залози, товстої кишки, нирок, печінки, легень, яєчника, підшлункової залози, шлунка, передміхурової залози, шийки матки, щитовидної залози, і шкіри; плоскоклітинну карциному; гематопоетичні пухлини лімфоїдної лінії диференціювання, включаючи лейкоз, гострий лімфоцитарний лейкоз, гострий лімфобластний лейкоз, В-клітинну лімфому, Т-клітинну лімфому, лімфому Беркітта; гематопоетичні пухлини мієлоїдної лінії диференціювання, включаючи гострий і хронічний мієлогенний лейкоз і промієлоцитарний лейкоз; пухлини мезенхіми, включаючи фібросаркому і рабдоміосаркому; інші пухлини, включаючи меланому, семіному, тератокарциному, нейробластому і гліому; пухлини центральної і периферичної нервової системи, включаючи астроцитому, нейробластому, гліому і шваноми; пухлини мезенхіми, включаючи фібросаркому, рабдоміосаркому й остеосаркому; і інші пухлини, включаючи меланому, пігментозну пухлину ксенодерми, кератоакантому, семіному, фолікулярний рак щитовидної залози і тератокарциному. Також вважається, що рак, який викликається порушеннями апоптози, може бути також вилікуваний із застосуванням способів і композицій відповідно до винаходу. Такими раковими захворюваннями можуть бути, але не обмежуються ними, фолікулярні лімфоми, карциноми з мутаціями p53, гормон-залежні пухлини молочної залози, передміхурової залози і яєчника, і передракові ураження, такі як спадковий адономатозний поліпоз і мієлодиспластичні

синдроми. У конкретних варіантах винаходу злоякісні або диспроліферативні зміни (такі як метаплазії і дисплазії) або гіперпроліферативні розлади можуть бути вилікувані або відвернені з застосуванням способів і композицій відповідно до винаходу шляхом уведення цих композицій у яєчник, сечовий міхур, молочну залозу, товсту кишку, легені, шкіру, підшлункову залозу або в матку. В інших конкретних варіантах винаходу саркома, меланома або лейкоз можуть бути вилікувані або відвернені з застосуванням способів і композицій відповідно до винаходу.

У конкретному варіанті винаходу молекула відповідно до винаходу (наприклад, діатіло, що містить множину епітоп-зв'язувальних доменів і необов'язково Fc-домен (або його частину)) інгібує або знижує ріст ракових клітин щонайменше на 99 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 90 %, щонайменше на 85 %, щонайменше на 80 %, щонайменше на 75 %, щонайменше на 70 %, щонайменше на 60 %, щонайменше на 50 %, щонайменше на 45 %, щонайменше на 40 %, щонайменше на 45 %, щонайменше на 35 %, щонайменше на 30 %, щонайменше на 25 %, щонайменше на 20 % або щонайменше на 10 % у порівнянні з ростом ракових клітин за відсутністю вказаної молекули згідно з винаходом.

У конкретному варіанті винаходу молекула відповідно до винаходу (наприклад, діатіло, яке містить множину епітоп-зв'язувальних доменів і необов'язково Fc-домен (або його частину)) знищує ракові клітини або інгібує або знижує їхній ріст щонайменше на 5 %, щонайменше на 10 %, щонайменше на 20 %, щонайменше на 25 %, щонайменше на 30 %, щонайменше на 35 %, щонайменше на 40 %, щонайменше на 45 %, щонайменше на 50 %, щонайменше на 60 %, щонайменше на 70 %, щонайменше на 75 %, щонайменше на 80 %, щонайменше на 85 %, щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 % або щонайменше на 100 % більш ефективно в порівнянні з батьківською молекулою.

5.5.2. Аутоімунне захворювання і запальні захворювання

У деяких варіантах винаходу молекули відповідно до винаходу включають епітоп-зв'язувальний домен, специфічний до FcγRIIB і/або до варіанта Fc-домену (або його частини), і були сконструйовані способами відповідно до винаходу, де Fc-домен має підвищену афінність відносно FcγRIIB і знижену афінність відносно FcγRIIIA і/або FcγRIIA в порівнянні з Fc-доменом дикого типу. Молекули відповідно до винаходу, що мають такі зв'язувальні властивості, можуть бути використані для регуляції імунної відповіді, наприклад, для інгібування імунної відповіді, а також для придушення розвитку аутоімунних або запальних захворювань. Не обмежуючи яким-небудь конкретним механізмом дії, слід зазначити, що молекули відповідно до винаходу, що мають афінність відносно FcγRIIB і/або містять Fc-домен з підвищеною афінністю до FcγRIIB і зниженою афінністю до FcγRIIIA і/або FcγRIIA, можуть знижувати активуючу відповідь на FcγR і інгібувати клітинну чутливість, а тому ці молекули є терапевтично ефективними для лікування і/або попередження аутоімунного розладу.

Даний винахід також стосується способів попередження, лікування або терапії одного або більше симптомів, асоційованих із запальним розладом в індивідуума, де вказані способи також включають уведення вказаному індивідууму терапевтично або профілактично ефективної кількості одного або більше протизапальних засобів. Даний винахід також стосується способів попередження, лікування або терапії одного або більше симптомів, асоційованих з аутоімунним захворюванням, де вказані способи також включають уведення вказаному індивідууму терапевтично або профілактично ефективної кількості одного або більше імуномодулюючих засобів. Необмежувальні приклади протизапальних і імуномодулюючих засобів приводяться в розділі 5.7.

Прикладами аутоімунних розладів, які можуть бути вилікувані шляхом уведення молекул відповідно до винаходу, є, але не обмежуються ними, гніздова алопеція, анкілозуючий спондиліт, антифосфоліпідний синдром, аутоімунна хвороба Аддісона, аутоімунні захворювання кори надниркової залози, аутоімунна гемолітична анемія, аутоімунний гепатит, аутоімунний оофорит і орхіт, аутоімунна тромбоцитопенія, хвороба Бехчета, бульозний пемфігоїд, кардіоміопатія, кишкова спру, дерматит, синдром хронічної утоми, асоційований з імунною дисфункцією (CFIDS), хронічна запальна демієлінізуюча поліневропатія, синдром Черга-Штрауса, пемфігоїд, який рубцюється, синдром CREST, хвороба холодових аглютинінів, хвороба Крона, дисковидний вовчак, есенційна змішана кріоглобулінемія, фіброміалгія-фіброміозит, гломерулонефрит, хвороба Грейвса, синдром Гійена-Барре, тиреоїдит Хашимото, ідіопатичний фіброз легень, ідіопатична тромбоцитопенічна пурпура (ITP), IgA-невропатія, ювенільний артрит, плоский лишай, системний червоний вовчак, хвороба Меньєра, змішана хвороба сполучних тканин, розсіяний склероз, цукровий діабет типу 1 або імуноопосередковуваний цукровий діабет, тяжка міастенія, вульгарна пухирчатка, перніціозна анемія, нодозний поліартеріїт, поліхондрит, полігландулярні синдроми, ревматична поліміалгія, поліміозит і дерматоміозит, первинна гаммаглобулінемія, первинний біліарний цироз, псоріаз,

псоріатичний артрит, феномен Рейно, синдром Рейтера, ревматоїдний артрит, саркоїдоз, склеродермія, синдром Шегрена, синдром "негнучкої" людини, системний червоний вовчак, червоний вовчак, артеріїт Такаясу, скроневий артеріїт/гігантоклітинний артеріїт, виразковий коліт, увеїт, васкуліти, такі як герпетиформний дерматит, вітиліго і гранулематоз Вегенера. Прикладами запальних захворювань є, але не обмежуються ними, астма, енцефаліт, запальне захворювання кишечнику, хронічна обструктивна хвороба легень (ХОХЛ), алергійні розлади, септичний шок, легеневий фіброз, недиференційована спондилоартропатія, недиференційована артропатія, артрит, запальний остеоліз і хронічне запалення, яке викликається хронічними вірусними або бактеріальними інфекціями. Як описано тут у розділі 2.2.2, деякі аутоімунні розлади асоціюються із запальним станом. Таким чином, існують ознаки, які є спільними для аутоімунного і запального розладу. Тому деякі аутоімунні розлади можуть бути також охарактеризовані як запальні розлади. Прикладами запальних розладів, що можуть бути попереджені, вилікувані або усунуті способами відповідно до винаходу, є, але не обмежуються ними, астма, енцефаліт, запальне захворювання кишечнику, хронічна обструктивна хвороба легень (ХОХЛ), алергійні розлади, септичний шок, легеневий фіброз, недиференційована спондилоартропатія, недиференційована артропатія, артрит, запальний остеоліз і хронічне запалення, яке викликається хронічними вірусними або бактеріальними інфекціями.

Молекули відповідно до винаходу, що містять щонайменше один епітоп-зв'язувальний домен, специфічний до FcγRIIB, і/або варіант Fc-домену з підвищеною афінністю до FcγRIIB і зниженою афінністю до FcγRIIIA, можуть бути також використані для зниження запалення у тварин, зокрема, у ссавців із запальними розладами. У конкретному варіанті винаходу молекула відповідно до винаходу сприяє зниженню запалення у тварини щонайменше на 99 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 90 %, щонайменше на 85 %, щонайменше на 80 %, щонайменше на 75 %, щонайменше на 70 %, щонайменше на 60 %, щонайменше на 50 %, щонайменше на 45 %, щонайменше на 40 %, щонайменше на 45 %, щонайменше на 35 %, щонайменше на 30 %, щонайменше на 25 %, щонайменше на 20 % або щонайменше на 10 % у порівнянні з запаленням у тварини, якій не вводили вказану молекулу.

Молекули відповідно до винаходу, що містять щонайменше один епітоп-зв'язувальний домен, специфічний до FcγRIIB, і/або варіант Fc-домену з підвищеною афінністю до FcγRIIB і зниженою афінністю до FcγRIIIA, можуть бути також використані для попередження відторгнення трансплантатів.

5.5.3. Інфекційне захворювання

Даний винахід також охоплює способи лікування або попередження інфекційного захворювання в індивідуума, де вказані способи включають уведення терапевтично або профілактично ефективної кількості однієї або більше молекул відповідно до винаходу, що містять щонайменше один епітоп-зв'язувальний домен, специфічний до інфекційного агента, асоційованого з вказаним інфекційним захворюванням. У деяких варіантах винаходу молекули відповідно до винаходу є токсичними для інфекційного агента, сприяють підвищенню імунної відповіді проти вказаного агента або підсилюють ефекторну функцію проти вказаного агента в порівнянні з імунною відповіддю, яка продукується під час відсутності вказаної молекули. Інфекційні захворювання, що можуть бути вилікувані або попереджені з використанням молекул відповідно до винаходу, викликаються інфекційними агентами, включаючи, але не обмежуючись ними, віруси, бактерії, гриби, найпростіші і віруси.

Вірусними захворюваннями, які можуть бути вилікувані або попереджені з використанням молекул відповідно до винаходу і з застосуванням способів відповідно до винаходу, є, але не обмежуються ними, захворювання, які викликаються вірусом гепатиту типу A, гепатиту типу B, гепатиту типу C, вірусом грипу, вірусом вітряної віспи, аденовірусом, вірусом простого герпеса типу I (HSV-I), вірусом простого герпеса типу II (HSV-II), вірусом чуми великої рогатої худоби, риновірусом, еховірусом, ротавірусом, респіраторно-синцитіальним вірусом, папіломавірусом, паповавірусом, цитомегаловірусом, ехіновірусом, арбовірусом, хантавірусом, вірусом коксакі, вірусом паротиту, вірусом кору, вірусом коревої краснухи, поліовірусом, вірусом натуральної віспи, вірусом Епштейна-Барра, вірусом імунодефіциту людини типу I (ВІЛ-I), вірусом імунодефіциту людини типу II (ВІЛ-II) і збудниками вірусних захворювань, таких як вірусний менінгіт, енцефаліт, лихоманка денге або натуральна віспа.

Бактеріальними захворюваннями, які можуть бути вилікувані або попереджені з використанням молекул відповідно до винаходу і з застосуванням способів відповідно до винаходу, є, але не обмежуються ними, захворювання, які викликаються бактеріями, включаючи, але не обмежуючись ними, захворювання, які викликаються mycobacteria rickettsia, mycoplasma, neisseria, S. pneumonia, Borrelia burgdorferi (хвороба Лайма), Bacillus antracis

(сибірська виразка); правець; захворювання, які викликаються бактеріями streptococcus, staphylococcus, mycobacterium; правець; коклюш; холера; чуму; дифтерія і захворювання, які викликаються бактеріями chlamydia, S. aureus і legionella.

Захворюваннями, які викликаються найпростішими, які можуть бути вилікувані або попереджені з використанням молекул відповідно до винаходу і з застосуванням способів відповідно до винаходу, є, але не обмежуються ними, лейшманіоз, кокцидоз, трипаносомоз або малярія.

Захворюваннями, які викликаються паразитами, що можуть бути вилікувані або попереджені з використанням молекул відповідно до винаходу і з застосуванням способів відповідно до винаходу, є, але не обмежуються ними, захворювання, які викликаються хламідіями і рикетсіями.

Відповідно до одного з аспектів винаходу, молекули відповідно до винаходу, що містять щонайменше один епітоп-зв'язувальний домен, специфічний до інфекційного агента, мають ефекторну функцію антитіла, спрямовану проти вказаного агента, наприклад, патогенного білка. Прикладами інфекційних агентів є, але не обмежуються ними, бактерії (наприклад, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Staphylococcus aureus, Enterococcus faecials, Candida albicans, Proteus vulgaris, Staphylococcus viridans і Pseudomonas aeruginosa), патоген (наприклад, В-лімфотропний паповавірус (LPV); Bordatella pertussis; вірус хвороби Борна (BDV); бичачий коронавірус; вірус хоріоменінгіту; вірус денге; вірус E. coli; вірус ебола; еховірус 1; еховірус 11 (EV); ендотоксин (LPS); кишкова бактерія; кишковий орфанний вірус; ентеровіруси; вірус котячого лейкозу; вірус ящуру, вірус лейкозу гібонів (GALV); грамнегативні бактерії; Heliobacter pylori; вірус гепатиту В (HBV); вірус простого герпеса; ВІЛ-1; людський цитомегаловірус; людський коронавірус; вірус грипу А, В і С; Legionella; Leishmania mexicana; Listeria monocytogenes; вірус кору; Meningococcus; морбілівіруси; вірус мишачого гепатиту; вірус мишачого лейкозу; вірус мишачого гаммагерпеса; мишачий ретровірус; мишачий коронавірус; вірус мишачого гепатиту; Mycobacterium avium-M; Neisseria gonorrhoeae; вірус ньюкаслської хвороби; парвовірус В19; Plasmodium falciparum; вірус віспи; Pseudomonas; ротавірус; Salmonella typhiurium; Shigella; Streptococci; Т-клітинний лімфотропний вірус 1; вірус коров'ячої віспи).

5.5.4. Детоксифікація

Даний винахід також охоплює способи детоксифікації індивідуума, що піддавався впливу токсинів (наприклад, токсичною молекулою лікарського засобу), де вказані способи включають уведення терапевтично або профілактично ефективної кількості однієї або більше молекул відповідно до винаходу, що містять щонайменше один епітоп-зв'язувальний домен, специфічний до токсичної молекули лікарського засобу. У деяких варіантах винаходу зв'язування молекули відповідно до винаходу з токсином приведе до зниження або усунення негативного фізіологічного ефекту, який викликається вказаним токсином. В інших варіантах винаходу зв'язування діатіла відповідно до винаходу з токсином приведе до підвищення або посилення елімінації, розкладання або нейтралізації токсину в порівнянні з елімінацією, розкладанням або нейтралізацією токсину, що спостерігаються під час відсутності вказаного діатіла. Імунодетокситерапія, яка здійснюється способами відповідно до винаходу, може бути проведена для усунення ефектів, яка викликається передозуванням або негативним впливом лікарських засобів, включаючи, але не обмежуючись ними, дигіксин, PCP, кокаїн, колхіцин і трициклічні антидепресанти.

Комбінована терапія

Даний винахід також охоплює введення молекул відповідно до винаходу в комбінації з іншими відомими засобами терапії, звичайно застосовуваними для лікування або попередження раку, аутоімунного захворювання, інфекційного захворювання або інтоксикації, включаючи, але не обмежуючись ними, сучасну стандартну й експериментальну хіміотерапію, гормональну терапію, біологічну терапію, імунотерапію, променеву терапію або хірургічне втручання. У деяких варіантах винаходу молекули відповідно до винаходу можуть бути введені в комбінації з терапевтично або профілактично ефективною кількістю одного або більше агентів, терапевтичних антитіл або інших відомих агентів для лікування і/або попередження раку, аутоімунного захворювання, інфекційного захворювання або інтоксикації.

У деяких варіантах винаходу одну або більше молекул відповідно до винаходу вводять ссавцю, переважно людині, одночасно з одним або декількома іншими терапевтичними агентами, використовуваними для лікування раку. Термін "конкурентно" не обмежується введенням профілактичних або терапевтичних агентів точно в той самий час, і може означати, що молекула відповідно до винаходу й інший агент можуть бути введені ссавцю у визначеній послідовності і через визначені інтервали часу так, щоб молекула відповідно до винаходу могла

діяти разом з іншим агентом і давати кращий ефект, ніж при якому-небудь іншому уведенні. Так, наприклад, використовувані профілактичні або терапевтичні агенти (наприклад, терапевтичні агенти, використовувані в хіміотерапії, променевій терапії, гормональній терапії або біологічній терапії) можуть бути введені одночасно або послідовно в будь-якому порядку й у різні періоди часу; однак, якщо вони не вводяться в той самий час, то вони повинні бути введені через досить короткий час так, щоб досягався потрібний терапевтичний або профілактичний ефект. Кожен терапевтичний агент може бути введений окремо, у будь-якій придатній формі і будь-яким придатним способом. У різних варіантах винаходу профілактичні або терапевтичні агенти вводять з інтервалом менше ніж 1 година, приблизно 1 година, приблизно 1-2 години, приблизно 2-3 години, приблизно 3-4 години, приблизно 4-5 годин, приблизно 5-6 годин, приблизно 6-7 годин, приблизно 7-8 годин, приблизно 8-9 годин, приблизно 9-10 годин, приблизно 10-11 годин, приблизно 11-12 годин, не більше ніж 24 години або не більше ніж 48 годин. У переважних варіантах винаходу два або більше компонентів вводять пацієнту за один візит.

В інших варіантах винаходу профілактичні або терапевтичні агенти вводять з інтервалом приблизно в 2-4 дні, приблизно в 4-6 днів, приблизно в 1 тиждень, приблизно в 1-2 тижні або більше ніж у 2 тижні. У переважних варіантах винаходу профілактичні або терапевтичні агенти вводять в інтервали часу, протягом яких ці агенти зберігають свою активність. Кожен фахівець у даній галузі може визначити такі інтервали часу шляхом оцінки часу напівжиття агентів, що вводяться.

У деяких варіантах винаходу профілактичні або терапевтичні агенти відповідно до винаходу вводять індивідууму періодично. Циклічна терапія включає введення спочатку першого агента протягом визначеного періоду часу, а потім уведення другого агента і/або третього агента протягом визначеного періоду часу і повторення такого послідовного введення. Циклічна терапія може знижувати ризик розвитку резистентності до однієї або більше терапій, а також усувати або послаблювати побічні ефекти однієї терапії і/або підвищувати ефективність терапії.

У деяких варіантах винаходу профілактичні або терапевтичні агенти вводять циклами, проведеними приблизно менше ніж за 3 тижні, приблизно кожні 2 тижні, приблизно кожні 10 днів або приблизно щотижня. Один цикл може включати введення терапевтичного або профілактичного агента шляхом уливання протягом приблизно 90 хвилин, приблизно 1 години, приблизно 45 хвилин за кожен цикл. Кожен цикл може включати перерву щонайменше в 1 тиждень, щонайменше в 2 тижні, щонайменше в 3 тижні. Число циклів уведення становить приблизно злитих 1 до приблизно 12 циклів, звичайно від приблизно 2 до приблизно 10 циклів, а найчастіше від приблизно 2 до приблизно 8 циклів.

В інших варіантах винаходу терапевтичні і профілактично агенти відповідно до винаходу вводять у режимі метрономного дозування, або шляхом безупинного уливання, або шляхом частого введення без тривалих інтервалів. Таке метрономне введення може включати постійне введення дози протягом інтервалів часу без перерв. Звичайно терапевтичні агенти, зокрема цитотоксичні агенти, вводять у більш низьких дозах. Такі схеми введення доз включають безупинне щоденне введення відносно низьких доз протягом тривалих періодів часу. У переважних варіантах винаходу використання низьких доз буде мінімізувати токсичні побічні ефекти і дозволить проводити лікування без перерв. У деяких варіантах винаходу терапевтичні і профілактичні агенти вводять шляхом безупинного уливання в низьких дозах або постійного уливання протягом періоду часу від приблизно 24 годин до приблизно 2 днів, до приблизно 1 тижня, до приблизно 2 тижнів, до приблизно 3 тижнів, до приблизно 1 місяця, до приблизно 2 місяців, до приблизно 3 місяців, до приблизно 4 місяців, до приблизно 5 місяців і до приблизно 6 місяців. Схема такого введення доз може бути оптимізована онкологом.

В інших варіантах винаходу курси лікування ссавця можуть бути проведені конкурентно, тобто, окремі дози терапевтичних агентів уводять окремо, але все-таки в той самий період часу, так, щоб молекули відповідно до винаходу діяли разом з іншим агентом або з іншими агентами. Так, наприклад, один компонент може бути введений один раз на тиждень у комбінації з іншими компонентами, що можуть бути введені один раз на два тижні або один раз на три тижні. Іншими словами, уведення доз терапевтичних засобів здійснюють у конкурентному режимі, навіть якщо терапевтичні засоби не вводяться одночасно або за один візит пацієнта.

Молекули відповідно до винаходу і профілактичний і/або терапевтичний агент, якщо вони використовуються в комбінації з іншими профілактичними і/або терапевтичними агентами, можуть діяти адитивно або, більш переважно, синергічно. В одному з варіантів винаходу молекулу відповідно до винаходу вводять одночасно з одним або більше терапевтичними агентами в одній і тій же фармацевтичній композиції. В іншому варіанті винаходу молекулу відповідно до винаходу вводять конкурентно з одним або більше терапевтичними агентами в

окремих фармацевтичних композиціях. В іншому варіанті винаходу молекулу відповідно до винаходу вводять до або після введення іншого профілактичного або терапевтичного агента. У даному винаході розглядається введення молекули відповідно до винаходу в комбінації з іншими профілактичними або терапевтичними агентами тим самим способом або різними способами введення, наприклад, перорально і парентерально. У деяких варіантах винаходу, якщо молекулу відповідно до винаходу вводять конкурентно з іншим профілактичним або терапевтичним агентом, що може викликати небажані побічні ефекти, включаючи, але не обмежуючись ними, токсичну дію, то такий профілактичний або терапевтичний агент переважно вводять у дозі нижче граничної дози, при якій може вироблятися небажаний побічний ефект.

Терміни "терапевтично ефективний" і "профілактично ефективний" охоплюють кількості доз і частоту їхнього введення, описані в даній заявці. Такі дози і частота їх введення звичайно варіюються залежно від індивідуальних особливостей, характерних для кожного конкретного пацієнта, а саме, залежно від терапевтичних або профілактичних агентів, які конкретно вводяться, тяжкості і типу ракового захворювання, способу введення, а також від віку, маси тіла, сприйнятливості й історії хвороби пацієнта. Придатні схеми лікування можуть бути вибрані фахівцем у даній галузі з урахуванням вказаних факторів і відповідно до доз, наприклад, описаних в літературі і рекомендованих в посібнику Physician's Desk Reference (56th ed., 2002).

5.5.5. Протиракові засоби

У конкретному варіанті винаходу способи відповідно до винаходу включають введення однієї або більше молекул відповідно до винаходу разом з одним або більше терапевтичними агентами, використовуваними для лікування і/або попередження раку. В одному з варіантів винаходу інгібітори ангіогенезу можуть бути введені в комбінації з молекулами відповідно до винаходу. Інгібіторами ангіогенезу, що можуть бути використані в способах і композиціях відповідно до винаходу, є, але не обмежуються ними, ангіостатин (фрагмент плазміногену); антиангіогенний антитромбін III; ангіозим; ABT-627; Bay 12-9566; бенефін; бевацизумаб; BMS-275291; хрящовий інгібітор (CDI); CAI; фрагмент комплементу CD59; CEP-7055; Col 3; комбретастатин A-4; ендостатин (фрагмент колагену XVIII); фрагмент фібронектину; Gro-бета; галофугінон; гепаринази; гексасахаридний фрагмент гепарину; HMV833; людський хоріонічний гонадотропін (hCG); IM-862; інтерферон альфа/бета/гамма, індуцибельний білок інтерферон (IP-10); інтерлейкін-12; Kringle 5 (фрагмент плазміногену); маримастат; інгібітори металопротеїнази (TIMP); 2-метоксіестрадіол; MMI 270 (CGS 27023A); MoAb IMC-1C11; неовастат; NM-3; панзем; PI-88; плацентарний інгібітор рибонуклеази; інгібітор активатора плазміногену; тромбоцитарний фактор-4 (PF4); приномастат; 16 кДа-фрагмент пролактину; білок, споріднений проліферину (PRP); PTK 787/ZK 222594; ретиноїди; солімастат; скваламін; SS 3304; SU 5416; SU6668; SU11248; тетрагідрокортизол-S; тетратіомолібдат; талідомід; тромбоспондин-1 (TSP-1); TNP-470; трансформуючий фактор росту-бета (TGF-b); васкулостатин; вазостатин (фрагмент кальретикуліну); ZD6126; ZD 6474; інгібітори фарензилтрансферази (FTI); і бісфосфонати.

Протираковими засобами, що можуть бути використані в комбінації з молекулами відповідно до винаходу в різних варіантах винаходу, включаючи фармацевтичні композиції, лікарські форми і набори відповідно до винаходу, є, але не обмежуються ними: ацивіцин; акларубіцин; гідрохлорид акодазолу; акронін; адозелезин; альдеслейкін; альтретамін; амбоміцин; ацетат аметантрону; аміноглютетимід; амсакрин; анастрозол; антраміцин; аспарагіназа; асперлін; азацитидин; азатепа; азотоміцин; батимастат; бензодепа; бікалутамід; гідрохлорид бізантрена; димезилат біснафіду; бізелезин; сульфат блеоміцину; брехінар-натрій; бропіримін; бусульфан; кактиноміцин; калустерон; карацимід; карбетимер; карбоплатин; кармустин; гідрохлорид карубіцину; карзелезин; цедефінгол; хлорамбуцил; циролеміцин; цисплатин; кладрибін; мезилат криснатолу; циклофосфамід; цитарабін; дакарбазин; дактиноміцин; гідрохлорид даунорубіцину; децитабін; дексормаплатин; дезагуанін; мезилат дезагуаніну; діазиквон; доцетаксел; доксорубіцин; гідрохлорид доксорубіцину; дролоксифен; цитрат дролоксифену; пропіонат дромостанолону; дуазоміцин; едатрексат; гідрохлорид ефлорнітину; елзамітруцин; енлопланин; енпромат; епіпропідин; гідрохлорид епірубіцина; ербулозол; гідрохлорид езорубіцину; естрамустин; фосфат естрамустину-натрію; етанідазол; етопозид; фосфат етопозиду; етоприн; гідрохлорид фадрозолу; фазарабин; фенретинід; флоксуридин; фосфат флударабіну; фторурацил; фторцитабін; фосхідон; фостриецин-натрій; гемцитабін; гідрохлорид гемцитабіну; гідроксисечовина; гідрохлорид ідарубіцину; іфосфамід; ілмофозин; інтерлейкін II (включаючи рекомбінантний інтерлейкін II або rIL2); інтерферон-альфа-2a; інтерферон-альфа-2b; інтерферон-альфа-n1; інтерферон-альфа-n3; інтерферон-бета-1a; інтерферон-гамма-1b; іпроплатин; гідрохлорид іринотекану; ацетат ланреотиду; летрозол; ацетат лейпроліду; гідрохлорид ліарозолу; лометрексол-натрій; ломустин; гідрохлорид лозоксантрону; мазопрокол; майтанзин; гідрохлорид мехлоретаміну; ацетат мегестролу; ацетат меленгестролу; мелфалан;

меногарил; меркаптопурин; метотрексат; метотрексат-натрій; метоприн; метуредопа; мітиндомід; мітокарцин; мітокромин; мітогілін; мітомальцин; мітоміцин; мітоспер; мітотан; гідрохлорид мітоксантрону; мікофенолова кислота; нокодазол; ногаламіцин; ормаплатин; оксисуран; паклітаксел; пегаспаргаза; пеліоміцин; пентамустин; сульфат пепломіцину; перфосфамід; піпоброман; піпосульфан; гідрохлорид піроксантрону; плікаміцин; пломестан; порфімер-натрій; порфіроміцин; преднімустин; гідрохлорид прокарбазину; пуроміцин; гідрохлорид пуроміцину; піразофурин; рибоприн; роглетимід; сафінгол; гідрохлорид сафінголу; семустин; симтразен; спарфозат-натрій; спарсомецин; гідрохлорид спірогерманію; спіромустин; спіроплатин; стрептонігрин; стрептозоцин; сулофенур; талізоміцин; текогалан-натрій; тегафур; гідрохлорид телоксантрону; темопорфін; теніпозид; тероксирон; тестолактон; тіаміприн; тіогуанін; тіотепа; тіазофурин; тирапазамін; цитрат тореміфену; ацетат трестолону; фосфат трицирибіну; триметрексат; глюкуронат триметрексату; трипторелін; гідрохлорид тубулозолу; урациловий аналог гірчичного газу; уредепа; вапреотид; вертепорфин; сульфат вінбластину; сульфат вінкристину; віндезин; сульфат віндезину; сульфат вінепідину; сульфат вінгліцинату; сульфат вінлейрозину; тартрат вінорелбіну; сульфат вінрозидину; сульфат вінзолідину; ворозол; зеніплатин; зиностатин; гідрохлорид зорубіцину. Іншими протиракovими лікарськими засобами є, але не обмежуються ними, 20-епі-1,25-дигідроксивітамін D3; 5-етинілурацил; абіратерон; акларубіцин; ацилфульвен; адеципенол; адозелезин; альдеслейкін; антагоністи ALL-TK; альтретамін; амбамістин; амідокс і аміфостин; амінолевулінова кислота; амрубіцин; амсакрин; анагрелід, анастрозол; андрографолід; інгібітори ангіогенезу; антагоніст D; антагоніст G; антарелікс; антидорсальний морфогенний білок-1; антиандроген проти карциноми передміхурової залози; антиестроген; антинеопластон; антисмислові олігонуклеотиди; гліцинат афідиколіну; генні модулятори апоптозу; регулятори апоптозу; апуринова кислота; ara-CDP-DL-PTBA; аригінін-деаміназа; азулакрин; атаместан; атримустин; аксинастин 1; аксинастин 2; аксинастин 3; азазетрон; азатоксин; азатирозин; похідні баккатину III; баланол; батимастат; антагоністи BCR/ABL; бензохлорини; бензоїлстауроспорин; похідні бета-лактаму; бета-алетин; бетакламіцин B; бетулінова кислота; інгібітор bFGF; бікалутамід; бізантрен; бісазиридинілспермін; біснафид; бістратен A; бізелезин; брефлат; бропіримін; будотитан; бутіонін-сульфоксимин; кальципотриол; кальфостин C; похідні камптотецину; канарипокс IL-2; капецитабін; карбоксамідамінотриазол; карбоксіамінотриазол; CaRest M3; CAR 700; хрящовий інгібітор; карзелезин; інгібітор казеїнкінази (ICOS); кастаноспермін; цекропин B; цетрорелікс; хлор; сульфонамід хлорхіноксаліну; цикапрост; цис-порфірин; кладрибін; аналоги кломіфену; клотримазол; колісміцин A; колісміцин B; комбретастатин A4; аналог комбретастатину; конагенін; крамбесцидин 816; криснатол; криптофіцин 8; похідні криптофіцину A; курацин A; циклопентантрахінони; циклоплатам; ципеміцин; окфосфат цитарабіну; цитолітичний фактор; цитостатин; дакліксимаб; децитабін; дегідродидемнін B; деслорелін; дексаметазон; дексифосфамід; декстразоксан; дексверапамил; діазиквон; дидемнін B; дидокс; діетилнорспермін; дигідро-5-азацитидин; дигідротаксол, 9-дигідротаксол; діоксаміцин; дифенілспіромустин; доцетоксел; докозанол; доласетрон; доксифлуридин; дролоксифен; дронабінол; дуокарміцин SA; ебселен; екомустин; еделфозин; едреколомаб; ефлорнітин; елемен; емитефур; епірубіцин; епістерид; аналог естрамустину; агоністи естрогену; антагоністи естрогену; етанідазол; фосфат етопозиду; екземестан; фадрозол; фазарабін; фенретинід; філграстим; фінастерид; флавопіридол; флезеластин; флуастерон; флударабін; гідрохлорид фтордауноруніцину; форфенімекс; форместан; фостриецин; фотемустин; тексаферин-гадоліній; нітрат галію; галоцитабін; ганірелікс; інгібітори желатинази; гемцитабін; інгібітори глутатіону; гепсульфам; герегулін; гексаметиленбісацетамід; гіперицин; ібандронова кислота; ідарубіцин; ідоксифен; ідрамантон; ілмофозин; іломастат; імідазоакридони; іміхімод; імуностимулюючі пептиди; інгібітори рецептора інсулінподібного фактора росту 1; агоністи інтерферону; інтерферони; інтерлейкіни; йобенгуан; йододоксорубіцин; іпомеанол, 4-іпомеанол; іроплакт; ірзогладин; ізобенгазол; ізогомоголіхондрин B; ітасетрон; ясплакінолід; кагалалід F; ламеларин-N-триацетат; ланреотид; лейнаміцин; ленограстим; сульфат лентинану; лептолстатин; летрозол; фактор інгібування лейкозу; лейкоцитарний альфа-інтерферон; лейпролід-естроген-прогестерон; лейпрорелін; левамізол; ліарозол; аналог поліаміну з прямим ланцюгом; ліпофільний дисахаридний пептид; ліпофільні сполуки платини; лісоклінамід 7; лобаплатин; ломбрицин; лометрексол; лонідамін; лозоксантрон; ловастатин; локсорибін; луртотекан; тексафірин-лютецій; лізофілін; літичні пептиди; майтанзин; маностатин A; маримастат; мазопрокол; маспін; інгібітори матрилізину; інгібітори металопротеїнази матрикса; меногарин; мербарон; метерелін; метіоніназа; метоклопрамід; інгібітор MIF; міфепристон; мілтефозин; міримостим; дволанцюжкова РНК із помилковим спарюванням основ; мітогуазон; мітолактол; аналоги мітоміцину; мітонафид; мітотоксиновий фактор росту фібробластів - сапорин;

мітоксантрон; мофаротен; молграмостим; моноклональне антитіло; людський хоріонічний гонадотропін; монофосфорил-ліпід А + клітинна стінка міобактерій sk; мопідамол; інгібітор гена резистентності до багатьох лікарських засобів; терапевтичний засіб на основі інгібітору 1 багатьох пухлин; протираковий засіб на основі гірчичного газу; мікапероксид В; екстракт клітинної стінки мікобактерій; міріапорон; N-ацетилдиналін; N-заміщені бензаміди; нафарелін; нагрестип; налоксон+пентазоцин; напавин; нафтерпін; нартограстим; недаплатин; неморубіцин; неридронова кислота; нейтральна ендопептидаза; нілутамід; нізаміцин; модулятори на основі оксиду азоту; антиоксидант нітроксид; нітрулін; О-6-бензилгуанін; октреотид; окиценон; олігонуклеотиди; онапристон; ондансетрон; ондансетрон; орацин; цитокіновий індуктор для перорального введення; ормаплатин; озатерон; оксаліплатин; оксауноміцин; паклітаксел; аналоги паклітакселу; похідні паклітакселу; палауамін; пальмітоїлтізоксин; памідронова кислота; панакситриол; паноміфен; парабіктин; пазеліптин; пегаспаргаза; пелдезин; полісульфат пентозану-натрію; пентостатин; пентрозол; перфлуброн; перфосфамід; периліловий спирт; феназиноміцин; фенілацетат; інгібітори фосфатази; піцибаніл; гідрохлорид пілокарпіну; пірарубіцин; піритрексим; плацетин А; плацетин В; інгібітор активатора плазміногену; платиновий комплекс; сполуки платини; комплекси "платина-триамін"; порфімер-натрій; порфіроміцин; преднізон; пропіл-біс-акридон; простагландин J2; інгібітори протеасоми; імунний модулятор на основі білка А; інгібітор протеїнкінази С; інгібітори протеїнкінази С; мікроалгал; інгібітори протеїнтирозинфосфатази; інгібітори пурин-нуклеозид-фосфорилази; пурпурини; піразолоакридин; кон'югат "піридоксилований гемоглобін-поліоксіетилен"; антагоністи raf; ралтитрексед; рамосетрон; інгібітори фарнезил-протеїнтрансферази ras; інгібітори ras; інгібітор ras-GAP; деметилований ретелліптин; етидронат ренію Re 186; ризоксин; рибозими; ретинамід RII; роглетимід; рохітукін; ромутрид; рохінімекс; рубігінон В1; рубоксил; сафінгол; саїнтопін; SarCNU; саркофітол А; сарграмостим; міметики Sdi 1; семустин; асоційований зі старінням інгібітор 1; смислові олігонуклеотиди; інгібітори передачі сигналу; модулятори передачі сигналу; одноланцюжковий антигензв'язувальний білок; сизофіран; собузоксан; борокаптат натрію; фенілацетат натрію; сольверол; білок, що зв'язується із соматомідином; сонермін; спарфозинова кислота; спікаміцин D; спіромустин; спленопентин; спонгістатин 1; скваламін; інгібітор стовбурових клітин; інгібітори розподілу стовбурових клітин; стипіамід; інгібітори стромелізину; сульфінозин; антагоніст суперактивного вазоактивного кишкового пептиду; сурадиста; сурамін; сваінсонін; синтетичні глікозаміноглікани; таллімустин; метйодид тамоксифену; тауромустин; тазаротен; текогалан-натрій; тегафур; телурапірилій; інгібітори теломерази; тенопорфін; темозоломід; теніпозид; тетрахлордекаоксид; тетразомін; таліблastин; тіокоралін; тромбопоетин; міметик тромбопоетину; тималфазин; агоніст рецептора тимопоетину; тимотринан; тиреоїдстимулюючий гормон; етилетіопурпуринолово; тирапазамін; біхлорид титаноцену; топсентин; тореміфен; фактор тотипотентних стовбурових клітин; інгібітори трансляції; третиноін; триацетилуридин; трицирибін; триметрексат; трипторелін; тропісетрон; туростерид; інгібітори тирозинкінази; тирфостини; інгібітори UBC; убенімекс; фактор інгібування росту, який походить від урогенітального синуса; антагоністи урокіназного рецептора; вапреотид; варіолін В; векторна система; еритроцитарний фактор для генотерапії; веларезол; верамін; вердини; вертепорфін; вінорелбін; вінксалтин; вітаксин; ворозол; занотерон; зеніплатин; зиласкорб і зиностатиновий стималамер. Переважними додатковими протираковими лікарськими засобами є 5-фторурацил і лейковорин.

Прикладами терапевтичних антитіл, які можуть бути використані в способах відповідно до винаходу, є, але не обмежуються ними, ZENAPAX® (даклізумаб) (Roche Pharmaceuticals, Switzerland), що являє собою імуносупресорне гуманізоване моноклональне анти-CD25 антитіло, використовуване для попередження гострого відторгнення ниркового алотрансплантата; PANOREX™, який являє собою мишаче антитіло IgG2a проти антигену клітинної поверхні 17-1A (Glaxo Wellcome/Centocor); BEC2, що являє собою мишаче антиідіотипове антитіло IgG (проти епітопа GD3) (ImClone System); IMC-C225, що являє собою химерне анти-EGFR антитіло IgG (ImClone System); VITAXIN™, що являє собою гуманізоване антитіло проти інтегрину αVβ3 (Applied Molecular Evolution/MedImmune); Smart M195, що являє собою гуманізоване анти-CD33 антитіло IgG (Protein Design Lab/Kanebo); LYMPHOCIDE™, що являє собою гуманізоване анти-CD22 антитіло IgG (Immunomedics); ICM3, що являє собою гуманізоване анти-ICAM3 антитіло (ICOS Pharm); IDEC-114, що являє собою "приматизоване" анти-CD80 антитіло (IDEC Pharm/Mitsubishi); IDEC-131, що являє собою гуманізоване анти-CD40L антитіло (IDEC/Eisai); IDEC-151, що являє собою "приматизоване" анти-CD4 антитіло (IDEC); IDEC-152, що являє собою "приматизоване" анти-CD23 антитіло (IDEC/Seikagaku); анти-CD3 антитіло SMART, що являє собою гуманізоване анти-CD3 антитіло IgG (Protein Design Lab); 5G1.1, що являє собою гуманізоване антитіло проти фактора комплементу 5 (C5) (Alexion

Pharm); D2E7, що являє собою гуманізоване анти-TNF-α антитіло (CAT/BASF); CDP870, що являє собою гуманізований Fab-фрагмент анти-TNF-α антитіла (Celltech); IDEC-151, що являє собою "приматизоване" анти-CD4 антитіло IgG1 (IDEC Pharm/SmithKline Beecham); MDX-CD4, що являє собою людське анти-CD4 антитіло Ig (Medarex/Eisai/Genmab); CDP571, що являє собою гуманізоване анти-TNF-α антитіло IgG4 (Celltech); LDP-02, що являє собою гуманізоване анти-α4β7 антитіло (LeukoSite/Genentech); OrthoClone OKT4A, що являє собою гуманізоване анти-CD4 антитіло IgG (Ortho Biotech); ANTOVA™, що являє собою гуманізоване анти-CD40L антитіло IgG (Biogen); ANTEGREN™, що являє собою гуманізоване анти-VLA-4 антитіло IgG (Elan); і CAT-152, що людське анти-TGF-β_2 антитіло (Cambridge Ab Tech). Інші приклади терапевтичних антитіл, що можуть бути використані відповідно до даного винаходу, представлені в таблиці 8.

Таблиця 8

Протиракові терапевтичні антитіла

Компанія	Продукт	Хвороба	Мішень
Abgenix AltaRex	ABX-EGF OvaRex BravaRex	Рак Рак яєчника Метастазуючий рак	Рецептор EGF Пухлинний антиген CA125 Пухлинний антиген MUC1
Antisoma	Theragyn (пемтумомаб-ітрій-90) Therex	Рак яєчника Рак молочної залози	Антиген PEM Антиген PEM
Boehringer Ingelheim	Біватузумаб	Рак голови і шиї	CD44
Centocor/J&J Corixa	Panorex ReoPro ReoPro ReoPro Bexocar	Рак прямої й ободової кишки PTCA Гострий IM Ішемічний інсульт НХЛ	17-1A gp IIIb/IIIa gp IIIb/IIIa gp IIIb/IIIa CD20
CRC Technology	MAb, ідіотипове 105AD7	Рак прямої й ободової кишки, вакцина	gp72
Crucell	Анти-EpCAM	Рак	Ep-CAM
Cytoclonal	MAb, рак легень	Недрібноклітинний рак легень	NA
Genentech	Герцептин Герцептин Ритуксан Ритуксан MAb-VEGF MAb-VEGF	Метастазуючий рак молочної залози Рання стадія раку молочної залози Рецидивуюча/яка не піддається лікуванню низькозлоякісна або фолікулярна НХЛ Середньозлоякісна і високозлоякісна НХЛ Метастазуюча NSCLS (недрібно-клітинна карцинома легень) Метастазуючий рак прямої й ободової кишки	HER-2 HER-2 CD20 CD20 VEGF VEGF
	AMD Fab E-26 (2-ої генерації) gen. IgE)	Вікова дегенерація жовтої плями Алергійна астма і риніт	CD18 IgE
IDEC	Зевалин (Ритуксан + ітрій-90)	Низькозлоякісна фолікулярна, рецидивуюча або яка не піддається лікуванню CD20-позитивна B-клітинна НХЛ і НХЛ, що не піддається лікуванню ритуксимабом	CD20

Компанія	Продукт	Хвороба	Мішень
ImClone	Цетуксимаб + інотекан Цетуксимаб + цисплатин і променева терапія Цетуксимаб + гемцитабін Цетуксимаб + цисплатин + 5FU або таксол Цетуксимаб + карбоплатин + паклітаксел Цетуксимаб + цисплатин Цетуксимаб + променева терапія BEC2 + бацила Кальметта-Герена BEC2 + бацила Кальметта-Герена IMC-1C11	Яка не піддається лікуванню карцинома прямої й ободової кишки Діагностований de novo або рецидивуючий рак голови і шиї Діагностована de novo метастазуюча карцинома підшлункової залози Рецидивуючий або метастазуючий рак голови і шиї Діагностована de novo недрібноклітинна карцинома легень Рак голови і шиї (велике неоперабельне локально-регіональне захворювання і метастази в периферичні ділянки) Локально прогресуюча карцинома голови і шиї Дрібноклітинна карцинома легень Меланома Рак прямої й ободової кишки з метастазами в печінку	Рецептор EGF Рецептор EGF Рецептор EGF Рецептор EGF Рецептор EGF Рецептор EGF Рецептор EGF Міметик гангліозиду GD3 Міметик гангліозиду GD3 VEGF-рецептор
ImmonoGen	nuC242-DMl	Рак прямої й ободової кишки, шлунка і підшлункової залози	nuC242
ImmunoMedics	LymphoCide LymphoCide Y-90 CEA-Cide CEA-Cide Y-90 CEA-Scan (Tc-99m-мічений арцитумомаб) CEA-Scan (Tc-99m-мічений арцитумомаб) CEA-Scan (Tc-99m-мічений арцитумомаб) CEA-Scan (Tc-99m-мічений арцитумомаб) LeukoScan (Tc-99m-мічений сулесомаб) LeukoScan (Tc-99m-мічений) AFP-Scan (Tc-99m-мічений)	Неходжкінська лімфома Неходжкінська лімфома Метастазуючі солідні пухлини Метастазуючі солідні пухлини Рак прямої й ободової кишки (рентгенограма) Рак молочної залози (рентгенограма) Рак легень (рентгенограма) Післяопераційні пухлини (рентгенограма) Інфекція м'яких тканин (рентгенограма) Лімфоми (рентгенограма) Рак зародкових клітин печінки 7 (рентгенограма)	CD22 CD22 CEA CEA CEA CEA CEA CEA CD22 AFP
Intracel	HumaRAD-HN (+ ітрій-90) HumaSPECT	Рак голови і шиї Візуалізація прямої й ободової кишки	NA NA
Medarex MedImmune Merck KGaA	MDX-101(CTLA-4) MDX-210 (надекспресія her-2) MDX-210/MAK Вітаксин MAb 425 IS-IL-2	Рак передміхурової залози й інших органів Рак передміхурової залози Рак Рак Різні ракові захворювання Різні ракові захворювання	CTLA-4 HER-2 HER-2 $\alpha v\beta_3$ Рецептор EGF Ep-CAM

Компанія	Продукт	Хвороба	Мішень
Millennium NeoRx	Campath (алемтузумаб) CD20-стрептавідин (+ біотин-ітрій 90) Авідицин (альбумін + NRLU13)	Хронічний лімфо-цитарний лейкоз Неходжкінська лімфома Метастазуючий рак	CD52 CD20 NA
Peregrine	Онколім (+ йод-131) Cotara (+ йод-131)	Неходжкінська лімфома Неоперабельна злоякісна гліома	HLA-DR 10 бета ДНК-асоційовані білки
Pharmacia Corporation	C215 (+ стафіло-коковий ентеротоксин) MAb, рак легень/нирок Наколомаб тафенатокс (C242 + стафіло-коковий ентеротоксин)	Рак підшлункової залози Рак легень і нирок Рак товстої кишки і підшлункової залози	NA NA NA
Protein Design Labs	Нувіон SMART M195 SMART ID10	Т-клітинні злоякісні пухлини AML НХЛ	CD3 CD33 Антиген HLA-DR
Titan	CEAVac TriGem TriAb	Прогресуючий рак прямої й ободової кишки Метастазуюча меланома і дрібноклітинний рак легень Метастазуючий рак молочної залози	CEA GD2-гангліозид MUC-1
Trilex	CEAVac TriGem TriAb	Прогресуючий рак прямої й ободової кишки Метастазуюча меланома і дрібноклітинний рак легень Метастазуючий рак молочної залози	CEA GD2-гангліозид MUC-1
Viventia Biotech	Радіоактивно мічене NovoMAb-G2 Monopharm C GlioMAb-H (+ токсин гелонін)	Неходжкінська лімфома Карцинома прямої й ободової кишки і підшлункової залози Гліома, меланома і нейробластома	NA Антиген SK-1 NA
Xoma	Ритуксан Ритуксан ING-1	Рецидивуюча/яка не піддається лікуванню низькозлоякісна або фолікулярна НХЛ Середньозлоякісна і високозлоякісна НХЛ Аденокарцинома	CD20 CD20 Ep-CAM

5.5.6. Імуномодулюючі і протизапальні засоби

Даний винахід стосується способів лікування аутоімунних і запальних захворювань, які включають уведення молекул відповідно до винаходу в комбінації з іншими терапевтичними агентами. Прикладами імуномодулюючих агентів є, але не обмежуються ними, метотрексат, ENBREL, REMICADE™, лефлуномід, циклофосфамід, циклоспорин A, макролідні антибіотики (наприклад, FK506 (такролімус)), метилпреднізолон (MP), кортикостероїди, стероїди, мікофенолят мофетил, рапаміцин (сиролімус), мізорибін, дезоксиспергуалін, брехінар, малононітрилоаміди (наприклад, лефлуномід), модулятори Т-клітинних рецепторів і модулятори цитокінових рецепторів.

Протизапальні засоби можуть бути з успіхом застосовані для лікування запальних і аутоімунних розладів, і в даний час найбільш часто застосовуються як стандартні засоби для лікування таких розладів. У способах відповідно до винаходу можуть бути використані будь-які протизапальні засоби, добре відомі фахівцям. Необмежувальними прикладами протизапальних засобів є нестероїдні протизапальні засоби (НПЗЗ), стероїдні протизапальні засоби, бета-агоністи, антихолінергічні засоби і метилксантини. Прикладами НПЗЗ є, але не обмежуються

ними, аспірин, ібупрофен, целекоксиб (CELEBREX™), диклофенак (VOLTAREN™), етодолак (LODINE™), фенопрофен (NALFON™), індометацин (INDOCIN™), кеторалак (TORADOL™), оксапрозин (DAYPRO™), набументон (RELAFEN™), суліндак (CLINORIL™), толментин (TOLECTIN™), рофекоксиб (VIOXX™), напроксен (ALEVE™, NAPROSYN™), кетопрофен (ACTRON™) і набуметон (RELAFEN™). Такі НПЗЗ функціонують за допомогою інгібування ферменту циклооксигенази (наприклад, COX-1 і/або COX-2). Прикладами стероїдних протизапальних засобів є, але не обмежуються ними, глюкокортикоїди, дексаметазон (DECADRON™), кортизон, гідрокортизон, преднізон (DELTASONE™), преднізолон, триамцинолон, азулфідин і ейкозаноїди, такі як простагландини, тромбоксани і лейкротрієни.

Необмежувальні приклади антитіл, що можуть бути використані для лікування або попередження запальних розладів у комбінації з молекулами відповідно до винаходу, представлені в таблиці 9, а необмежувальні приклади антитіл, що можуть бути використані для лікування або попередження аутоімунного розладу, представлені в таблиці 10.

Таблиця 9

Терапевтичні антитіла, використовувані для лікування запальних захворювань

Назва антитіла	Антиген-мішень	Тип продукту	Ізотип	Спонсори	Показання
5G1.1	Комплемент (C5)	Гуманізований	IgG	Alexion Pharm Inc	Ревматоїдний артрит
5G1.1	Комплемент (C5)	Гуманізований	IgG	Alexion Pharm Inc	СЧВ
5G1.1	Комплемент (C5)	Гуманізований	IgG	Alexion Pharm Inc	Нефрит
5G1.1-SC	Комплемент (C5)	Гуманізований	ScFv	Alexion Pharm Inc	Кардіопульмональне шунтування
5G1.1-SC	Комплемент (C5)	Гуманізований	ScFv	Alexion Pharm Inc	Інфаркт міокарда
5G1.1-SC	Комплемент (C5)	Гуманізований	ScFv	Alexion Pharm Inc	Ангіопластика
ABX-CBL	CBL	Людський		Abgenix Inc	Реакція "трансплантат проти хазяїна" (GvHD)
ABX-CBL	CD 147	Мишачий	IgG	Abgenix Inc	Відторгнення алотрансплан-тата
ABX-IL8	IL-8	Людський	IgG2	Abgenix Inc	Псоріаз
Antegren	VLA-4	Гуманізований	IgG	Athena/Elan	Розсіяний склероз
Анти-CD11a	CD11a	Гуманізований	IgG1	Genentech Inc/Xoma	Псоріаз
Анти-CD18	CD18	Гуманізований	Fab'2	Genentech Inc	Інфаркт міокарда
Анти- LFA1	CD18	Мишачий	Fab'2	Pasteur-Merieux/ Immunotech	Відторгнення алотрансплантата
Antova	CD40L	Гуманізований	IgG	Biogen	Відторгнення алотрансплантата
Antova	CD40L	Гуманізований	IgG	Biogen	СЧВ
BTI-322	CD2	Щурячий	IgG	Medimmune Inc	GvHD, Псоріаз
CDP571	TNF-альфа	Гуманізований	IgG4	Celltech	Хвороба Крона
CDP571	TNF-альфа	Гуманізований	IgG4	Celltech	Ревматоїдний артрит
CDP850	E-селектин	Гуманізований		Celltech	Псоріаз
Corsevin M	Фактор- VII	Химерний		Centocor	Антикоагулянт
D2E7	TNF-альфа	Людський		CAT/BASF	Ревматоїдний артрит
Hu23F2G	CD11/18	Гуманізований		ICOS Pharm Inc	Розсіяний склероз
Hu23F2G	CD11/18	Гуманізований	IgG	ICOS Pharm Inc	Інсульт
IC14	CD14			ICOS Pharm Inc	Токсичний шок
ICM3	ICAM-3	Гуманізований		ICOS Pharm Inc	Псоріаз

Назва антитіла	Антиген-мішень	Тип продукту	Ізотип	Спонсори	Показання
IDEC-114	CD80	Приматизированний		IDEC Pharm/ Mitsubishi	Псоріаз
IDEC-131	CD40L	Гуманізований		IDEC Pharm/Eisai	СЧВ
IDEC-131	CD40L	Гуманізований		IDEC Pharm/Eisai	Розсіяний склероз
IDEC-151	CD4	Приматизований	IgG1	IDEC Pharm/Glaxo SmithKline	Ревматоїдний артрит
IDEC-152	CD23	Приматизований		IDEC Pharm	Астма/алергія
Інфліксимаб	TNF-альфа	Химерний	IgG1	Centocor	Ревматоїдний артрит
Інфліксимаб	TNF-альфа	Химерний	IgG1	Centocor	Хвороба Крона
LDP-01	бета 2-інтегрин	Гуманізований	IgG	Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	Інсульт
LDP-01	бета 2-інтегрин	Гуманізований	IgG	Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	Відторгнення алотрансплантата
LDP-02	альфа 4-бета 7	Гуманізований		Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	Виразковий коліт
MAK-195F	TNF-альфа	Мишачий	Fab'2	Knoll Pharm, BASF	Токсичний шок
MDX-33	CD64 (FcR)	Людський		Medarex/Centeon	Аутоімунні гематологічні розлади
MDX-CD4	CD4	Людський	IgG	Medarex/Eisai/Genmab	Ревматоїдний артрит
MEDI-507	CD2	Гуманізований		Medimmune Inc	Псоріаз
MEDI-507	CD2	Гуманізований		Medimmune Inc	GvHD
OKT4A	CD4	Гуманізований	IgG	Ortho Biotech	Відторгнення алотрансплантата
OrthoClo ne OKT4A	CD4	Гуманізований	IgG	Ortho Biotech	Аутоімунне захворювання
Orthoclone/ анти-CD3 OKT3	CD3	Мишачий	mIgG2a	Ortho Biotech	Відторгнення алотрансплантата
RepPro/ Abciximab	gpIIbIIIa	Химерний	Fab	Centocor/Lilly	Ускладнення після коронарної ангіопластики
rhuMab-E25	IgE	Гуманізований	IgG1	Genentech/No vartis/Tanox Biosystems	Астма/алергія
SB-240563	IL5	Гуманізований		GlaxoSmithKline	Астма/алергія
SB-240683	IL4	Гуманізований		GlaxoSmithKline	Астма/алергія
SCH55700	IL5	Гуманізований		Celltech/Schering	Астма/алергія
Simulect	CD25	Химерний	IgG1	Novartis Pharm	Відторгнення алотрансплантата
SMART, анти-CD3	CD3	Гуманізований		Protein Design Lab	Аутоімунне захворювання
SMART, анти-CD3	CD3	Гуманізований		Protein Design Lab	Відторгнення алотрансплантата
SMART, анти-CD3	CD3	Гуманізований	IgG	Protein Design Lab	Псоріаз
Zenapax	CD25	Гуманізованний	IgG1	Protein Design Lab/Hoffman-La Roche	Відторгнення алотрансплантата

Таблиця 10

Терапевтичні антитіла для лікування аутоімунних розладів

Антитіло	Показання	Антиген-мішень
ABX-CBL		Антитіло проти антигену CBL на Т-клітинах, В-клітинах і NK-клітинах, повністю людське антитіло від Xenomouse
5з8 (антитіло проти антигену CD40)	Випробування фази II припиняли в жовтні 1999 р. і оцінювали "побічні ефекти»	CD-40
IDEC 131	Системний червоний вовчак (СЧВ)	Гуманізоване анти-CD40 антитіло
IDEC 151	Ревматоїдний артрит	Приматизоване анти-CD4 антитіло
IDEC 152	Астма	Приматизоване анти-CD23 антитіло
IDEC 114	Псоріаз	Приматизоване анти-CD80 антитіло
MEDI-507	Ревматоїдний артрит; розсіяний склероз; хвороба Крона; псоріаз	анти-CD2 антитіло
LDP-02 (анти-B7 mAb)	Запальне захворювання кишечнику, хвороба Крона, виразковий коліт	Рецептор інтегрину a4b7 на лейкоцитах
SMART, Антитіло проти інтерферону гама	Аутоімунні розлади	Антитіло проти інтерферон-гамма
Вертепортин	Ревматоїдний артрит	
MDX-33	Хвороби крові, які викликаються аутоімунними реакціями, ідіопатична тромбоцитопенічна пурпура (ITP), аутоімунна гемолітична анемія	Моноклональне антитіло проти рецепторів FcRI
MDX-CD4	Лікування ревматоїдного артриту й інших аутоімунних захворювань	Моноклональне антитіло проти молекули рецептора CD4
VX-497	Аутоімунні розлади, розсіяний склероз, ревматоїдний артрит, запальне захворювання кишечнику, вовчак, псоріаз	Інгібітори інозин-монофосфат-дегідрогенази (ферменту, необхідного для продукування нової РНК і ДНК, використовуваних для продукування нуклеотидів, необхідних для проліферації лімфоцитів)
VX-740	Ревматоїдний артрит	Інгібітор ICE, інтерлейкіну-1 бета (конвертуючого ферменту шляхів регуляції, що викликають агресивну імунну відповідь)
VX-745	специфічне до запалення і що бере участь у хімічній передачі сигналу запуску імунної відповіді і прогресування запалення	Інгібітор кінази P38MAP, тобто активованої мітогеном протеїнкінази
Enbrel (етанерцепт)		TNF-мішень (фактор некрозу пухлини)
IL-8		повністю людське моноклональне антитіло проти IL-8 (інтерлейкіну 8)

Антитіло	Показання	Антиген-мішень
Apogen MP4		Рекомбінантний антиген, що селективно руйнує асоційовані з захворюванням Т-клітини і індукує апоптоз Т-клітин, які елімінуються за допомогою запрограмованої загибелі клітин, що більше не атакують свої власні клітини в організмі, тобто, індукує апоптоз мішень-специфічних Т-клітин, які зв'язуються з апогеном

5.5.7. Агенти, які можуть бути використані для лікування інфекційного захворювання

У деяких варіантах винаходу молекули відповідно до винаходу можуть бути введені в комбінації з терапевтично або профілактично ефективною кількістю одного або більше додаткових відомих терапевтичних засобів для лікування і/або попередження інфекційного захворювання. У даному винаході розглядається застосування молекул відповідно до винаходу в комбінації з відомими антибіотиками для лікування і/або попередження інфекційного захворювання. Антибіотиками, які можуть бути використані в комбінації з молекулами відповідно до винаходу, є, але не обмежуються ними, макролід (наприклад, тобраміцин (Tobi®)), цефалоспорин (наприклад, цефалексин (Keflex®), цефрадин (Velosef®), цефуроксим (Ceftin®), цефпрозил (Cefzil®), цефаклор (Ceclor®), цефіксим (Suprax®) або цефадроксил (Duricef®)), кларитроміцин (наприклад, кларитроміцин (Biaxin®)), еритроміцин (наприклад, еритроміцин (EMycin®)), пеніцилін (наприклад, пеніцилін V (V-Cillin K® або Pen Vee K®)) або хінолон (наприклад, офлоксацин (Floxin®), ципрофлоксацин (Cipro®) або норфлоксацин (Noroxin®)), аміноглікозидні антибіотики (наприклад, апраміцин, арбекацин, бамберміцини, бутирозин, дибекацин, неоміцин, ундециленат, нетилміцин, паромоміцин, рибостаміцин, сисоміцин і спектиноміцин), амфеніколові антибіотики (наприклад, азидамфенікол, хлорамфенікол, флорфенікол і тіамфенікол), ансаміцинові антибіотики (наприклад, рифамід і рифампін), карбацефеми (наприклад, лоракарбеф), карбапенеми (наприклад, біапенем і іміпенем), цефалоспорини (наприклад, цефаклор, цефадроксил, цефамандол, цефатризин, цефаседон, цефозопран, цефпримізол, цефпірамід і цефпіром), цефаміцини (наприклад, цефбуперазон, цефметазол і цефмінокс), монобактами (наприклад, азтрионам, карумонам і тигемонам), оксацефеми (наприклад, фломоксеф і моксалактам), пеніциліни (наприклад, амдиноцелін, амдиноцилін півоксил, амоксицилін, бакампіцилін, бензилпеницилінова кислота, бензилпеницилін-натрій, епіцилін, фенбеніцилін, флоксацилін, пенамцилін, гідройодид пенетамату, о-бенетамінпеніцилін, пеніцилін 0, пеніцилін V, пеніцилін V-бензатин, пеніцилін V-гідрабамін, пенімепіциклін і фенцигіцилін-калій), лінкозаміди (наприклад, кліндаміцин і лінкоміцин), амфоміцин, бацитрацин, капреоміцин, колістин, ендурацидин, енвіоміцин, тетрацикліни (наприклад, апіциклін, хлортетрациклін, кломоциклін і демеклоциклін), 2,4-діамінопіримідини (наприклад, бродимоприм), нітрофурани (наприклад, фуралтадон і хлорид фуразолію), хінолони і їхні аналоги (наприклад, циноксацин, клінафлоксацин, флумехін і грепаглоксацин), сульфонаміди (наприклад, ацетилсульфаметоксипіразин, бензилсульфамід, ноприлсульфамід, фталілсульфацетамід, сульфакризоїдин і сульфацетин), сульфони (наприклад, діатимосульфон, глюкосульфон-натрій і соласульфон), циклосерин, мупіроцин і туберин.

У деяких варіантах винаходу молекули відповідно до винаходу можуть бути введені в комбінації з терапевтично або профілактично ефективною кількістю одного або більше протигрибкових засобів. Протигрибковими засобами, які можуть бути використані в комбінації з молекулами відповідно до винаходу, є, але не обмежуються ними, амфотерицин B, ітраконазол, кетоконазол, флуконазол, інтратекал, флуцитозин, міконазол, бутоконазол, клотримазол, ністатин, терконазол, тіоконазол, циклопірокс, еконазол, галопрогрин, нафтифін, тербінафін, ундециленат і гризеофулдин.

У деяких варіантах винаходу молекули відповідно до винаходу можуть бути введені в комбінації з терапевтично або профілактично ефективною кількістю одного або більше противірусних засобів. Придатними противірусними засобами, що можуть бути використані в комбінації з молекулами відповідно до винаходу, є, але не обмежуються ними, інгібітори протеази, нуклеозидні інгібітори зворотної транскриптази, ненуклеозидні інгібітори зворотної

транскриптази і нуклеозидні аналоги. Прикладами противірусних засобів є, але не обмежуються ними, зидовудин, ацикловір, ганцикловір, відарабін, ідоксуридин, трифлуридин і рибавірин, а також фоскарнет, амантадин, римантадин, саквинавір, індинавір, ампренавір, лопінавір, ритонавір; альфа-інтерферони; адефовір, клевадин, ентекавір, плеконарил.

5.6. Вакцинна терапія

Даний винахід також охоплює застосування композиції відповідно до винаходу для індукування імунної відповіді проти антигенного або імуногенного агента, включаючи, але не обмежуючись ними, ракові антигени й антигени, що викликають інфекційні захворювання (приклади яких описані нижче). Вакцинні композиції відповідно до винаходу включають один або більш антигенних або імуногенних агентів, проти яких бажане виробляння імунної відповіді, де вказані один або більше антигенних або імуногенних агентів сенсибілізують варіантом антитіла відповідно до винаходу, що має підвищену афінність до FcγRIIIA. Вакцинні композиції відповідно до винаходу є особливо ефективними для виробляння імунної відповіді, переважно протективної імунної відповіді проти антигенного або імуногенного агента.

У деяких варіантах винаходу антигенний або імуногенний агент у вакцинних композиціях відповідно до винаходу містить вірус, проти якого бажане виробляння імунної відповіді. Віруси можуть бути рекомбінантними або химерними, переважно атенуйованими. Продукування рекомбінантних, химерних і атенуйованих вірусів може бути здійснено стандартними відомими методами. Даний винахід охоплює "живу" рекомбінантну вірусну вакцину або інактивовану рекомбінантну вірусну вакцину, приготовлену відповідно до даного винаходу. "Жива" вакцина може бути переважною, оскільки її розмноження в хазяях приводить до пролонгованої стимуляції імунної відповіді того самого типу і рівня, що спостерігається при природних інфекціях, і тому ця вакцина надає в основному тривалий імунітет. Одержання таких "живих" вакцинних препаратів на основі рекомбінантних вірусів може бути здійснене із застосуванням стандартних методів, що включають розмноження вірусу в клітинній культурі або в алантоїсній рідини курячого ембріона з наступним очищенням.

У конкретному варіанті винаходу рекомбінантний вірус є непатогенним для індивідуума, якому його вводять. Відповідно до цього, для застосування генетично сконструйованих вірусів з метою вакцинування, може знадобитися присутність ознак атенуювання цих штамів. Уведення відповідних мутацій (наприклад, делецій) у матриці, використовувані для трансфекції, дозволяє одержати нові віруси з ознаками атенуювання. Наприклад, специфічні місенс-мутації, асоційовані з чутливістю до температури або адаптовані до холоду, можуть бути делеційними мутаціями. Ці мутації повинні бути більш стабільними, ніж точкові мутації, асоційовані з чутливими до холоду або до зміни температури мутантами, а кількість реверсивних мутацій повинно бути вкрай мало. Техніка рекомбінантних ДНК, застосовувана для конструювання рекомбінантних вірусів, відома фахівцям і входить в обсяг даного винаходу. Так, наприклад, методи модифікації РНК-вірусов з мінус-ланцюгом відомі фахівцям і описані, наприклад, у патенті США № 5166057, що у всій своїй повноті вводиться в даний опис за допомогою посилання.

Альтернативно, химерні віруси з "суїцидними" властивостями можуть бути сконструйовані з метою їхнього застосування у вакцинних препаратах для внутрішньошкірного уведення відповідно до винаходу. Такі віруси повинні проходити тільки один або невелике число циклів реплікації в хазяїна. При використанні як вакцини рекомбінантний вірус повинен проходити обмежене число циклів реплікації і індукувати достатній рівень імунної відповіді, але він не повинен розмножуватися у людини і викликати захворювання. Альтернативно, інактивований ("убитий") вірус може бути отриманий відповідно до даного винаходу. Інактивовані вакцинні препарати можуть бути приготовані стандартними методами "знищення" химерних вірусів. Інактивовані вакцини є "убитими" у тому сенсі, що їхня інфекційність була нейтралізована. В ідеальному випадку інфекційність вірусу повинна бути нейтралізована так, щоб це не впливало на його імуногенність. Для одержання інактивованих вакцин химерні віруси можуть бути культивовані в клітинній культурі або в алантоїсній рідині курячого ембріона, а потім вони можуть бути очищені за допомогою зонального ультрацентрифугування, інактивовані формальдегідом або β-пропіолактоном і зібрані.

У деяких варіантах винаходу повністю чужорідні епітопи, включаючи антигени, які походять від інших вірусних або невірусних патогенів, можуть бути введені у вірус, який може бути використаний у вакцинних препаратах для внутрішньошкірного уведення відповідно до винаходу. Так, наприклад, антигени неспоріднених вірусів, таких як ВІЛ (gp160, gp120, gp41), паразитарні антигени (наприклад, малярійні антигени), бактеріальні, грибкові або пухлинні антигени можуть бути сконструйовані у вигляді атенуйованого штаму.

Фактично, будь-яка послідовність гетерологічного гена може бути сконструйована у вигляді химерних вірусів відповідно до винаходу, що можуть бути використані у вакцинних препаратах для внутрішньошкірного введення. Переважно, послідовностями гетерологічних генів є молекули і пептиди, що діють як модифікатори біологічних відповідей. Переважно, епітопи, які індукують протективну імунну відповідь на кожній з ряду патогенів, або антигени, що зв'язуються з нейтралізуючими антитілами, можуть експресуватися химерними вірусами або як частина цих химерних вірусів. Так, наприклад, послідовностями гетерологічних генів, що можуть бути сконструйовані у вигляді химерних вірусів відповідно до винаходу, є, але не обмежуються ними, гемаглютинін і нейрамінідаза вірусу грипу і парагрипу, і гібридні глікопротеїни, такі як глікопротеїни, які кодуються генами HN і F людського PIV3. В іншому варіанті винаходу послідовностями гетерологічних генів, що можуть бути сконструйовані у вигляді химерних вірусів, є послідовності, які кодують білки, що мають імуномодулюючу активність. Прикладами імуномодулюючих білків є, але не обмежуються ними, цитокіни, інтерферон типу 1, гамма-інтерферон, колонієстимулюючі фактори, інтерлейкін-1, -2, -4, -5, -6, -12 і антагоністи цих агентів.

В інших своїх варіантах, даний винахід охоплює патогенні клітини або віруси, переважно атенуйовані віруси, що експресують модифіковане антитіло на своїй поверхні.

В альтернативних варіантах винаходу вакцинні композиції відповідно до винаходу містять злитий поліпептид, де антигенний або імуногенний агент функціонально приєднаний до варіанта антитіла відповідно до винаходу, що має підвищену афінність до FcγRIIIA. Конструювання гібридних поліпептидів, використовуваних у вакцинних композиціях відповідно до винаходу, здійснюють із застосуванням рутинної техніки рекомбінантної ДНК, відомої середньому фахівцю в даній галузі.

Даний винахід також охоплює способи індукування в індивідуума толерантності шляхом уведення композиції відповідно до винаходу. Переважно, композиція, що підходить для індукування толерантності в індивідуума, містить антигенний або імуногенний агент, покритий варіантом антитіла відповідно до винаходу, де вказаний варіант антитіла має підвищену афінність до FcγRIIB. Не обмежуючи яким-небудь конкретним механізмом дії, автори винаходу лише відзначають, що такі композиції є ефективними для індукування толерантності за допомогою активації FcγRIIB-опосередковуваного інгібуючого шляху.

5.7. Композиції і способи введення

Даний винахід стосується способів і фармацевтичних композицій, що включають молекули відповідно до винаходу (тобто, діатіла), що містять множину епітоп-зв'язувальних доменів і необов'язково Fc-домен (або його частину). Даний винахід також стосується способів лікування, профілактики й ослаблення одного або більше симптомів, асоційованих із захворюванням, розладом або інфекцією, де вказані способи включають введення індивідууму ефективної кількості злитого білка або кон'югованої молекули відповідно до винаходу, або фармацевтичної композиції, що містить злитий білок або кон'юговану молекулу відповідно до винаходу. У переважному аспекті винаходу антитіло, злитий білок або кон'югована молекула є, в основному, очищеними (тобто, по суті, не містять речовин, які можуть обмежувати їхню ефективність або продукування небажаних побічних ефектів). У конкретному варіанті винаходу вказаним індивідуумом є тварина, переважно ссавець, такий як ссавець, що не є приматом (наприклад, корови, свині, коня, кішки, собаки, щура і т. п.), і примат (наприклад, мавпи, такі як собакоподібна мавпа і людина). У переважному варіанті винаходу вказаним індивідуумом є людина. В іншому переважному варіанті винаходу, антитіло відповідно до винаходу походить від організму, що належить до такого ж виду, як і індивідуум.

Фахівцям відомі різні системи доставки, і такими системами доставки, що можуть бути використані для введення композиції, що містить молекули відповідно до винаходу, є, наприклад, капсули типу ліпосом, мікрочастинки, мікрокапсули, рекомбінантні клітини, здатні експресувати антитіло або злитий білок, опосередковуваний рецептором ендоцитоз (див., наприклад, Wu et al. (1987) "Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System" J. Biol. Chem. 262:4429-4432); конструкції нуклеїнової кислоти як частини ретровірусного вектора або іншого вектора і т. п. Способами введення молекули відповідно до винаходу є, але не обмежуються ними, парентеральне введення (наприклад, внутрішньошкірне, внутрішньом'язове, внутрішньоочеревинне, внутрішньовенне і підшкірне введення), епідуральне введення і введення в слизову (наприклад, інтраназальне і пероральне введення). У конкретному варіанті винаходу молекули відповідно до винаходу уводять внутрішньом'язово, внутрішньовенно або підшкірно. Вказані композиції можуть бути введені будь-яким придатним способом, наприклад, шляхом уливання або ін'єкції ударної дози, за допомогою усмоктування епітеліальної або шкірно-слизовою вистилкою (наприклад, слизової порожнини рота, прямої

кишки і тонкого кишечнику і т. п.), а також вони можуть бути введені разом з іншими біологічно активними агентами. Уведення може бути системним або місцевим. Крім того, композиції можуть бути також уведені пульмонально, наприклад, з використанням інгалятора або аерозольного розпилювача, і препарату, що містить аерозольний агент. Див., наприклад, патенти США №№ 6019968; 5985320; 5985309; 5934272; 5874064; 5855913; 5290540 і 4880078; і публікації заявок PCT №№ WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; і WO 99/66903, що у всій своїй повноті вводяться в даний опис за допомогою посилання.

Даний винахід також стосується молекул відповідно до винаходу, упакованих у герметично закритий контейнер, такий як ампула або саше, на яких вказана кількість антитіла, що міститься в них. В одному з варіантів винаходу молекули відповідно до винаходу поставляються у вигляді сухого стерилізованих і ліофілізованого порошку або безводного концентрату в герметично закритому контейнері, і такі препарати можуть бути розведені, наприклад, водою або фізіологічним розчином до відповідних концентрацій, що підходять для введення людині. Переважно, молекули відповідно до винаходу поставляються у вигляді сухого стерильного ліофілізованого порошку в герметично закритому контейнері в уніфікованій дозі, що становить щонайменше 5 мг, більш переважно, щонайменше 10 мг, щонайменше 15 мг, щонайменше 25 мг, щонайменше 35 мг, щонайменше 45 мг, щонайменше 50 мг або щонайменше 75 мг. Ліофілізовані молекули відповідно до винаходу повинні зберігатися при температурі від 2 до 8 °C у контейнері, у якому вони були приготовані, і ці молекули повинні бути введені протягом 12 годин, переважно протягом 6 годин, 5 годин, 3 або годин 1 години після розведення. В альтернативному варіанті винаходу молекули відповідно до винаходу поставляються в рідкій формі в герметично закритому контейнері, де вказані кількість і концентрація молекули, злитого білка або кон'югованої молекули. Переважно, молекули відповідно до винаходу в рідкій формі поставляються в герметично закритому контейнері в кількості, що становить щонайменше 1 мг/мл, більш переважно щонайменше 2,5 мг/мл, щонайменше 5 мг/мл, щонайменше 8 мг/мл, щонайменше 10 мг/мл, щонайменше 15 мг/кг, щонайменше 25 мг/мл, щонайменше 50 мг/мл, щонайменше 100 мг/мл, щонайменше 150 мг/мл, щонайменше 200 мг/мл.

Кількість композиції відповідно до винаходу, ефективна для лікування, або попередження ослаблення одного або більше симптомів, асоційованих з розладом, може бути визначена стандартними клінічними методами. Точна доза, використовувана в такому препараті, також залежить від способу введення і від тяжкості стану і повинна бути визначена лікуючим лікарем для кожного пацієнта індивідуально. Ефективні дози можуть бути екстрапольовані виходячи з кривих "доза-відповідь", побудованих за даними, отриманим з використанням тест-систем in vitro або на моделях тварин.

Для діатіл, що входять в обсяг винаходу, доза, що вводиться пацієнту, звичайно становить від 0,0001 мг/кг до 100 мг/кг маси тіла пацієнта. Переважно, доза, що вводиться пацієнту, становить від 0,0001 мг/кг до 20 мг/кг, від 0,0001 мг/кг до 10 мг/кг, від 0,0001 мг/кг до 5 мг/кг, від 0,0001 до 2 мг/кг, від 0,0001 до 1 мг/кг, від 0,0001 мг/кг до 0,75 мг/кг, від 0,0001 мг/кг до 0,5 мг/кг, від 0,0001 мг/кг до 0,25 мг/кг, від 0,0001 до 0,15 мг/кг, від 0,0001 до 0,10 мг/кг, від 0,001 до 0,5 мг/кг, від 0,01 до 0,25 мг/кг або від 0,01 до 0,10 мг/кг маси тіла пацієнта. Доза і частота введення діатіл відповідно до винаходу можуть бути знижені або змінені шляхом посилення поглинання і пенетрації діатіл у тканині за допомогою модифікації діатіл, наприклад, такої як ліпідизація.

В одному з варіантів винаходу доза молекул відповідно до винаходу, що вводиться пацієнту, може становити від 0,01 мг до 1000 мг/день, у випадку застосування монотерапії. В іншому варіанті винаходу молекули відповідно до винаходу використовуються в комбінації з терапевтичними композиціями, і в цьому випадку доза, що вводиться пацієнту, нижча, ніж доза вказаних молекул, що вводяться при монотерапії.

У конкретному варіанті винаходу може виявитися бажаним уведення фармацевтичних композицій відповідно до винаходу місцево, тобто на ділянку, що вимагає лікування; і це може бути досягнуто способами, що включають, але не обмежуються ними, наприклад, місцеве уливання, ін'єкцію або імплантацію, де вказаний імплантат приготований з пористого, непористого або гелеподібного матеріалу, включаючи мембрани, такі як силастичні мембрани або волокна. Переважно, при введенні молекули відповідно до винаходу варто дотримуватися застережних заходів у випадку використання матеріалів, на яких не абсорбується вказана молекула.

В іншому варіанті винаходу композиції можуть бути доставлені у вигляді везикули, зокрема, у вигляді ліпосоми (див. Langer (1990) "New Methods Of Drug Delivery" Science 249:1527-1533); Treat et al, in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease і Cancer, Lopez-Berestein і Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-65 (1989); Lopez-Berestein, ibid., pp. 317-327; див., в основному, там же).

В іншому варіанті винаходу композиції можуть бути доставлені у вигляді системи з регульованим або пролонгованим вивільненням. Для приготування препаратів пролонгованого вивільнення, що містять одну або більше молекул відповідно до винаходу, може бути застосований будь-який відомий метод. Див., наприклад, патент США № 4526938; публікацію заявки PCT WO 91/05548; публікацію заявки PCT WO 96/20698; Ning et al. (1996) "Intratumoral Radioimmunotheraphy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel" Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song et al. (1995) "Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions" PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek et al. (1997) "Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application" Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; і Lam et al. (1997) "Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery" Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760, що у всій своїй повноті вводяться в даний опис за допомогою посилання. В одному з варіантів винаходу в системі з регульованим вивільненням може бути використаний насос (див. Langer, див. вище; Sefton, (1987) "Implantable Pumps" CRC Crit. Rev. Biomed. Eng. 14:201-240; Buchwald et al. (1980) "Long-Term, Continuous Intravenous Heparin Administration By An Implantable Infusion Pump In Ambulatory Patients With Recurrent Venous Thrombosis" Surgery 88:507-516; і Saudek et al. (1989) "A Preliminary Trial Of The Programmable Implantable Medication System For Insulin Delivery" N. Engl. J. Med. 321:574-579). В іншому варіанті винаходу для досягнення регульованого вивільнення антитіл можуть бути використані полімерні матеріали (див., наприклад, Medical Applications of Controlled Release, Langer & Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Levy et al. (1985) "Inhibition Of Calcification Of Bioprosthetic Heart Valves By Local Controlled-Release Diphosphonate" Science 228:190-192; During et al. (1989) "Controlled Release Of Dopamine From A Polymeric Brain Implant: In Vivo Characterization" Ann. Neurol. 25:351-356; Howard et al. (1989) "Intracerebral Drug Delivery In Rats With Lesion-Induced Memory Deficits" J. Neurosurg. 7(1):105-112); патент США № 5679377; патент США № 5916597; патент США № 5912015; патент США № 5989463; патент США № 5128326; публікацію заявки PCT № WO 99/15154; і публікацію заявки PCT № WO 99/20253). Прикладами полімерів, використовуваних у препаратах пролонгованого вивільнення, є, але не обмежуються ними, полі(2-гідроксіетилметакрилат), поліметилметакрилат, поліакрилова кислота, співполімер етилену і вінілацетату, поліметакрилова кислота, полігліколіди (PLG), поліангідриди, полі(N-вінілпіролідон), полівініловий спирт, поліакриламід, поліетиленгліколь, полілактиди (PLA), співполімер лактиду і гліколіду (PLGA) і поліортоефіри. В іншому варіанті винаходу система регульованого вивільнення може бути введена в ділянку, що знаходиться в безпосередній близькості від терапевтичної мішені (наприклад, у легені), і для цього може знадобитися тільки частина системної дози (див., наприклад, Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, див. вище, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). В іншому варіанті винаходу полімерні композиції, використовувані як імплантати регульованого вивільнення, застосовуються, як описано Dunn et al. (см. патент США 5945155). Цей конкретний метод оснований на терапевтичному ефекті in situ регульованого вивільнення біологічно активного матеріалу з полімерної системи. Імплантація може бути здійснена, по суті, на будь-якій ділянці тіла пацієнта, який потребує лікування. В іншому варіанті винаходу використовується неполімерна система пролонгованого вивільнення, де неполімерний імплантат організму індивідуума використовується як система доставки лікарського засобу. Після введення імплантату в організм, органічний розчинник імплантату буде дисоціювати, диспергуватися або вивільнятися з композиції в рідину, що оточує тканину, а неполімерний матеріал буде поступово коагулюватися або осаджуватися з утворенням твердої мікропористої матриці (див. патент США 5888533).

Системи регульованого вивільнення обговорюються в публікації Langer (1990 "New Methods Of Drug Delivery" Science 249:1527-1533). Для одержання препаратів пролонгованого вивільнення, що містять один або більше терапевтичних агентів відповідно до винаходу, може бути застосований будь-який відомий метод. Див., наприклад, патент США No. 4526938; публікації міжнародних заявок №№ WO 91/05548 і WO 96/20698; Ning et al. (1996) "Intratumoral Radioimmunotheraphy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel" Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song et al. (1995) "Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions" PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek et al. (1997) "Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application" Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; і Lam et al. (1997) "Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery" Proc. Int'l.

Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760, що у всій своїй повноті вводяться в даний опис за допомогою посилання.

У конкретному варіанті винаходу, у якому композицією відповідно до винаходу є нуклеїнова кислота, що кодує діатіло відповідно до винаходу, вказана нуклеїнова кислота може бути введена in vivo для стимуляції експресії кодованого нею діатіла, за допомогою її конструювання як частини відповідного експресійного вектора нуклеїнової кислоти і її введення таким чином, щоб вона проникала усередину клітини, наприклад, уведення з використанням ретровірусного вектора (див. патент США № 4980286), або введення шляхом прямої ін'єкції або шляхом бомбардування мікрочастинками (наприклад, за допомогою "рушниці", використовуваної в генній інженерії; Biolistic, Dupont), або шляхом сенсибілізації ліпідами або рецепторами клітинної поверхні або трансфікуючими агентами, або шляхом її введення у вигляді молекули, зв'язаної з гомеобокс-подібним пептидом, що, як відомо, проникає в ядро (див., наприклад, Jo Hot et al. (1991) "Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868), і т. п. Альтернативно, нуклеїнова кислота може бути введена усередину клітини і включена в ДНК клітину-хазяїна для експресії за допомогою гомологічної рекомбінації.

Лікування індивідуума терапевтично або профілактично ефективною кількістю молекул відповідно до винаходу може включати монотерапію або переважно комбіновану терапію. У переважному прикладі індивідууму вводять молекули відповідно до винаходу в дозі, що становить в межах приблизно від 0,1 до 30 мг/кг маси тіла один раз на тиждень, приблизно протягом 1-10 тижнів, більш переважно протягом 2-8 тижнів, ще більш переважно приблизно протягом 3-7 тижнів, а найбільше переважно приблизно протягом 4, 5 або 6 тижнів. В інших варіантах винаходу фармацевтичні композиції відповідно до винаходу вводять один раз на день, два рази на день або три рази на день. В інших варіантах винаходу вказані фармацевтичні композиції вводять один раз на тиждень, два рази на тиждень, раз на два місяці, раз на місяць, раз на шість тижнів, раз на два місяці, два рази на рік або один раз на рік. Слід також зазначити, що ефективна доза молекул, використовуваних для лікування, може бути збільшена або зменшена в порівнянні з дозою, що вводиться протягом курсу індивідуальної терапії.

5.7.1. Фармацевтичні композиції

Композиції відповідно до винаходу включають нерозфасовану масу лікарського засобу, використовувану для виробництва фармацевтичних композицій (наприклад, неочищених або нестерильних композицій) і фармацевтичних композицій (тобто, композицій, що підходять для введення даному індивідууму або пацієнту), що можуть бути використані для приготування уніфікованих лікарських форм. Такі композиції містять профілактично або терапевтично ефективну кількість описаного тут профілактичного і/або терапевтичного агента або комбінацію цих агентів і фармацевтично прийнятний носій. Переважно, композиції відповідно до винаходу містять профілактично або терапевтично ефективну кількість однієї або більше молекул відповідно до винаходу і фармацевтично прийнятний носій.

Даний винахід також охоплює фармацевтичні композиції, що містять молекулу діатіла відповідно до винаходу і терапевтичне антитіло (наприклад, пухлиноспецифічне моноклональне антитіло), яке є специфічним до конкретного ракового антигену, і фармацевтично прийнятний носій.

У конкретному варіанті винаходу термін "фармацевтично прийнятний" стосується засобів, дозволених Федеральними регуляторними органами або урядами штатів у США, або засобів, перерахованих у Фармакопеї США або в інших відомих Фармакопеях і призначених для уведення тваринам, зокрема людині. Термін "носій" означає розріджувач, ад'ювант (наприклад, ад'ювант Фрейнда (повний або неповний)), ексципієнт або носій, разом з якими вводять вказаний терапевтичний засіб. Такими фармацевтичними носіями можуть бути стерильні рідини, такі як вода й масло, включаючи вазелінове масло, масло тваринного походження, рослинну олію або синтетичне масло, такі як арахісова олія, соєва олія, мінеральне масло, кунжутна олія і т. п. При внутрішньовенному уведенні фармацевтичної композиції, переважним носієм є вода. Як рідкі носії можуть бути також використані фізіологічні розчини і водні розчини декстрози і гліцерину, переважно розчини для ін'єкцій. Придатними фармацевтичними ексципієнтами є крохмаль, глюкоза, лактоза, сахароза, желатин, солод, рис, борошно, крейда, силікагель, стеарат натрію, моностеарат гліцерину, тальк, хлорид натрію, сухе сепароване молоко, гліцерин, пропіленгліколь, вода, етанол і т. п. Композиція, якщо це необхідно, може також містити невелику кількість змочувальних або емульгуючих агентів, або pH-забуферювальних агентів. Такі композиції можуть бути приготовані у формі розчинів, суспензій, емульсії, таблеток, драже, капсул, порошків, препаратів пролонгованого вивільнення і т. п.

Загалом, інгредієнти композицій відповідно до винаходу поставляються або окремо, або в суміші в уніфікованій лікарській формі, наприклад, у вигляді сухого ліофілізованого порошку або безводного концентрату в герметично закритому контейнері, такому як ампула або саше, на яких вказана кількість активного агента. Якщо композицію вводять шляхом уливання, то вона може бути розфасована по бутлях для уливання, які містять стерильну воду або стерильний фізіологічний розчин для фармацевтичних цілей. Якщо композицію вводять шляхом ін'єкції, то ампула зі стерильною водою для ін'єкцій або з фізіологічним розчином може бути приготована так, щоб її інгредієнти були змішані до введення.

Композиції відповідно до винаходу можуть бути приготовані в нейтральних або в сольових формах. Фармацевтично прийнятними солями є, але не обмежуються ними, солі, утворені аніонами, такими як аніони соляної кислоти, фосфорної кислоти, оцтової кислоти, щавлевої кислоти, винної кислоти і т. п., і катіонами, такими як катіони натрію, калію, амонію, кальцію, гідроксиду заліза (3), ізопропіламіну, триетиламіну, 2-етиламіноетанолу, гістидину, прокаїну і т. п.

5.7.2. Генотерапія

У конкретному варіанті винаходу послідовності, що містять нуклеїнові кислоти і кодують молекули відповідно до винаходу, уводять з метою лікування, попередження або ослаблення одного або більше симптомів, асоційованих із захворюванням, розладом або інфекцією, методами генотерапії. Термін "генотерапія" означає терапію, здійснювану шляхом введення індивідууму експресованої або яка експресується нуклеїнової кислоти. У цьому варіанті винаходу нуклеїнові кислоти продукують кодоване ними антитіло або злитий білок, які опосередковують терапевтичний або профілактичний ефект.

У даному винаході можуть бути застосовані будь-які методи генотерапії, відомі фахівцям. Репрезентативні методи описані нижче.

Загальний опис методів генотерапії можна знайти в публікаціях Goldspiel et al. (1993) "Human Gene Therapy" Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu et al. (1991) "Delivery Systems For Gene Therapy" Biotherapy 3:87-95; Tolstoshev (1993), "Gene Therapy, Concepts, Current Trials And Future Directions" Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan (1993) "The Basic Science Of Gene Therapy" Science 260:926-932; і Morgan et al. (1993) "Human Gene Therapy" Ann. Rev. Biochem. 62:191-217. Загальновідомі методи рекомбінантних ДНК, що можуть бути застосовані, описані в посібнику Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); і Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990).

У переважному аспекті винаходу композиція відповідно до винаходу включає нуклеїнові кислоти, що кодують діатіло відповідно до винаходу, де вказані нуклеїнові кислоти є частиною експресійного вектора, експресуючого антитіло в придатному хазяїні. Зокрема, такі нуклеїнові кислоти мають промотори, переважно гетерологічні промотори, функціонально приєднані до що антитіло-кодуючої ділянки, де вказаний промотор є індуцибельним або конститутивним, і необов'язково, тканиноспецифічним. В іншому конкретному варіанті винаходу використовуються молекули нуклеїнової кислоти, у яких антитіло-кодуючі послідовності і будь-які інші потрібні послідовності фланковані ділянками, які стимулюють гомологічну рекомбінацію в потрібному сайті генома, що дозволяє здійснювати внутрішньохромосомну експресію антитіло-кодуючих нуклеїнових кислот (Koller et al. (1989) "Inactivating The Beta 2-Microglobulin Locus In Mouse Embryonic Stem Cells By Homologous Recombination" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; і Zijlstra et al. (1989) "Germ-Line Transmission Of A Disrupted Beta 2-Microglobulin Gene Produced By Homologous Recombination In Embryonic Stem Cells" Nature 342:435-438).

В іншому переважному аспекті винаходу, композиція відповідно до винаходу включає нуклеїнові кислоти, що кодують злитий білок, де вказані нуклеїнові кислоти є частиною експресійного вектора, експресуючого злитий білок у придатному хазяїні. Зокрема, такі нуклеїнові кислоти мають промотори, переважно гетерологічні промотори, функціонально приєднані до кодуючої ділянки, злитого білка, де вказаний промотор є індуцибельним або конститутивним і необов'язково тканиноспецифічним. В іншому конкретному варіанті винаходу використовуються молекули нуклеїнової кислоти, у яких кодуючі послідовності злитого білка і будь-які інші потрібні послідовності фланковані ділянками, що стимулюють гомологічну рекомбінацію в потрібному сайті генома, що дозволяє здійснювати внутрішньохромосомну експресію злитого білка.

Доставка нуклеїнових кислот індивідууму може бути здійснена безпосередньо, і в цьому випадку індивідууму безпосередньо вводять нуклеїнову кислоту або вектори, що несуть нуклеїнову кислоту, або опосередковано, і в цьому випадку клітини спочатку трансформують

нуклеїновими кислотами in vitro, а потім трансплантують індивідууму. Ці два підходи відомі, відповідно, як генотерапія in vivo або ex vivo.

У конкретному варіанті винаходу послідовності нуклеїнової кислоти безпосередньо вводять in vivo, де вони експресуються з утворенням кодованого продукту. Це може бути здійснено будь-якими різними методами, відомими фахівцям, наприклад, конструюванням нуклеїнових кислот як частини відповідного експресійного вектора нуклеїнової кислоти і його введенням таким чином, щоб він проникав усередину клітини, наприклад, уведенням з використанням дефектного або атенуйованого ретровірусного вектора або іншого вірусного вектора (див. патент США № 4980286); уведенням шляхом прямої ін'єкції "оголеної" ДНК; шляхом бомбардування мікрочастинками (наприклад, за допомогою "рушниці", використовуваної у генній інженерії; Biolistic, Dupont); шляхом сенсибілізації ліпідами або рецепторами клітинної поверхні або трансфікуючими агентами; інкапсулюванням з одержанням ліпосом, мікрочастинок або мікрокапсул; введенням у вигляді молекули, зв'язаної з пептидом, що, як відомо, проникає в ядро, або введенням у вигляді молекули, зв'язаної з розглянутим антигеном, що, як відомо, приводить до опосередковуваного рецептором ендоцитозу (див., наприклад, Wu et al. (1987) "Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System" J. Biol. Chem. 262:4429-4432) (де вказана нуклеїнова кислота може бути використана для націлювання на клітини конкретних типів, специфічно експресуючі рецептори), і т. п. В іншому варіанті винаходу можуть бути отримані комплекси "нуклеїнова кислота-антиген", у яких антиген містить фузогенний вірусний пептид, необхідний для руйнування ендосом, що дозволяє нуклеїновій кислоті уникнути розкладання під дією лізосом. В іншому варіанті винаходу нуклеїнова кислота може бути доставлена in vivo у клітину, специфічну до поглинання й експресії, шляхом націлювання на специфічний рецептор (див., наприклад, публікації заявок PCT WO 92/06180; WO 92/22635; W092/20316; W093/14188; WO 93/20221). Альтернативно, нуклеїнова кислота може бути введена усередину клітини і включена в ДНК клітину-хазяїна для експресії за допомогою гомологічної рекомбінації (Koller et al. (1989) "Inactivating The Beta 2-Microglobulin Locus In Mouse Embryonic Stem Cells By Homologous Recombination" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; і Zijlstra et al. (1989) "Germ-Line Transmission Of A Disrupted Beta 2-Microglobulin Gene Produced By Homologous Recombination In Embryonic Stem Cells" Nature 342:435-438).

У конкретному варіанті винаходу використовуються вірусні вектори, що містять послідовності нуклеїнової кислоти, які кодують молекулу відповідно до винаходу (наприклад, діатіло або злитий білок). Так, наприклад, може бути використаний ретровірусний вектор (див. Miller et al. (1993) "Use Of Retroviral Vectors For Gene Transfer And Expression" Meth. Enzymol. 217:581-599). Ці ретровірусні вектори містять компоненти, необхідні для "правильного" упакування вірусного генома й інтеграції в ДНК клітину-хазяїна. Послідовності нуклеїнової кислоти, що кодують антитіло або злитий білок, використовувані в генотерапії, клонують в один або більше векторів, що полегшує доставку нуклеотидної послідовності індивідууму. Більш докладний опис ретровірусних векторів можна знайти в публікації Boesen et al. (1993) "Circumvention Of Chemotherapy-Induced Myelosuppression By Transfer Of The Mdrl Gene" Biotherapy 6:291-302, де описане застосування ретровірусного вектора для доставки гена mdr 1 у гемопоетичні стовбурові клітини з метою надання цим клітинам ще більшої резистентності до хіміотерапії. Іншими роботами, у яких проілюстроване застосування ретровірусних векторів у генотерапії, є: Clowes et al. (1994) "Long-Term Biological Response Of Injured Rat Carotid Artery Seeded With Smooth Muscle Cells Expressing Retrovirally Introduced Human Genes" J. Clin. Invest. 93:644-651; Keim et al. (1994) "Retrovirus-Mediated Gene Transduction Into Canine Peripheral Blood Repopulating Cells" Blood 83:1467-1473; Salmons et al. (1993) "Targeting Of Retroviral Vectors For Gene Therapy" Human Gene Therapy 4:129-141; і Grossman et al. (1993) "Retroviruses: Delivery Vehicle To The Liver" Curr. Opin. Genetics and Devel. 3:110-114.

Іншими вірусними векторами, що можуть бути використані в генотерапії, є аденовіруси. Аденовіруси є особливо привабливими носіями для доставки генів в епітелій дихальних шляхів. Аденовіруси звичайно інфікують епітелій дихальних шляхів, що приводить до розвитку захворювання в легкій формі. Іншими мішенями для систем доставки на основі аденовірусів є печінка, центральна нервова система, ендотеліальні клітини і м'язи. Аденовіруси мають ту перевагу, що вони здатні інфікувати клітини, які не діляться. Опис генотерапії на основі аденовірусів можна знайти в публікації Kozarsky et al. (1993 "Gene Therapy: Adenovirus Vectors" Current Opinion in Genetics and Development 3:499-503). У публікації Bout et al. (1994 "Lung Gene Therapy: In Vivo Adenovirus-Mediated Gene Transfer To Rhesus Monkey Airway Epithelium" Human Gene Therapy, 5:3-10) продемонстроване застосування аденовірусних векторів для перенесення генів в епітелій дихальних шляхів макак-резусів. Інші випадки застосування аденовірусів у генотерапії описані в публікаціях Rosenfeld et al. (1991) "Adenovirus-Mediated Transfer Of A

Recombinant Alpha 1-Antitrypsin Gene To The Lung Epithelium In Vivo" Science 252:431-434; Rosenfeld et al. (1992) "In Vivo Transfer Of The Human Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene To The Airway Epithelium" Cell 68:143-155; Mastrangeli et al. (1993) "Diversity Of Airway Epithelial Cell Targets For In Vivo Recombinant Adenovirus-Mediated Gene Transfer" J. Clin. Invest. 91:225-234; у публікації заявки PCT WO94/12649; і в публікації Wang et al. (1995) "A Packaging Cell Line For Propagation Of Recombinant Adenovirus Vectors Containing Two Lethal Gene-Region Deletions" Gene Therapy 2:775-783. У переважному варіанті винаходу використовуються аденовірусні вектори.

У генотерапії можуть бути також використані аденоасоційовані віруси (AAV) (див., наприклад, Walsh et al. (1993) "Gene Therapy For Human Hemoglobinopathies" Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300 і патент США № 5436146).

Інший підхід генотерапії полягає в перенесенні гена в клітини в тканинній культурі з застосуванням таких методів, як електропорація, ліпофекція, трансфекція, опосередковувана фосфатом кальцію або інфікування вірусом. Звичайно метод перенесення включає перенесення селективного маркера в клітини. Потім ці клітини вміщують у відповідні умови відбору для виділення клітин, що поглинають і експресують перенесений ген. Після цього клітини вводять індивідууму.

У цьому варіанті винаходу нуклеїнову кислоту вводять у клітину до введення in vivo отриманої рекомбінантної клітини. Таке введення може бути здійснено будь-яким відомим методом, включаючи, але не обмежуючись ними, трансфекцію, електропорацію, мікроінжекцію, інфікування вірусним або бактеріофаговим вектором, що містить послідовності нуклеїнової кислоти; злиття клітин, перенесення генів, опосередковуване хромосомою, перенесення генів, опосередковуване мікроклітинами, злиття сферопластів і т. п. Фахівцям у даній галузі відома множина методів уведення чужорідних генів у клітини (див., наприклад, Loeffler et al. (1993) "Gene Transfer Into Primary And Established Mammalian Cell Lines With Lipopolyamine-Coated DNA" Meth. Enzymol. 217:599-618, Cotten et al. (1993) "Receptor-Mediated Transport OfDNA Into Eukaryotic Cells" Meth. Enzymol. 217:618-644), і ці методи можуть бути застосовані в даному винаході, за умови, що в даному випадку не будуть порушуватися необхідні еволюційні і фізіологічні функції клітин-реципієнтів. Цей метод повинен забезпечувати стабільне перенесення нуклеїнової кислоти в клітину, так, щоб така нуклеїнова кислота експресувалась у клітині і переважно успадковувалася і експресувалась у клітинному потомстві.

Отримані рекомбінантні клітини можуть бути введені індивідууму різними відомими методами. Рекомбінантні клітини крові (наприклад, гемопоетичні стовбурові клітини або клітини-попередники) переважно уводять внутрішньовенно. Кількість клітин, що підходять для їхнього використання, залежить від бажаного ефекту, стану здоров'я пацієнта і т. п., і може бути визначено самим фахівцем.

Клітини, у які може бути введена нуклеїнова кислота для генотерапії, включають клітини будь-яких відомих видів, і такими клітинами є, але не обмежуються ними, епітеліальні клітини, ендотеліальні клітини, кератиноцити, фібробласти, м'язові клітини, гепатоцити, клітини крові, такі як Т-лімфоцити, В-лімфоцити, моноцити, макрофаги, нейтрофіли, еозинофіли, мегакаріоцити, гранулоцити, різні стовбурові клітини або клітини-попередники, зокрема, гемопоетичні стовбурові клітини або клітини-попередники, виділені, наприклад, з кісткового мозку, крові пупкового канатика, периферичної крові, печінки плоду і т. п.

У переважному варіанті винаходу клітини, використовувані для генотерапії, є аутологічними для даного індивідуума.

У варіанті винаходу, у якому рекомбінантні клітини використовуються з метою генотерапії, послідовності нуклеїнової кислоти, які кодують антитіло або злитий білок, вводять у клітини так, щоб вони експресувались цими клітинами або їх потомством, а потім такі рекомбінантні клітини вводять in vivo для досягнення терапевтичного ефекту. У конкретному варіанті винаходу використовуються стовбурові клітини або клітини-попередники. Відповідно до цього варіанта винаходу, у принципі, можуть бути використані будь-які стовбурові клітини і/або клітини-попередники, що можуть бути виділені і можуть зберігатися in vitro (див., наприклад, публікацію заявки PCT WO 94/08598; Stemple et al. (1992) "Isolation Of A Stem Cell For Neurons And Glia From The Mammalian Neural Crest" Cell 71:973-985; Rheinwald (1980) "Serial Cultivation Of Normal Human Epidermal Keratinocytes" Meth. Cell Bio. 21A:229-254; і Pittelkow et al. (1986) "New Techniques For The In Vitro Culture Of Human Skin Keratinocytes And Perspectives On Their Use For Grafting Of Patients With Extensive Burns" Mayo Clinic Proc. 61:771-777).

У конкретному варіанті винаходу нуклеїнова кислота, що вводиться з метою генотерапії, включає індуцибельний промотор, функціонально приєднаний до кодуючої ділянки, таким

чином, що експресія нуклеїнової кислоти регулюється залежно від присутності або відсутності відповідного індуктора транскрипції.

5.7.3. Набори

Даний винахід стосується фармацевтичної упаковки або фармацевтичного набору, що містить один або більше контейнерів, заповнених молекулами відповідно до винаходу. Крім того, один або більше інших профілактичних або терапевтичних агентів, що можуть бути використані для лікування захворювання, можуть бути також включені у вказану фармацевтичну упаковку або фармацевтичний набір. Даний винахід також стосується фармацевтичної упаковки або фармацевтичного набору, що містить один або більше контейнерів, заповнених одним або більше інгредієнтами фармацевтичних композицій відповідно до винаходу. До такого (таких) контейнеру(ів) може, але необов'язково, додаватися інструкція у формі призначення, у якому вказане, що виготовлення, застосування або продаж фармацевтичних або біологічних продуктів знаходяться під контролем регуляторних органів, а також вказано, що регуляторні органи дають дозвіл на приготування, застосування або продаж даного лікарського препарату, який може бути введений людині.

Даний винахід також стосується наборів, що можуть бути використані у вищеописаних методах. В одному з варіантів винаходу набір включає одну або більше молекул відповідно до винаходу. В іншому варіанті винаходу набір також включає одне або декілька інших профілактичних або терапевтичних засобів, використовуваних для лікування раку, в одному або більше контейнерах. В іншому варіанті винаходу набір також включає одне або більше цитотоксичних антитіл, що зв'язуються з одним або більше антигенами, асоційованими з раком. У деяких варіантах винаходу такими іншими профілактичними або терапевтичними засобами є хіміотерапевтичні засоби. В інших варіантах винаходу такими профілактичними або терапевтичними засобами є біологічні або гормональні терапевтичні засоби.

5.8. Характеризація й ілюстрація терапевтичної ефективності

У декількох аспектах даного винаходу фармацевтичні композиції, профілактичні або терапевтичні засоби відповідно до винаходу, перед уведенням таких композицій або засобів людині, тестують, переважно in vitro у системі клітинних культур, і в організмі тварини-моделі, такій як система гризунів, використовуваних як модель, на потрібну терапевтичну активність. Так, наприклад, аналізами, що можуть бути проведені з метою визначення необхідності введення конкретної фармацевтичної композиції, є аналізи з використанням клітинних культур, у яких зразок тканини пацієнта вирощують у культурі, а потім обробляють фармацевтичною композицією відповідно до винаходу або яким-небудь іншим способом піддають контакту з цією фармацевтичною композицією, після чого оцінюють вплив такої композиції на зразок тканини. Зразок тканини може бути узятий у пацієнта за допомогою біопсії. Цей тест дозволяє ідентифікувати профілактичну(і) або терапевтичну(і) молекулу(и) на найбільшу терапевтичну ефективність для кожного конкретного пацієнта. У різних конкретних варіантах винаходу аналізи in vitro можуть бути здійснені з використанням репрезентативних клітин, що беруть участь у розвитку аутоімунного або запального розладу (наприклад, Т-клітин), для того, щоб визначити, чи чинить фармацевтична композиція відповідно до винаходу бажаний ефект на клітини таких типів.

Комбінації профілактичних і/або терапевтичних засобів можуть бути протестовані в придатних системах тварин-моделей перед їх уведенням людині. Такими системами тварин-моделей є, але не обмежуються ними, щурі, миші, кури, корови, мавпи, свині, собаки, кролики і т. п. При цьому може бути використана будь-яка система тварини-моделі, добре відома фахівцям. У конкретному варіанті винаходу комбінації профілактичних і/або терапевтичних засобів тестують у системі тварин-моделей. Такі системи-моделі широко застосовуються і добре відомі фахівцям. Профілактичні і/або терапевтичні засоби можуть бути введені повторно. У деяких аспектах винаходу такі процедури можуть варіюватися. Вказані аспекти включають схему і час уведення профілактичних і/або терапевтичних засобів, незалежно від того, чи вводяться ці засоби окремо або у вигляді суміші.

Переважними тваринами-моделями, застосовуваними в способах відповідно до винаходу, є, наприклад, трансгенні миші, експресуючі людські FcγR на мишачих ефекторних клітинах, наприклад, у даному винаході може бути використана будь-яка мишача модель, описана в патенті США 5877396 (який у всій своїй повноті вводиться в даний опис за допомогою посилання). Трансгенними мишами, використовуваними в способах відповідно до винаходу, є, але не обмежуються ними, миші, що несуть людський FcγRIIIA; миші, що несуть людський FcγRIIA; миші, що несуть людський FcγRIIB і людський FcγRIIIA; і миші, що несуть людський FcγRIIB і людський FcγRIIA. Переважно, мутації, що дають найбільш високі рівні активності в описаних вище функціональних аналізах, можуть бути протестовані на їхнє застосування в

дослідженнях, проведених на тваринах-моделях перед уведенням людині. Достатні кількості антитіл можуть бути приготовані для їхнього використання на тваринах-моделях із застосуванням вищеописаних методів, наприклад, з використанням систем експресії в ссавців і з застосуванням методів очищення, описаних і проілюстрованих у даній заявці.

Миші з моделлю ксенотрансплантатів можуть бути використані для оцінки ефективності мишачих антитіл проти пухлиноспецифічної мішені виходячи з афінності і специфічності епітоп-зв'язувальних доменів молекули діатіла відповідно до винаходу і здатності діатіла виробляти імунну відповідь (Wu et al. (2001) "Mouse Models For Multistep Tumorigenesis" Trends Cell Biol. 11:S2-9). Трансгенні миші, експресуючі людські FcγR на мишачих ефекторних клітинах, є унікальними і являють собою спеціально виведені тварини-моделі для оцінки ефективності взаємодій людських Fc-FcγR. Пари FcγRIIIA-, FcγRIIB- і FcγRIIA-трансгенних мишачих ліній, що були отримані з лабораторії Dr. Jeffrey Ravetch (відповідно до ліцензійного договору, укладеного між Університетом Рокфеллера і Раковим центром Слоуна Кеттеринга), можуть бути використані, як описано нижче в таблиці 11.

Таблиця 11

Мишачі клітинні лінії

Вихідна мишача клітинна лінія	Людський FcγR
«Голі»/CD16A KO	Відсутня
«Голі»/CD16A KO	FcγRIIIA
«Голі»/CD16A KO	FcγRIIA
«Голі»/CD16A KO	FcγRIIA і IIIA
«Голі»/CD32B KO	Відсутня
«Голі»/CD32B KO	FcγRIIB

Протизапальна ефективність комбінованої терапії відповідно до винаходу може бути визначена з використанням різних експериментальних тварин з моделями запального артриту, відомого фахівцям і описаного Crofford L.J. і Wilder R.L. "Arthritis і Autoimmunity in Animals" in Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology, McCarty et al.(eds.), Chapter 30 (Lee & Febiger, 1993). Тварини з моделями експериментального і який спонтанно розвивається запального артриту й аутоімунного ревматичного захворювання можуть бути також використані для оцінки протизапальної активності комбінованої терапії відповідно до винаходу. Необмежувальні приклади деяких аналізів приводяться нижче.

Основними тваринами-моделями з артритом або запальним захворюванням, відомими і широко застосовуваними фахівцями, є: щури з моделлю індукованого ад'ювантом артриту, щури і миші з моделлю індукованого колагеном артриту і щуриа, кролики і хом'ячки з моделлю індукованого антигеном артриту, описані в публікаціях Crofford L.J. & Wilder R.L. "Arthritis and Autoimmunity in Animals", in Arthritis & Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology, McCarty et al.(eds.), Chapter 30 (Lee & Febiger, 1993), що у всій своїй повноті вводяться в даний опис за допомогою посилання.

Протизапальна активність комбінованої терапії відповідно до винаходу може бути оцінена на щурах з моделлю індукованого карагенаном артриту. Індукований карагенаном артрит був також ініційований у кроликів, собак і свиней у дослідженнях хронічного артриту або запалення. Для визначення терапевтичної ефективності проводять кількісний гістоморфометричний аналіз. Методи, у яких використовуються такі моделі з індукованим карагенаном артритом, описані в публікації Hansra P. et al. (2000) "Carrageenan-induced Arthritis In The Rat" Inflammation, 24(2):141-155. Також часто використовуються тварини з моделями індукованого зимозаном запалення, і такі тварини відомі фахівцям і описані в літературі.

Протизапальна активність комбінованої терапії відповідно до винаходу може бути оцінена шляхом визначення рівня зниження ступеня набряку подушечки лапи у щурів, індукованого карагенаном, із застосуванням модифікованого методу, описаного Winter C. A. et al. (1962) "Carrageenan-induced Edema In Hind Paw Of The Rat As An Assay For Anti-Inflammatory Drugs" Proc. Soc. Exp. Biol Med. 111, 544-547. Цей аналіз був проведений як первинний in vivo скринінг на протизапальну активність більшості НПЗЗ, і є прогностичним аналізом відносно ефективності для людини. Протизапальну активність тестованих профілактичних або терапевтичних засобів виражали як відсоток інгібування збільшення маси подушечки задніх лап у тест-групі в порівнянні з контрольною групою, якій уводили носій.

Крім того, тварини з моделлю запального захворювання кишечнику можуть бути також використані для оцінки ефективності комбінованої терапії відповідно до винаходу (Kim et al. (1992) "Experimental Colitis In Animal Models" Scand. J. Gastroentrol. 27:529-537; Strober (1985) "Animal Models Of Inflammatory Bowel Disease-An Overview" Dig. Dis. Sci. 30(12 Suppl):3S-10S). Виразковий коліт і хвороба Крона являють собою людські запальні захворювання кишечнику, що можуть бути індуковані у тварин. Для індукування запальних захворювань кишечнику, тваринам можуть бути перорально введені сульфовані полісахариди, включаючи, але не обмежуючись ними, амілопектин, караген, сульфат амілопектину і сульфат декстрану, або хімічні подразники, включаючи, але не обмежуючись ними, тринітробензолсульфонову кислоту (TNBS) і оцтову кислоту.

Тварини з моделями аутоімунних захворювань можуть бути також використані для оцінки ефективності комбінованої терапії відповідно до винаходу. Були отримані тварини з моделями аутоімунних захворювань, таких як діабет типу 1, аутоімунне захворювання щитовидної залози, системний червоний вовчак і гломерулонефрит (Flanders et al. (1999) "Prevention Of Type 1 Diabetes From Laboratory To Public Health" Autoimmunity 29:235-246; Rasmussen et al. (1999) "Models To Study The Pathogenesis Of Thyroid Autoimmunity" Biochimie 81:511-515; Foster (1999) "Relevance Of Systemic Lupus Erythematosus Nephritis Animal Models To Human Disease" Semin. Nephrol. 19:12-24).

Крім того, для оцінки описаної тут профілактичної і/або терапевтичної ефективності комбінованої терапії для лікування аутоімунних і/або запальних захворювань можуть бути проведені будь-які аналізи, відомі фахівцям.

Токсичність і ефективність профілактичного і/або терапевтичного лікування, проведеного відповідно до протоколів відповідно до винаходу, можуть бути визначені за допомогою стандартних фармацевтичних процедур, проведених у клітинних культурах або на експериментальних тваринах, наприклад, для оцінки LD_{50} (дози, летальної для 50 % популяції) і ED_{50} (дози, терапевтично ефективної для 50 % популяції). Відношення доз, що дають токсичні і терапевтичні ефекти, називається терапевтичним індексом і може бути виражене як відношення LD_{50}/ED_{50}. Переважними є профілактичні і/або терапевтичні засоби, що мають високий терапевтичний індекс. Оскільки можуть бути використані профілактичні і/або терапевтичні агенти, що мають токсичні побічні ефекти, то в даному випадку варто дотримуватися застережних заходів при створенні систем доставки, які націлюють такі агенти на ділянку ураженої тканини для мінімізації можливого ушкодження неінфікованих клітин і, тим самим, зниження побічних ефектів.

Дані, отримані в аналізах клітинних культур і в дослідженнях, проведених на тваринах, можуть бути використані для приготування різних доз профілактичних і/або терапевтичних засобів, що вводяться людині. Дози таких засобів переважно складають у межах концентрацій у кровотоці, що включають ED_{50} з незначною токсичністю або під час відсутності токсичності. Дози можуть варіюватися в цих межах залежно від використовуваної лікарської форми і від застосовуваного способу введення. Для будь-якого агента, використовуваного в способі відповідно до винаходу, терапевтично ефективна доза може бути обчислена виходячи з аналізів клітинних культур. Доза може бути приготовлена для тварин-моделей з метою досягнення концентрації в плазмі в межах, що включають IC_{50} (тобто, концентрацію тестованої сполуки, при якій досягається напівмаксимальне інгібування симптомів), як було визначено в аналізі клітинної культури. Така інформація може бути використана для більш точного визначення придатних доз, що вводяться людині. Рівні в плазмі можуть бути оцінені, наприклад, за допомогою високоефективної рідинної хроматографії.

Протиракова активність терапії, яка проводиться відповідно до даного винаходу, може бути визначена з використанням різних експериментальних тварин-моделей для вивчення раку, наприклад, SCID-мишей або трансгенних мишей або "голих" мишей з моделлю людського ксенотрансплантата, і тварин-моделей, таких як хом'ячки, кролики і т. п., відомі фахівцям і описані в публікаціях Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development (1999, eds. Fiebig & Burger); Contributions to Oncology (1999, Karger); The Nude Mouse in Oncology Research (1991, eds. Boven and Winograd); і Anticancer Drug Development Guide (1997 ed. Teicher), що у всій своїй повноті вводяться в даний опис за допомогою посилання.

Переважними тваринами-моделями для визначення терапевтичної ефективності молекул відповідно до винаходу є мишачі моделі ксенотрасплантатів. Пухлинними клітинними лініями, що можуть бути використані як джерела для створення пухлин ксенотрансплантатів, є, але не обмежуються ними, клітини SKBR3 і MCF7, що можуть походити від клітин пацієнтів з аденокарциномою молочної залози. Такі клітини містять рецептори erbB2 і пролактину. Клітини SKBR3 звичайно використовуються фахівцями як моделі ADCC і моделі пухлинних

ксенотрансплантатів. Альтернативно, клітини OVCAR3, які походять від людської аденокарциноми яєчника, можуть бути використані як джерело для створення пухлинних ксенотрансплантатів.

Протоколи лікування і композиції відповідно до винаходу переважно тестують in vitro, а потім in vivo на бажану терапевтичну або профілактичну активність перед їхнім застосуванням для людини. Терапевтичні агенти і способи можуть бути скриновані з використанням клітин пухлини або злоякісної клітинної лінії. Для аналізу виживаності і/або росту клітин може бути проведена множина стандартних аналізів, наприклад, проліферація клітин може бути оцінена шляхом вимірювання рівня включення ^{3}H-тимідину, прямого підрахунку числа клітин, детектування змін рівня транскрипційної активності відомих генів, таких як протоонкогени (наприклад, fos, myc), або маркерів клітинного циклу; життєздатність клітин може бути оцінена по фарбуванню трипановим синім; диференціювання клітин може бути оцінена візуально по зміні морфології, зниженню росту і/або утворенню колоній у м'якому агарі або утворенню судинної мережі в тривимірній базальній мембрані або в препараті позаклітинного матриксу і т. п.

Сполуки для використання в терапії можуть бути протестовані в придатних системах тварин-моделей перед їх уведенням людині, включаючи, але не обмежуючись ними, щурів, мишей, курей, корів, мавп, кроликів, хом'ячків і т. п., наприклад, тварин-моделей, описаних вище. Ці сполуки можуть бути потім використані у відповідних клінічних дослідженнях.

Крім того, будь-які відомі аналізи можуть бути використані для оцінки профілактичної і/або терапевтичної ефективності описаної тут комбінованої терапії, застосовуваної для лікування або попередження раку, запального розладу або аутоімунного захворювання.

6. ПРИКЛАДИ

6.1. Конструювання і характеризація ковалентно зв'язаних біспецифічних діатіл

Моноспецифічне ковалентно зв'язане діатіло і біспецифічне ковалентно зв'язане діатіло були сконструйовані для оцінки рекомбінантного продукування, очищення і зв'язувальних властивостей кожного з цих діатіл. ДСН-ПААГ- і ЕХ-аналізи афінно очищених молекул діатіл, що були продуковані з використанням описаних тут рекомбінантних експресійних систем, показали, що ці діатіла складаються з однієї димерної молекули. ELISA- і ППР-аналізи також показали, що ковалентно зв'язане біспецифічне діатіло має афінність відносно обох антигенів-мішеней і може зв'язуватися одночасно з обома антигенами.

Матеріали і методи:

Конструювання і моделювання поліпептидних молекул: Нуклеїновокислотні експресійні вектори були сконструйовані для створення чотирьох поліпептидних конструкцій, схематично представлених на фіг. 2. Конструкція 1 (SEQ ID NO: 9) містила VL-домен гуманізованого антитіла 2B6, яке розпізнає FcγRIIB, і VH-домен гуманізованого антитіла 3G8, яке розпізнає FcγRIIIA. Конструкція 2 (SEQ ID NO: 11) містила VL-домен Hu3G8 і VH-домен Hu2B6. Конструкція 3 (SEQ ID NO: 12) містила VL-домен Hu3G8 і VH-домен Hu3G8. Конструкція 4 (SEQ ID NO: 13) містила VL-домен Hu2B6 і VH-домен Hu2B6.

ПЛР і конструювання експресійного вектора: кодуючі послідовності, VL- або VH-доменів ампліфікували з матричної ДНК із використанням прямого і зворотного праймерів, сконструйованих так, щоб вихідні ПЛР-продукти містили послідовності, що перекриваються, що дозволяє проводити ПЛР із перекриванням для одержання послідовностей, які кодують потрібні поліпептидні конструкції.

Попередня ПЛР-ампліфікація матричної ДНК: Приблизно 35 нг матричної ДНК, наприклад, легкого ланцюга і важкого ланцюга антитіла, що представляє інтерес; 1 мкл 10 мкМ прямого і зворотного праймерів; 2,5 мкл 10х буфера pfuUltra (Stratagene, Inc.); 1 мкл 10 мМ dNTP; 1 мкл 2,5 одиниць/мкл ДНК-полімерази pfuUltra (Stratagene, Inc.); і дистильовану воду в загальному об'ємі 25 мкл обережно перемішували в мікроцентрифугальній пробірці і швидко центрифугували в мікроцентрифузі, а потім із дна пробірки збирали реакційну суміш. ПЛР-реакції здійснювали на обладнанні GeneAmp PCR System 9700 (PE Applied Biosystem) у наступних умовах: 94°C, 2 хвилини; 25 циклів при 94°C, щораз по 15 секунд; 58°C, 30 секунд; і 72°C, 1 хвилина.

VL Hu2B6 ампліфікували з легкого ланцюга Hu2B6 з використанням прямого і зворотного праймерів SEQ ID NO: 55 і SEQ ID NO: 56, відповідно. VH Hu2B6 ампліфікували з важкого ланцюга Hu2B6 з використанням прямого і зворотного праймерів SEQ ID NO: 57 і SEQ ID NO: 58, відповідно. VL Hu3G8 ампліфікували з легкого ланцюга Hu3G8 з використанням прямого і зворотного праймерів SEQ ID NO: 55 і SEQ ID NO: 59, відповідно. VH Hu3G8 ампліфікували з важкого ланцюга Hu3G8 з використанням прямого і зворотного праймерів SEQ ID NO: 60 і SEQ ID NO: 61, відповідно.

ПЛР-продукти піддавали електрофорезу в 1 % агарозному гелі протягом 30 хвилин при 120 вольт. ПЛР-продукти вирізували з гелю й очищали з використанням набору для екстракції з гелю MinElute (Qiagen, Inc.).

ПЛР із перекриванням: Вихідні ПЛР-продукти об'єднували, як описано нижче, і ампліфікували в тих же самих умовах проведення ПЛР, що були описані для попередньої ампліфікації матричної ДНК. Продукти ПЛР із перекриванням також очищали як описані вище.

Послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує конструкцію 1, SEQ ID NO: 9 (схематично показано на фіг. 2), ампліфікували шляхом об'єднання ПЛР-продуктів ампліфікації VL Hu2B6 і VH Hu3G8 і прямого і зворотного праймерів SEQ ID NO: 55 і SEQ ID NO: 61, відповідно. Послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує конструкцію 2, SEQ ID NO: 11 (схематично показано на фіг. 2), ампліфікували шляхом об'єднання ПЛР-продуктів ампліфікації VL Hu3G8 і VH Hu2B6 і прямого і зворотного праймерів SEQ ID NO: 55 і SEQ ID NO: 58, відповідно. Послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує конструкцію 3, SEQ ID NO: 12 (схематично показано на фіг. 2), ампліфікували шляхом об'єднання ПЛР-продуктів ампліфікації VL Hu3G8 і VH Hu3G8 і прямого і зворотного праймерів SEQ ID NO: 55 і SEQ ID NO: 61, відповідно. Послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує конструкцію 4, SEQ ID NO: 13 (схематично показано на фіг. 2), ампліфікували шляхом об'єднання ПЛР-продуктів ампліфікації VL Hu2B6 і VH Hu2B6 і прямого і зворотного праймерів SEQ ID NO: 55 і SEQ ID NO: 58, відповідно.

Прямі праймери для VL-доменів (тобто, SEQ ID NO: 55) і зворотні праймери для VH-доменів (тобто, SEQ ID NO: 58 і SEQ ID NO: 61) містили унікальні рестрикційні сайти, що дозволяло клонувати кінцевий продукт у експресійний вектор. Очищені продукти ПЛР із перекриванням гідролізували рестриктуючими ендонуклеазами Nhe I і EcoR I і клонували в експресійний вектор ссавців pCIneo (Promega, Inc.). Плазміди, що кодують конструкції, ідентифіковані в таблиці 12.

Таблиця 12

Плазмідні конструкції

Кодована конструкція	Позначення плазміди	Вставка
1	pMGX0669	hu2B6VL-hu3G8VH
2	pMGX0667	hu3G8VL-hu2B6VH
3	pMGX0666	hu3G8VL-hu3G8VH
4	pMGX0668	hu2B6VL-hu2B6VH

Експресія поліпептиду/діатіла: pMGX0669, що кодує конструкцію 1, переносили разом з pMGX0667, що кодує конструкцію 2, у клітини HEK-293 з використанням ліпофектаміну 2000 відповідно до інструкцій виробників (Invitrogen). Спільне перенесення цих двох плазмід у клітини здійснювали так, щоб це приводило до експресії ковалентно зв'язаного біспецифічного діатіла (CBD), імуноспецифічного до FcγRIIB і FcγRIIIA (діатіла h2B6-h3G8). pMGX0666 і pMGX0668, що кодують конструкції 3 і 4, відповідно, були окремо перенесені в клітини HEK-293 для експресії ковалентно зв'язаного моноспецифічного діатіла (CMD), імуноспецифічного до FcγRIIIA (діатіла h3G8) і FcγRIIB (діатіла h2B6), відповідно. Після культивування протягом трьох днів, секретовані продукти виділяли з кондиціонованого середовища.

Очищення: Діатіла захоплювали з кондиціонованого середовища з використанням релевантних антигенів, зв'язаних з CNBr-активованою сефарозою 4B. До завантаження афінну сефарозну смолу врівноважували в 20 мМ тріс/HCl, pH 8,0. Після завантаження смолу промивали врівноважувальним буфером, а потім елюювали. Діатіла елюювали з промитої смоли з використанням 50 мМ гліцину, pH 3,0. Елюйовані діатіла відразу нейтралізували 1М тріс/HCl, pH 8,0 і концентрували на концентраторі центрифугального типу. Потім концентровані діатіла очищали за допомогою ексклюзійної хроматографії на колонці з Superdex 200, урівноваженій в PBS.

EX: Ексклюзійну хроматографію проводили для оцінки відповідного розміру і гетерогенності діатіл, елюйованих з колонки. EX-аналіз здійснювали на колонці GE healthcare Superdex 200HR 10/30, урівноваженій PBS. Потім проводили порівняння профілів елюювання повнорозмірного IgG (~150 кДа), Fab-фрагмента (~50 кДа) і одноланцюжкового Fv (~30 кДа), використовуваного як контроль.

ELISA: Зв'язування елюйованих і очищених діатіл охарактеризовували за допомогою ELISA-аналізу, описаного в розділі 5.4.2.50 мкл/ямку 2 мкг/мл розчину sCD32B-Ig наносили на 96-ямковий планшет Maxisorp у карбонатному буфері і залишали на ніч при 4 °C. Планшети три рази промивали PBS-T (PBS, 0,1 % твіну 20) і блокували 0,5 % BSA у PBS-T протягом 30 хвилин

при кімнатній температурі. Потім CBD h2B6-h3G8, CMD h2B6, або CMD h3G8 розводили у блокуючому буфері у серійних дворазових розведеннях і одержували діатіла в концентраціях, що становлять від 0,5 мкг/мл до 0,001 мкг/мл. Потім планшет інкубували при кімнатній температурі протягом 1 години. Після триразового промивання PBS-T, у кожну ямку додавали 50 мкл/ямку 0,2 мкг/мл sCD16A-біотину. Після цього планшет знову інкубували при кімнатній температурі протягом 1 години. Після триразового промивання PBS-T, 50 мкл/ямку 1:5000-розведення ПХ-кон'югованого стрептавідину (Amersham Pharmacia Biotech) використовували для детектування. ПХ-стрептавідин залишали на 45 хвилин для інкубування при кімнатній температурі. Планшет три рази промивали PBS-T і виявляли з використанням 80 мкл/ямку субстрату TMB. Після 10-хвилинного інкубування реакцію ПХ-TMB припиняли шляхом додавання 40 мкл/ямку 1 % H_2SO_4. OD450 нм зчитували на 96-ямковому планшет-рідері з використанням програми SOFTmax, і за отриманими результатами будували графік з використанням програми GraphPadPrism 3.03.

Аналіз BIAcore: Кінетичні параметри зв'язування елюйованих і очищених діатіл тестували за допомогою аналізу BIAcore (на обладнанні BIAcore 1000, BIAcore Inc., Piscataway, N.J.) з використанням програми, описаної в розділі 5.4.3.

sCD16A, sCD32B або sCD32A (негативний контроль) іммобілізували на одній з чотирьох протокових кювет (протокова кювета 2) на поверхні сенсорного чипа за допомогою хімічної реакції приєднання аміну (шляхом модифікації карбоксиметильних груп сумішшю NHS/EDC) так, щоб на поверхні було іммобілізовано приблизно 1000 одиниць відгуку (RU) кожного з рецепторів. Після цього активні складні ефіри, які не прореагували, "відщеплювали" шляхом ін'єкції 1M Et-NH_2. Після одержання придатної поверхні, ковалентно зв'язані біспецифічні діатіла (CBD h2B6-h3G8) або ковалентно зв'язані моноспецифічні діатіла (CMD h2B6 або h3G8 CMB) пропускали над цією поверхнею шляхом 180-секундних інжекцій 6,25-200 нМ розчину при швидкості потоку 70 мл/хвилину. Для порівняння також тестували scFV h3G8.

Після збору всіх даних будували результуючі загальні криві зв'язуванням з використанням комп'ютерних алгоритмів, що поставляються виробниками, BIAcore, Inc. (Piscataway, NJ). Ці алгоритми дозволяють обчислювати K_{on} і K_{off}, з яких була виведена позірна константа рівноважного зв'язування k_d, що виражається як відношення двох констант швидкості (тобто, K_{off}/K_{on}). Більш докладний опис обчислення окремих констант швидкості можна знайти в довідковому посібнику BIAevaluaion Software Handbook (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ).

Фази асоціації і дисоціації будували окремо. Константа швидкості дисоціації була отримана через інтервали 32-34 секунд 180-секундної фази дисоціації; а фаза асоціації була побудована по 1:1 ленгмюрівській моделі, і підбір кривої здійснювали за значеннями R_{max} і відповідно до xi^2-критерію для біспецифічних діатіл і scFv, а для зв'язування з CMD був використаний двовалентний аналіт.

Результати

ДСН-ПААГ-аналіз у невідновлювальних умовах показав, що очищений продукт кожної з експресійних систем CMD h3G8, CMD h2B6 і CMD h2B6-h3G8 являють собою одну молекулу з оціненою молекулярною масою, що становить приблизно 50 кДа (фіг. 3, доріжки 4, 5 і 6, відповідно). У відновлювальних умовах очищений продукт, що походить від будь-якої з цих експресійних CMD-систем, являє собою одну смугу (доріжки 1 і 2), а очищений продукт, що походить від CBD-системи h2B6-h3G8, являє собою 2 окремі білки (фіг. 3, доріжка 3). Усі поліпептиди, виділені з експресійної системи і візуалізовані за допомогою електрофорезу в ДСН-ПААГ у відновлювальних умовах, мігрували приблизно при 28 кДа.

ЕХ-аналіз кожного продукту експресійной системи також виявив окремі молекули (фіг. 4B), кожна з який елюювалась приблизно в той же час, як і Fab-фрагмент IgG (~50 кДа) (фіг. 4A). Отримані результати показали, що афінно очищений продукт являє собою гомогенний ковалентно зв'язаний гомодимер, у випадку експресійної CMD-системи, і гомогенний ковалентно зв'язаний гетеродимер, у випадку CBD h2B6-h3G8.

"Сендвіч»-ELISA-аналіз був проведений з метою тестування зв'язування CBD h2B6-h3G8 на його специфічність до одного або до обох CD32B і/або CD16A (фіг. 5). CD32B служить як антиген-мішень, а CD16A служить як другий зонд. Позитивний сигнал у ELISA указував на те, що гомодимерний CBD h2B6-h3G8 має специфічність до обох антигенів. В аналогічному тесті для CMD h3G8 (який не повинний зв'язуватися з CD32B) сигнал не виявлявся.

ППР-аналіз показав, що CMD h3G8 імуноспецифічно розпізнає sCD16, але не розпізнає sCD32B, CMD h2B6 імуноспецифічно розпізнає sCD32B, але не розпізнає sCD16, а CBD h2B6-h3G8 імуноспецифічно розпізнає обох sCD16 і sCD32B (фіг. 6A-B). Жодне з цих тестованих діатіл не зв'язувалося з контрольним рецептором sCD32A (фіг. 6C).

ППР-аналіз також проводили для обчислення кінетичних констант і констант рівноважного зв'язування CMD і CBD h2B6-h3G8 з sCD16 і/або sCD32B. Отримані результати порівнювали з аналогічними константами, обчисленими для scFV h3G8. На фіг. 7A-E представлені графіки, побудовані за результатами ППР-аналіза. Кінетичні константи швидкості асоціації і дисоціації, а також константи рівноваги, обчислені за результатами, представленим на фіг.7, вказані в таблиці 13.

Таблиця 13

Кінетичні константи і константи рівноваги, обчислені по даних аналізу BIAcore

Рецептор/аналіт	k-on	k-off	Kd
sCD16 / h3G8 діатіло	**2.3 x10^5**	**0.004**	**18.0**
sCD16 / h2B6-h3G8 CBD	**4.6 x 10^5**	**0.010**	**22.7**
sCD16 / h3G8 scFv	**3.2 x 10^5**	**0.013**	**38.7**
sCD32B / h2B6-h3G8 CBD	**3.6 x 10^5**	**0.005**	**15.0**
sCD32B / h2B6 діатіло	**6.2 x 10^5**	**0.013**	**21.0**

Результати цих досліджень, об'єднані з результатами ELISA-аналізу, підтвердили, що ковалентно зв'язаний гетеродимер h2B6-h3G8 зберігав специфічність до обох CD32B і CD16, і мав здатність зв'язуватися з обома антигенами одночасно. Ця молекула схематично представлена на фіг. 8.

6.2. Конструювання і характеризація ковалентно зв'язаних біспецифічних діатіл, що містять Fc-домени

З метою створення IgG-подібної молекули, тобто молекули, що містить Fc-домен, один з поліпептидів, які містять гетеродимерну молекулу CBD, описану в прикладі 6.1, додатково модифікували так, щоб вона містила Fc-домен (для створення "більш важкого" і "більш легкого" ланцюгів, аналогічних важкому і легкому ланцюгам антитіла). Гетеродимерна біспецифічна молекула повинна містити Fc-домен, що буде димеризуватися з гомологічною молекулою з утворенням тетрамерної чотиривалентної IgG-подібної молекули (тобто, молекули, утвореної за допомогою димеризації Fc-доменів гетеродимерних біспецифічних молекул). Цікаво відзначити, що такі тетрамерні молекули не детектувались у кондиціонованих середовищах рекомбінантних експресійних систем за допомогою функціональних аналізів, наприклад, шляхом тестування кондиціонованого середовища на імуноспецифічне зв'язування з антигенами-мішенями. Замість цього, у таких функціональних аналізах детектувалась тільки димерна молекула, що містила мономери, які складаються з VL-, VH- і Fc-доменів. Для того щоб визначити, чи має теоретична тетрамерна структура стабільність, поліпептиди, що містять Fc-домен, додатково конструювали так, щоб вони містили шарнірну ділянку, а поліпептиди, що містять "більш легкий ланцюг", додатково конструювали так, щоб вони містили 6 С-кінцевих амінокислот константного домену людського легкого ланцюга каппа. Якщо такі реконструйовані "більш важкі" і "більш легкі" ланцюги були коекспресовані в рекомбінантних експресійних системах, то в цьому випадку функціональні аналізи дозволяли детектувати молекули діатіл, що мають здатність імуноспецифічно зв'язуватися з антигенами-мішенями і з анти-Fc антитілами.

Матеріали і методи

Конструювання і моделювання поліпептидних молекул: Нуклеїновокислотні експресійні вектори були сконструйовані для створення модифікованих варіантів конструкцій 1 і 2, описаних у прикладі 6.1. Конструкції 5 (SEQ ID NO: 14) і 6 (SEQ ID NO: 15) були отримані шляхом створення конструкцій 1 і 2, відповідно, які додатково містять Fc-домен. Конструкція 7 (SEQ ID NO: 16) була отримана шляхом створення конструкції 1, що також містила послідовність FNRGEC (SEQ ID NO: 23) біля свого С-кінця. Конструкція 8 (SEQ ID NO: 18) була отримана шляхом створення конструкції 2, що також містила шарнірну ділянку і Fc-домен (имеющие мутацію V215A). Конструкції 5-8 схематично представлені на фіг. 9.

ПЛР і конструювання експресійного вектора: Усі ПЛР і протоколи очищення ПЛР-продуктів описані в прикладі 6.1. Плазміди pMGX0669 і pMGX0667 служили як матриці для послідовностей, що кодують конструкції 1 і 2, відповідно. Послідовності, які кодують Fc-домен

і/або шарнірний домен HuIgG, представлені як SEQ ID NO: 5 або SEQ ID NO: 1 і SEQ ID NO: 5, відповідно. Кодуючі послідовності матричних ДНК ампліфікували з використанням прямого і зворотного праймерів так, щоб ПЛР-продукти містили послідовності, що перекриваються, що дозволяє проводити ПЛР із перекриванням для одержання послідовностей, що кодують потрібні продукти.

Кодуючу послідовність конструкції 1 ампліфікували з pMGX0669 з використанням прямого і зворотного праймерів SEQ ID NO: 55 і SEQ ID NO: 62, відповідно. Кодуючу послідовність конструкції 2 ампліфікували з pMGX0667 з використанням прямого і зворотного праймерів SEQ ID NO: 55 і SEQ ID NO: 63, відповідно. Шарнірний домен-Fc-домен HuIgG ампліфікували з використанням прямого і зворотного праймерів SEQ ID NO: 65 і SEQ ID NO: 66, відповідно. Конструкцію 7 (SEQ ID NO: 16) ампліфікували з pMGX0669 з використанням прямого і зворотного праймерів SEQ ID NO: 55 і SEQ ID NO: 67.

ПЛР із перекриванням: Вихідні ПЛР-продукти об'єднували, як описано нижче, і ампліфікували й очищали, як описано в прикладі 6.1.

Послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує конструкцію 5, SEQ ID NO: 14 (схематично показано на фіг. 9), ампліфікували шляхом об'єднання ПЛР-продуктів ампліфікації конструкції 1 і Fc-домену HuIgG і прямого і зворотного праймерів SEQ ID NO: 55 і SEQ ID NO: 64, відповідно. Послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує конструкцію 6, SEQ ID NO: 15 (схематично показано на фіг. 9), ампліфікували шляхом об'єднання ПЛР-продуктів ампліфікації конструкції 2 і Fc-домену HuIgG і прямого і зворотного праймерів SEQ ID NO: 55 і SEQ ID NO: 66, відповідно. Послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує конструкцію 8, SEQ ID NO: 18 (схематично показано на фіг. 9), ампліфікували шляхом об'єднання ПЛР-продуктів ампліфікації конструкції 2 і шарнірного домену-Fc-домену HuIgG і прямого і зворотного праймерів SEQ ID NO: 55 і SEQ ID NO: 66, відповідно.

Кінцеві продукти клонували в експресійний вектор ссавців pCIneo (Promega, Inc.), як описано раніше. Плазмідні кодуючі конструкції позначали, як показано в таблиці 14.

Таблиця 14

Плазмідні конструкції

Кодована конструкція	Позначення плазміди	Вставка
5	pMGX0676	hu2B6VL-hu3G8VH-huFc
6	pMGX0674	hu3G8VL-hu2B6VH-huFc
7	pMGX0677	Hu2B6VL-hu3G8VH-FNRGEC
8	pMGX0678	Hu3B8VL-hu2B6VH-людськ. шарнірний домен-Fc-домен (A215V)

Експресія поліпептиду/діатіла: Клітини HEK-293 котрансфікували з використанням ліпофектаміну 2000, як описано в розділі 6.1, чотирма окремими плазмідами, а саме, плазмідами pMGX0669 і pMGX0674, що кодують конструкції 1 і 6, відповідно; плазмідами pMGX0667 і pMGX0676, що кодують конструкції 2 і 5, відповідно; і плазмідами, pMGX0677 і pMGX0678, що кодують конструкції 7 і 8, відповідно.

Спільне перенесення цих плазмід у клітини здійснювали так, щоб це приводило до експресії чотиривалентного біспецифічного діатіла (CBD) з IgG-подібною структурою, яке є імуноспецифічним до FcγRIIB і FcγRIIIA. Також здійснювали додаткову котрансфекцію плазмідами pMGX0674 і pMGX0676, що кодують конструкції 6 і 5, відповідно. Після культивування протягом трьох днів збирали кондиціоновані середовища. Кількість секретованого продукту в кондиціонованому середовищі оцінювали за допомогою ELISA-аналізу Fc-фрагмента IgG з використанням очищеного Fc як стандарту. Потім концентрації продукту в зразках нормалізували по їхній кількості, і нормалізовані зразки використовували в інших аналізах.

ELISA: Зв'язування молекул діатіл, секретованих у середовище, аналізували за допомогою "сендвіч»-ELISA, як описано вище. Якщо це не обговорено особливо, то CD32B використовували для сенсибілізації планшета, тобто як білок-мішень, а ПХ-кон'югований CD16 використовували як зонд.

Результати

ELISA-аналіз проводили для тестування нормалізованих зразків, отриманих з рекомбінантних експресійних систем, що містять конструкції 1 і 6 (pMGX669-pMGX674), конструкції 2 і 5 (pMGX667-pNGX676) і конструкції 5 і 6 (pMGX674-pMGX676), на експресію

молекул діатіл, здатних одночасно зв'язуватися з CD32B і CD16A (фіг. 10). Дані ELISA-аналізу показали, що котрансфекція конструкціями 1 і 6 або котрансфекція конструкціями 2 і 5 не дозволяла отримувати продукт, який міг би зв'язуватися з одним з антигенів або з обома антигенами (фіг. 10, □ і ▲, відповідно). Однак котрансфекція конструкціями 5 і 6 приводила до секреції продукту, здатного зв'язуватися з обома антигенами CD32B і CD16. Останній продукт являє собою димер, що складається з конструкцій 5 і 6 і містить один зв'язувальний сайт для кожного антигену зі структурою, схематично представленою на фіг. 11.

Для індукування утворення IgG-подібної гетеротетрамерної структури, послідовність, яка кодує шість додаткових амінокислот, приєднували до С-кінця конструкції 1 і одержували конструкцію 7 (SEQ ID NO: 16, схематично показану на фіг. 9). Ці шість додаткових амінокислот, FNRGEC (SEQ ID NO: 23), походять від С-кінця легкого ланцюга каппа і звичайно взаємодіють з верхнім шарнірним доменом важкого ланцюга в молекулі IgG. Потім шарнірний домен вбудовували в конструкцію 6 і одержували конструкцію 8 (SEQ ID NO: 18 і фіг. 9). Конструкція 8 додатково містила амінокислотну мутацію у верхній шарнірній ділянці, A215V. Потім експресійні плазміди, що кодують конструкцію 7 і конструкцію 8, pMGX677 і pMGX678, відповідно, були спільно перенесені в клітини HEK-293 і експресовані, як описано раніше.

Молекули діатіла, продуковані з рекомбінантної експресійної системи, що містить конструкції 7 і 8 (pMGX0677+pMGX0678), порівнювали з молекулами діатіла, продукованими з експресійних систем, що містять конструкції 1 і 6 (pMGX669+pMGX674), конструкції 2 і 8 (pMGX669+pMGX678) і конструкції 6 і 7 (pMGX677+pMGX674), у ELISA-аналізі на зв'язування з CD32B і CD16A (фіг. 12).

Як було описано раніше, молекула, продукована експресійною системою, що містить конструкції 1 і 6 (pMGX669+pMGX674), виявилася нездатною зв'язуватися з CD32A і CD16A (фіг. 10 і фіг. 12). На відміну від цього, продукт, отриманий за допомогою коекспресії будь-якої з конструкцій 7 і 6 (pMGX0677+pMGX0674) або коекспресії конструкцій 7 і 8 (pMGX0677-pMGX0678), мав здатність зв'язуватися з CD32B і CD16 (фіг. 12). Слід зазначити, що конструкція 7 була аналогічна конструкції 1, за винятком того, що конструкція 7 містила С-кінцеву послідовність FNRGEC (SEC ID NO:23); а конструкція 8 була аналогічна конструкції 6, за винятком того, що конструкція 8 містила шарнірний домен і мутацію A215V. Ці дані показали, що додавання 6 додаткових амінокислот біля С-кінця легкого ланцюга С-каппа (FNRGEC; SEQ ID NO: 23), тобто "більш легкого" ланцюга, що не несе Fc, сприяло стабілізації утворення тетрамерних IgG-подібних молекул діатіла, незалежно від того, чи містить відповідний "більш важкий" ланцюг шарнірний домен чи ні (тобто, pMGX0677+pMGX0674 і pMGX0677-pMGX0678, фіг. 12). Додавання шарнірного домену до Fc-несучого "більш важкого" поліпептиду, але без додавання С-кінцевої послідовності FNRGEC (SEQ ID NO: 23) до відповідного "більш легкого" ланцюга, ймовірно, не приводить до аналогічної стабілізації (тобто, через відсутність зв'язування з продуктами котрансфекції конструкцій 2 і 8 (pMGX669+pMGX678)). Структура тетрамерної молекули діатіла схематично представлена на фіг. 13.

6.3. Вплив порядку розташування доменів і додаткових дисульфідних зв'язків на утворення тетрамерного IgG-подібного діатіла

Ефект додаткової стабілізації між "більш легким" і "більш важким" поліпептидними ланцюгами тетрамерної IgG-подібної молекули діатіла досліджували шляхом заміни вибраних залишків на поліпептидних ланцюгах цистеїновими залишками. Додаткові цистеїнові залишки створюють додаткові дисульфідні зв'язки між "більш важким" і "більш легким" ланцюгами. Крім того, вплив розташування доменів на активність зв'язування досліджували шляхом переміщення Fc-домену або шарнірного домену-Fc-домену з С-кінця поліпептидного ланцюга в N-кінець. Хоча зв'язувальна активність молекули, що містить додаткові дисульфідні зв'язки, не відрізнялася від зв'язувальної активності раніше сконструйованих молекул діатіла з такими зв'язками, однак, несподівано було виявлено, що перенесення Fc-домену або шарнірного домену-Fc-домену в N-кінець "більш важкого" поліпептидного ланцюга, що складає діатіло, приводило до підвищення афінності зв'язування і/або авідності зв'язування біспецифічної молекули з одним з антигенів-мішеней або з обома антигенами.

Матеріали і методи

Конструювання і моделювання поліпептидних молекул: Нуклеїновокислотні експресійні вектори були сконструйовані для створення модифікованих варіантів конструкцій 5, 6 і 8, описаних у прикладі 6.2. Конструкція 9 (SEQ ID NO: 19) і конструкція 10 (SEQ ID NO: 20) (схематично представлені на фіг. 13) були аналогічні конструкціям 8 і 6, за винятком того, що або Fc-домен шарнірний домен-Fc-домен, відповідно, були перенесені з С-кінця поліпептиду в N-кінець. Крім того, усі використовувані Fc-домени являють собою Fc-домени IgG1 дикого типу. Конструкція 11, SEQ ID NO: 21 (схематично представлена на фіг. 14), була аналогічна

конструкції 2, вказаній в прикладі 6.1, за винятком того, що С-кінець цієї конструкції містив послідовність FNRGEC (SEQ ID NO: 23). Конструкція 12, SEQ ID NO: 22 (схематично представлена на фіг. 14), була аналогічна конструкції 5, вказаній в прикладі 6.2, за винятком того, що Fc-домен також містив шарнірну ділянку. Крім того, у конструкціях 11 і 12, VL-домен 2B6 і VH-домен 2B6 мали одну амінокислотну модифікацію (G105C і G44C, відповідно), тобто, гліцин у кожному домені був замінений цистеїном.

ПЛР і конструювання експресійного вектора: Усі ПЛР і протоколи очищення ПЛР-продуктів описані в прикладах 6.1 і 6.2.

ПЛР із перекриванням: Кінцеві ПЛР-продукти конструювали, ампліфікували й очищали методами, описаними в прикладах 6.1 і 6.2.

Кінцеві продукти клонували в експресійний вектор ссавців pCIneo (Promega, Inc.), як описано раніше. Плазмідні кодуючі конструкції, позначали, як показано в таблиці 15.

Таблиця 15

Плазмідні конструкції

Кодована конструкція	Позначення плазміди	Вставка
9	pMGX0719	людськ. шарнірний домен/Fc-hu3G8VL-hu2B6VH
10	pMGX0718	HuFc-hu2B6VL-hu3G8VH
11	pMGX0716	Hu2B6VL(G/C)-hu3G8VH-людськ. шарнірний домен-Fc
12	pMGX0717	Hu3G8VL-hu2B6VH(G/C)-FNRGEC

Експресія поліпептиду/діатіла: Клітини HEK-293 котрансфікували з використанням ліпофектаміну 2000, як описано в розділі 6.1, трьома окремими плазмідами, а саме, плазмідами pMGX0669 і pMGX0719, що кодують конструкції 1 і 9, відповідно; плазмідами pMGX0669 і pMGX0718, що кодують конструкції 1 і 10, відповідно; і плазмідами pMGX0617 і pMGX0717, що кодують конструкції 11 і 12, відповідно. Спільне перенесення цих плазмід у клітини здійснювали так, щоб це приводило до експресії чотиривалентного біспецифічного діатіла (CBD) з IgG-подібною структурою, яке є імуноспецифічним до FcγRIIB і FcγRIIIA. Після культивування протягом трьох днів збирали кондиціоновані середовища. Кількість секретованого продукту в кондиціонованому середовищі оцінювали за допомогою ELISA-аналізу Fc-фрагмента IgG з використанням очищеного Fc як стандарту. Потім концентрації продукту в зразках нормалізували по їхній кількості, і нормалізовані зразки використовували в інших аналізах.

ELISA: Зв'язування молекул діатіл, секретованих у середовище, аналізували за допомогою "сендвіч»-ELISA, як описано вище. Якщо це не обговорено особливо, то CD32B використовували для сенсибілізації планшета, тобто як білок-мішень, а ПХ-кон'югований CD16 використовували як зонд.

Вестерн-блот-аналіз: Приблизно 15 мл кондиціонованого середовища, отриманого від трьох описаних вище ко-трансфекцій, аналізували за допомогою електрофорезу в ДСН-ПААГ у невідновлювальних умовах. Один гель забарвлювали синім барвником Simply Blue Safestain (Invitrogen), а ідентичний гель переносили на ПВДФ-мембрани (Invitrogen) стандартними методами перенесення. Після перенесення мембрани блокували 5 % сухим сепарованим молоком у 1×PBS. Потім ці мембрани інкубували в 10 мл 1:8000-розведеного ПХ-кон'югованого козячого антитіла проти людських H+L IgG1 у 2 % сухому сепарованому молоці в 1×PBS/0,1 % твін 20 при кімнатній температурі протягом 1 години при легкому помішуванні. Після промивання 1×PBS/0,3 % твін 20 два рази, щораз по 5 хвилин, а потім протягом 20 хвилин при кімнатній температурі, мембрану виявляли на детектуючій системі для вестерн-блот-аналіза ЕХЛ-методом (Amersham Biosciences) відповідно до інструкцій виробників. Плівку виявляли на рентгенівському процесорі.

Результати

Кондиціоноване середовище, отримане від рекомбінантних експресійних систем, що містять конструкції 1 і 9, конструкції 1 і 10 і конструкції 11 і 12, було проаналізоване за допомогою електрофорезу в ДСН-ПААГ (у невідновлювальних умовах) і вестерн-блот-аналіза (з використанням анти-IgG антитіла як зонду). Вестерн-блот-аналіз показав, що продукт, виділений із систем, що містять конструкції 11 і 12 або конструкції 9 і 1, переважно являв собою одну молекулу розміром приблизно 150 кДа (фіг. 14, доріжки 3 і 2, відповідно). Обидва ці продукти мали внутрішні дисульфідні зв'язки, розташовані між "більш легким" і "більш важким" ланцюгами діатіла. На відміну від цього, молекула, у якій були відсутні внутрішні дисульфідні

зв'язки між "більш легким" і "більш важким" ланцюгами, і яка складалася з конструкцій 10 і 1, утворювала щонайменше дві молекули, що мають молекулярні маси ~75 і ~100 кДа (фіг. 14, доріжка 1).

Незважаючи на результати вестерн-блот-аналіза, кожний з цих трьох продуктів мав здатність зв'язуватися з CD32A і CD16 (фіг. 15). Несподівано було виявлено, що в порівнянні з продуктом, що містить С-кінцевий шарнірний домен-Fc-домен (утворений конструкціями 11 і 12), продукт від обох систем, у якому Fc-домен (або Fc-домнен-шарнірний домен) був розташований біля аміно-кінця Fc-вмісного поліпептидного ланцюга (тобто, "більш важкого" ланцюга) (конструкції 9+1 і 10+1), мав підвищену афінність і/або авідність до одного з пептидів-мішеней або до обох цих пептидів (тобто, CD32B і/або CD16).

6.4. Вплив внутрішнього/зовнішнього сайту розщеплення на процесинг поліпротеїнового попередника й експресію ковалентно зв'язаного біспецифічного діатіла; конструювання і характеризація біспецифічного діатіла, що містить частини ланцюга лямбда людського IgG і шарнірний домен

Як описано в даній заявці, окремі поліпептидні ланцюги діатіла або молекули діатіла відповідно до винаходу можуть експресуватися у вигляді однієї молекули поліпротеїнового попередника. Здатність рекомбінантних систем, описаних у прикладах 6.1-6.3, "правильно" процесувати і експресувати функціональне CBD з такого поліпротеїнового попередника аналізували шляхом конструювання нуклеїнової кислоти, що кодує перший і другий поліпептидні ланцюги CBD, розділені внутрішнім сайтом розщеплення, зокрема, сайтом розщеплення фурином. Функціональне CBD виділяли з рекомбінантної системи, що містить молекулу поліпротеїнового попередника.

Як обговорювалося в прикладі 6.3, було виявлено, що додавання 6 С-кінцевих амінокислот з людського легкого ланцюга каппа, FNRGEC (SEQ ID NO: 23), приводило до стабілізації утворення діатіла, - ймовірно, за допомогою посилення міжланцюгової взаємодії між доменами, що містять SEQ ID NO: 23, і доменами, що містять Fc-домен або шарнірний домен-Fc-домен. Стабілізуючий ефект такої взаємодії ланцюга лямбда/Fc аналізували в CBD, де жоден з поліпептидних ланцюгів не містив Fc-домену. Один поліпептидний ланцюг діатіла був сконструйований так, щоб він містив SEQ ID NO: 23 біля свого С-кінця, а поліпептидний ланцюг-партнер був сконструйований так, щоб він містив амінокислотну послідовність VEPKSC (SEQ ID NO: 77), що походила від шарнірного домену IgG. Порівняння цього CBD з діатілом, що складається з конструкцій 1 і 2 (приклади 6.1), показало, що CBD, що містять домени, які походять від шарнірного домену і ланцюга лямбда, мали дещо більш високу афінність до одного з епітопів-мішеней або до обох епітопів.

Матеріали і методи

Конструювання і моделювання поліпептидних молекул: Поліпротеїновий попередник: Нуклеїновокислотні експресійні вектори були сконструйовані для створення 2 молекул поліпротеїнових попередників, схематично проілюстрованих на фіг.17. Конструкція 13 (SEQ ID NO: 95) складалася з N-кінця поліпептидного ланцюга, VL-домену 3G8, VH-домену 2.4G2 (який зв'язувався з mCD32B), сайту розщеплення фурином, VL-домену 2.4G2 і VH-домену 3G8. Нуклеотидна послідовність, яка кодує конструкцію 13, представлена в SEQ ID NO: 96. Конструкція 14 (SEQ ID NO: 97) (фіг. 17) складалася з N-кінця поліпептидного ланцюга, VL-домену 3G8, VH-домену 2.4G2 (який зв'язувався з mCD32B), сайту розщеплення фурином, сайту FMD (протеази С3 вірусу ящуру), VL-домену 2.4G2 і VH-домену 3G8. Нуклеотидна послідовність, яка кодує конструкцію 14, представлена в SEQ ID NO: 98.

Нуклеїновокислотні експресійні вектори були сконструйовані для створення модифікованих варіантів конструкцій 1 і 2, описаних у прикладі 6.1. Конструкція 15 (SEQ ID NO: 99, фіг.17) була аналогічна конструкції 1 (SEQ ID NO: 9), представленій в прикладі 6.1, за винятком того, що С-кінець конструкції 15 містив амінокислотну послідовність FNRGEC (SEQ ID NO: 23). Послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує конструкцію 15, представлена в SEQ ID NO: 100. Конструкція 16 (SEQ ID NO: 101) (фіг. 17) була аналогічна конструкції 2, представленій в прикладі 6.1, за винятком того, що С-кінець конструкції 16 містив амінокислотну послідовність VEPKSC (SEQ ID NO: 77). Послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує конструкцію 16, представлена в SEQ ID NO: 102.

ПЛР і конструювання експресійного вектора: Усі ПЛР і протоколи очищення ПЛР-продуктів описані в прикладах 6.1 і 6.2.

ПЛР із перекриванням: Кінцеві ПЛР-продукти конструювали, ампліфікували й очищали методами, описаними в прикладах 6.1 і 6.2, з використанням відповідних праймерів.

Кінцеві продукти клонували в експресійний вектор ссавців pCIneo (Promega, Inc.), як описано раніше. Плазмідні кодуючі конструкції позначали, як показано в таблиці 16.

Таблиця 16

Плазмідні конструкції

Кодована конструкція	Позначення плазміди	Вставка
13	pMGX0750	3G8VL-2.4G2Vн-фурин-2.4G2VL-3G8VH
15	pMGX0752	Hu2B6VL-Hu3G8VH-FNRGEC
16	pMGX0753	Hu3G8VL-ни2B6VH-VEPKSC

Експресія поліпептиду/діатіла: Клітини HEK-293 трансфікували з використанням ліпофектаміну 2000, як описано в розділі 6.1, шляхом перенесення однієї плазміди pMGX0750, що кодує конструкцію 13, і двох плазмід pMGX0752 і pMGX0753, які кодують конструкції 15 і 16, відповідно. Після культивування протягом трьох днів збирали кондиціоновані середовища, і секретований продукт піддавали афінному очищенню, як описано в даній заявці.

ELISA: Зв'язування молекул діатіл, секретованих у середовище, аналізували за допомогою "сендвіч»-ELISA, як описано вище. Мишачий CD32B використовували для сенсибілізації планшета, тобто, як білок-мішень, а ПХ-кон'югований CD16A використовували як зонд для продукту котрансфекції конструкцій 15 і 16. mCD32B використовували як білок-мішень, а кон'югований з біотином CD16A використовували як зонд для рекомбінантної системи, що містить конструкцію 13.

Результати

Кондиціоноване середовище від рекомбінантних експресійних систем, що містять конструкції 13, аналізували за допомогою "сендвіч»-ELISA. ELISA-аналіз проводили для оцінки специфічності зв'язування CBD з будь-яким з mCD32B і/або CD16 або з обома цими антигенами (фіг. 18). CD32B служив як антиген-мішень, а CD16A використовували як другий зонд. Позитивний сигнал у ELISA-аналізі вказував на те, що гетеродимерне CBD h2.4G2-h3G8, продуковане з поліпротеїнового попередника, мало специфічність до обох антигенів.

Аналогічним чином, очищений продукт, продукований за допомогою котрансфекції векторами, що кодують конструкції 15 і 16, тестували в ELISA-аналізі і порівнювали з продуктом, що складається з конструкцій 1 і 2 (приклад 6.1). CD32B служив як антиген-мішень, а CD16A використовували як другий зонд. Було виявлено, що продукт, який складається з конструкцій 1 і 2, а також продукт, який складається з конструкцій 15 і 16, здатні одночасно зв'язуватися з CD32B і CD16A. Дійсно, продукт, що складається з конструкцій 15 і 16, виявляв злегка підвищену афінність відносно одного або обох антигенів-мішеней, тобто до CD32B або CD16A. Це, ймовірно, обумовлено підвищеною стабільністю і/або точністю (у порівнянні з взаємодією VH-VL-домену дикого типу) внутрішньоланцюгового зв'язування, забезпечуваного взаємодією ділянки ланцюга лямбда, FNRGEC (SEQ ID NO: 23) і шарнірної ділянки VEPKSC (SEQ ID NO: 77), яка була відсутня в продукті, що складається з конструкцій 1 і 2.

6.5. Застосування перенацілювальних реагентів з подвійною афінністю ("DART") для зв'язування з множиною афінностей

В одному зі своїх аспектів даний винахід стосується нових "перенацілювальних реагентів з подвійною афінністю" ("DART"), а також нових способів зв'язування з множиною афінностей. "DART" можуть бути моноспецифічними, біспецифічними, триспецифічними і т. п., тобто, вони мають здатність одночасно зв'язуватися з одним, двома, трьома або більше різними епітопами (які можуть являти собою ті самі або різні антигени). "DART" можуть бути також одновалентними, двовалентними, тривалентними, чотиривалентними, п'ятивалентними, шестивалентними і т. п., тобто, вони можуть одночасно зв'язуватися з однією, двома, трьома, чотирма, п'ятьма, шістьма або більше молекулами. Як показано на фіг. 35, ці дві ознаки DART можуть бути об'єднані, наприклад, для одержання біспецифічних антитіл, які є чотиривалентними і т. п.

Одна з переваг розробки DART полягає в тому, що він має афінність відносно прототипового імунного рецептора, huCD32B, а також до гаптену, флуоресцеїну. Цей DART, що позначається "2B6/4420", служить як універсальний адаптер, що має здатність зв'язувати huCD32B з молекулами, що взаємодіють з партнерами по зв'язуванню, кон'югованими з флуоресцеїном. CD32B являє собою Fc-рецептор, що має здатність гасити активуючі сигнали за допомогою кластеризації з імунними комплексами, що передають активуючі сигнали. Ця технологія, на початковому етапі її здійснення, дозволяє швидко скринувати декілька біологічних мішеней на кластеризацію з huCD32B і не вимагає одержання нових конструкцій

DART. 2B6/4420 може бути просто змішаний із флуоресцеїн-кон'югованим антитілом, спрямованим проти рецептора клітинної поверхні, що дозволяє імітувати дію DART з афінністю до цього рецептора (фіг. 20). Крім того, за допомогою цього реагенту можна здійснювати ефективне зв'язування афінних реагентів, які важко піддаються експресії або продукуванню, що дозволяє вирішити існуючі технічні проблеми. 2B6/4420-вмісні DART можуть бути з успіхом використані як інструменти для досліджень, а також як кандидати на їхнє застосування в клінічних цілях. 2B6/4420, продукований із клітин HEK293, може одночасно зв'язуватися з CD32B і з флуоресцеїном у ELISA-аналізі. Крім того, він може інгібувати проліферацію клітин за допомогою рекрутинга CD32B у комплекс BCR завдяки спільному зв'язуванню з CD79. 2B6-гілка DART може бути замінена іншою послідовністю антитіла або зв'язувальною послідовністю, що має іншу релевантну специфічність.

Матеріали і методи:

Плазмідні конструкції: 2B6/4420 одержували з послідовностей гуманізованого MAb 2B6 (hu2B6, MGA321) і химерного мишачого Fv/людського Fc-варіанту MAb проти флуоресцеїну, 4420. Повністю зібраний DART складається з двох поліпептидів, ковалентно зв'язаних із двома Fv-ділянками. Перший поліпептид складається із секреторної сигнальної послідовності, за якою йде hu2B6VL, продукована у вигляді злитого білка з 4420VH, розділених лінкером, що складається з амінокислотних залишків GGGSGGGG. Послідовність FNRGEC, що походить від C-кінця легкого ланцюга каппа, приєднували до C-кінця цього поліпептиду. Інший поліпептид складається із сигнальної послідовності-4420VL-GGGSGGGG-hu2B6VH, де послідовність VEPKSC, що походить від C-кінця Fd-фрагмента людського IgG1, була приєднана до C-кінця. Цистеїни в двох ланцюгах утворюють дисульфідний зв'язок, ковалентно з'єднуючу два поліпептиди (фіг. 20). Послідовності ДНК, що кодують описані поліпептиди, піддавали ПЛР-амплификації з наявних плазмід, об'єднували за допомогою ПЛР із перекриванням і клонували в pCIneo (Promega) між NheI- і EcoRI-сайтами. І нарешті, DART з афінністю до huCD32B і huCD16 (2B6/3G8), що був попередньо сконструйований методами, аналогічними методам, описаним вище, використовували як контроль.

Антитіла. Мишачі моноклональні антитіла проти людських CD79b, CB3.1 і CB3.2 (гібридоми) одержували в Dr. Cooper MD, у Бірмінгемському університеті в Алабамі (University of Alabama at Birmingham, Birmingham AL.). CB3.1 і CB3.2 були позначені флуоресцеїн-ізотіоціанатом (ФІТЦ) відповідно до інструкцій виробників (Pierce, Rockford IL). $F(ab')^2$-фрагмент козячого антитіла (GAM), специфічного до Fc-фрагмента мишачого IgG (GAM), одержували з лабораторії Jackson Laboratories (West Grove, PA). Мишачі анти-huCD32B MAb, 3H7, одержували й очищали у власній лабораторії. Козяче анти-2B6Fv антитіло продукували шляхом імунізації кіз цілим антитілом hu2B6 і афінного очищення з використанням антитіла проти Fv-ділянки hu2B6. HuIgG, ФІТЦ-huIgG і ПХ-кон'юговані антитіла проти мишачого IgG одержували з лабораторії Jackson Immunoresearch. ПХ-кон'юговане антикозяче антитіло одержували з Southern Biotech.

Експресія DART: Плазміди, що кодують кожен ланцюг, спільно переносили в клітини 293H (Invitrogen) з використанням ліпофектаміну 2000 (Invitrogen) відповідно до інструкцій виробників. Секретований білок збирали 3-4 рази з інтервалами в три дні й очищали за допомогою рідинної хроматографії проти іммобілізованої розчинної форми CD32B.

ELISA: DART 2B6/4420 або 2B6/3G8 іммобілізували на планшетах MaxiSorp (Nalge Nunc), покритих ФІТЦ-міченним білком S (Novagen), людським IgG або ФІТЦ-hu IgG. Детектування здійснювали шляхом зв'язування з розчинним ектодоменом CD32B, а потім з 3H7 (мишачим моноклональним антитілом, специфічним до CD32B), і нарешті, із ПХ-кон'югованим антимишачим антитілом. Альтернативно, детектування здійснювали шляхом зв'язування з афінно очищеною сироваткою, що містить козяче поліклональне антитіло проти Fv 2B6, а потім із ПХ-кон'югованим антикозячим антитілом. ПХ-активність детектували з використанням колориметричного субстрату TMB (BioFX) і зчитували на ELISA-планшет-рідері VersaMax.

Очищення B-клітин і аналіз на проліферацію: Мононуклеарні клітини периферичної крові брали з крові здорових донорів і розділяли в градієнті фікола-пака Ficoll/Paque Plus (Amersham Pharmacia Biotech, UK). B-лімфоцити виділяли з використанням набору Dynal для негативного відбору B-клітин (Dynal Biotechnology Inc., NY) відповідно до інструкцій виробників. Чистота виділених B-клітин ($CD20^+$) на 90 % перевищувала чистоту, оцінену в FACS-аналізі. Для проведення аналізу на проліферацію очищені B-клітини висівали в повне середовище RPMI 1640, що міститься в плоскодонних 96-ямкових мікротитраціних планшетах, при щільності 1×10^5 клітин на ямку в кінцевому об'ємі 200 мкл і інкубували протягом 48 годин у присутності або під час відсутності антитіл і діатіл при 37°C в 5 % CO_2. Потім додавали 1 мкКі/ямку [^{3}H]-тимідину (Perkin Elmer, Wellesley, MA) і інкубування продовжували ще 16-18 годин, після чого клітини збирали. Включення [^{3}H]-тимідину визначали на рідинному сцинтиляційному лічильнику.

Результати

Для того щоб визначити, чи є DART 2B6/4420 активним і специфічним, проводили два ELISA-експерименти. Спочатку 2B6/4420 або 2B6/3G8 (використовувані як негативний контроль) зв'язували з флуоресцеїн-кон'югованим білком (S-білком), що був нанесений на ELISA-планшети. Потім 2B6-гілку DART піддавали контактуванню з розчинним CD32B. Зв'язування детектували з використанням іншого антитіла проти CD32B, що має епітоп, що не перекривався з 2B6, а потім з використанням ПХ-кон'югованого "другого" антитіла. 2B6/4420-DART мав здатність одночасно зв'язуватися з флуоресцеїном і CD32B, а 2B6/3G8 не мав таку здатність (фіг. 21, панель A). Якщо DART був іммобілізований на планшетах, покритих розчинним CD32B, і якщо зв'язування детектували з використанням антитіла, специфічного до hu2B6 Fv, то обидва DART виявляли гарне зв'язування. Для того, щоб продемонструвати, що 2B6/4420-DART був здатний зв'язуватися з флуоресцеїном, кон'югованим з людським IgG (приймаючи до уваги, що мова йде про початкове застосування цього реагенту), HuIgG, або немічений, або мічений флуоресцеїном, зв'язували з ELISA-планшетами і використовували для захоплення 2B6/4420. І в цьому випадку 2B6/3G8 використовували як негативний контроль. Зв'язування детектували з використанням антитіла, специфічного до Fv Hu2B6.2B6/4420-DART, ймовірно, зв'язується з ФІТЦ-HuIgG, але не зв'язується з неміченим HuIgG, що вказує на те, що цей DART має здатність зв'язуватися з флуоресцеїном, кон'югованим з антитілом, але не виявляє якого-небудь помітного зв'язування тільки з одним антитілом. Як і очікувалося, якого-небудь зв'язування 2B6/3G8-DART у жодному з цих випадків не детектувалось.

Були проведені експерименти для того, щоб продемонструвати, що 2B6/4420-DART здатний функціонувати як реагент із подвійною афінністю, що буде впливати на передачу сигналу в клітинному аналізі. Було показано, що коагрегація CD32B з BCR приводить до інгібування активації B-клітин. Була досліджена здатність 2B6/4420-DART до спільного контактування з CD32B і з BCR, покритими анти-CD79b антитілами, міченими флуоресцеїном, і до запуску механізму інгібування проліферації клітин. B-клітини були узяті з людських клітин крові шляхом негативного відбору й активовані шляхом обробки зростаючими концентраціями ФІТЦ-мічених мишачих антитіл проти людського CD79b, клонів CB3.1 і CB3.2, і шляхом додавання $F(ab')_2$-фрагмента Fc-специфічного GAM як другого реагенту для перехресного зв'язування BCR, разом з фіксованою концентрацією (5 мкг/мл) 2B6/4420-DART або з еквівалентною кількістю 2B6/3G8-DART, тобто з молекулою, що не націлена на флуоресцеїн, а тому використовується як контроль. Проліферація клітин, оцінювана по включенню [^{3}H]-тимідину, зростала в міру збільшення концентрацій ФІТЦ-кон'югованого моноклонального анти-CD79b антитіла-активатора під час відсутності DART або в присутності контрольного 2B6/3G8-DART. Присутність 2B6/4420-DART приводила до значного зниження рівня проліферації B-клітин при всіх концентраціях ФІТЦ-кон'югованого антитіла проти людського CD79b (фіг. 22, панелі A і B, і фіг. 23, панель A).

Інгібування проліферації не спостерігалося в тому випадку, якщо B-клітини були покриті неміченими CB3.2 і були активовані в тих же самих експериментальних умовах, що були використані при обробці агентом 2B6/4420-DART, що підтверджувало його специфічність до мішені (фіг. 23, панель B). Ці дані показали, що 2B6/4420-DART має здатність перехресно зв'язуватися з CD32B і BCR і передавати інгібуючий сигнал, здатний блокувати активацію клітин, індуковану антигенним рецептором.

6.6. DART, що має імунотерапевтичні властивості відносно CD32B-експресуючих B-клітинних злоякісних пухлин

В даний час B-клітинні злоякісні пухлини піддають лікуванню з використанням анти-CD20 антитіла Rituxan®. Однак деякі B-клітинні злоякісні пухлини не експресують CD20 або стають резистентними до ритуксану. DART відповідно до винаходу мають альтернативні імунотерапевтичні властивості, що можуть бути використані при вирішенні проблем, що виникають при проведенні лікування анти-CD20 антитілом Rituxan®.

MGD261 являє собою перенацілювальну молекулу з подвійною афінністю (DART), що зв'язується з hCD32B (за допомогою антитіла h2B6) і з hCD16A і hCD16B (за допомогою антитіла h3G8).

Ефективність (виснаження B-клітин) і безпеку MGD261 тестували на mCD32$^{-/-}$hCD16A$^+$-мишах C57B1/6, mCD32$^{-/-}$hCD32B$^+$-мишах C57B1/6 і mCD32$^{-/-}$ hCD16A$^+$hCD32B$^+$-мишах C57B1/6. У цьому експерименті з повторними дозами, мишам уводили 6 i.v.-ін'єкцій (два рази на тиждень протягом 3 тижнів). Потім проводили моніторинг виснаження B-клітин за допомогою FACS. Безпеку оцінювали за допомогою моніторингу побічних ефектів шляхом спостереження мишей, що містяться в клітинах.

Ці дані показали, що MGD261 мав здатність виснажувати B-клітини в трансгенних мишей із двома генними мутаціями без індукування яких-небудь серйозних побічних ефектів.

Дані: mCD32$^{-/-}$hCD16A^{+}-мишам C57B1/6, mCD32$^{-/-}$hCD32B^{+}-мишам C57B1/6 і mCD32$^{-/-}$ hCD16A^{+}hCD32B^{+}-мишам C57B1/6, отриманим від MacroGenics і виведеним шляхом схрещування, i.v. ін'єктували на дні 0, 3, 7, 10, 14 і 17 MGD261 (10, 3, 1 або 0,3 мг/кг) або нерелевантне антитіло (hE16, 10 мг/кг). Кров брали на дні -19 (до узяття крові) і на дні 4, 11, 18, 25 і 32 для FACS-аналізу. Стан здоров'я й активність тварин реєстрували три рази на тиждень.

Схема експерименту:

Група	Тварини		Тестований продукт	Доза (мг/кг)
	#	Миші		
A	4	mCD32-/- hCD16A+	hE16	10
B	5	mCD32-/- hCD16A+	MGD261	10
C	3	mCD32-/- hCD32B+	hE16	10
D	3	mCD32-/- hCD32B+	MGD261	10
E	5	mCD32-/- hCD16A+ hCD32B+	hE16	10
F	5	mCD32-/- hCD16A+ hCD32B+	MGD261	10
G	5	mCD32-/- hCD16A+ hCD32B+	MGD261	3
H	5	mCD32-/- hCD16A+ hCD32B+	MGD261	1
I	5	mCD32-/- hCD16A+ hCD32B+	MGD261	0,3

Метод FACS-аналізу: Проби цільної крові брали за 18 днів до введення h2B6-h3G8 і через 4, 11, 18, 25 і 32 дні після введення. Проби крові аналізували для визначення впливу h2B6-h3G8 на число B-клітин за допомогою FACS-аналізу. Для підрахунку числа B-клітин, T-клітин і PMN проводили аналіз за відповідною схемою, що не включала промивання, але включала використання сфер FlowCount, отриманих від Beckman Coulter. Панель антитіл, використовуваних у цьому аналізі, являє собою 1A8-ФІТЦ для PMN, CD3-PE для T-клітин, CD19-APC для B-клітин і CD45-PerCP для всіх лейкоцитів.

Результати

Миші, оброблені hE16 або MGD261 (у будь-якій концентрації), не мали яких-небудь ознак дискомфорту за весь період проведення експерименту.

Виснаження B-клітин спостерігалося в мишей, трансгенних по двох hCD16A і hCD32B. Діатіло h2B6-3G8 зв'язувалося з hCD16A-експресуючими ефекторними клітинами і з hCD32B-експресуючими B-клітинами, де таке зв'язування було необхідно для знищення B-клітин. Виснаження B-клітин не спостерігалося в трансгенних мишей з однією мутацією (фіг. 24). Під час дослідження яких-небудь значимих змін рівнів T-клітин і PMN не спостерігалося.

Для додаткової ілюстрації альтернативних імунотерапевтичних властивостей відповідно до винаходу був сконструйований сурогатний MGD261, позначений "2.4G2-3G8 DB". 2.4G2-3G8 DB являє собою перенацілювальну молекулу з подвійною афінністю (DART), що зв'язується з mCD32B (за допомогою антитіла 2.4G2) і з hCD16A і hCD16B (за допомогою антитіла h3G8).

Ефективність (виснаження B-клітин) і безпеку 2.4G2-3G8 DB тестували на mCD16$^{-/-}$, mCD16$^{-/-}$ hCD16A^{+}-мишах C57B1/6, mCD16$^{-/-}$ hCD16B^{+} і mCD16$^{-/-}$ hCD16A^{+}hCD16B^{+}-мишах. У цьому експерименті з повторними дозами, мишам уводили 9 i.p.-ін'єкцій (три рази на тиждень протягом 3 тижнів). Потім проводили моніторинг виснаження B-клітин за допомогою FACS. Безпеку оцінювали за допомогою моніторингу побічних ефектів шляхом спостереження мишей, що містяться в клітинах.

Ці дані показали, що 2.4G2-3G8 DB мав здатність виснажувати B-клітини в hCD16-трансгенних мишей без індукування яких-небудь серйозних побічних ефектів.

Дані: mCD16$^{-/-}$, mCD16$^{-/-}$ hCD16A^{+}-мишам C57B1/6, mCD16$^{-/-}$ hCD16B^{+} і mCD16$^{-/-}$ hCD16A^{+}hCD16B^{+}-мишам, отриманим від MacroGenics і виведеним шляхом схрещування, i.p. ін'єктували на дні 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16 і 18 2.4G2-3G8 DB (75 мкг/миша) або PBS. Кров брали на дні -19 (до узяття крові) і на дні 4, 11 і 18 для FACS-аналізу. Стан здоров'я й активність тварин реєстрували три рази на тиждень.

Група	# тварин	Доза мкг/миша	Тест-продукт	Спосіб введення	Час забору крові
A	2 mCD16-/-	-	PBS	IP	Дні -10, 4, 11, 18
B	2 mCD16-/- 16A+ B6	-	PBS	IP	Дні -10, 4, 11, 18
C	2 mCD16-/- 16B+	-	PBS	IP	Дні -10, 4, 11, 18
D	2 mCD16-/- 16A+ 16B+	-	PBS	IP	Дні -10, 4, 11, 18
E	6 mCD16-/-	75	2.4G2-3G8 DB	IP	Дні -10, 4, 11, 18
F	6 mCD16-/- 16A+ B6	75	2.4G2-3G8 DB	IP	Дні -10, 4, 11, 18
G	6 mCD16-/- 16B+	75	2.4G2-3G8 DB	IP	Дні -10, 4, 11, 18
H	6 mCD16-/- 16A+ 16B+	75	2.4G2-3G8 DB	IP	Дні -10, 4, 11, 18

Метод FACS-аналізу: Проби цільної крові брали за 10 днів до введення 2.4G2-3G8 і через 4, 11 і 18 днів після введення. Проби крові аналізували для визначення впливу 2.4G2-3G8 на число B-клітин за допомогою FACS-аналізу. Для підрахунку числа B-клітин, T-клітин і PMN проводили аналіз за відповідною схемою, що не включала промивання, але включала використання пробірок TruCOUNT, отриманих від BD Immunocytometry System. Панель антитіл, використовуваних для аналізу, являла собою 1A8-ФІТЦ для PMN, CD3-PE для T-клітин, CD19-APC для B-клітин і CD45-PerCP для всіх лейкоцитів.

Результати

Миші, оброблені hE16 або 2.4G2-3G8 DB, не мали яких-небудь ознак дискомфорту за весь період проведення експерименту.

Виснаження B-клітин спостерігалося в mCD16$^{-/-}$ hCD16A^{+} або в mCD16$^{-/-}$ hCD16A^{+}hCD16B^{+}-мишей, але не в mCD16$^{-/-}$-мишей. Ці дані показали, що hCD16A-несучі ефекторні клітини необхідні для знищення B-клітин (фіг. 25). Під час дослідження яких-небудь значимих змін рівнів T-клітин і PMN не спостерігалося.

Модель внутрішньовенного (i.v.) уведення: Протипухлинну активність MGD261 тестували з використанням внутрішньовенної (i.v.) моделі людської пухлинної клітинної лінії Raji. Raji являє собою людську клітинну лінію лімфоми Беркітта, експресуючу hCD32B. При внутрішньовенному введенні пухлинних клітин mCD16$^{-/-}$, hCD16A^{+}, RAG1$^{-/-}$-мишам, ці клітини локалізуються в хребті і викликають параліч задніх кінцівок.

Отримані дані показали, що MGD261 має здатність блокувати ріст пухлинних клітин Raji in vivo у mCD16$^{-/-}$, hCD16A^{+}, RAG1$^{-/-}$-мишей. Отримані дані показали, що MGD261 може бути використаний для лікування CD32B-експресуючих B-клітинних злоякісних пухлин у людини.

Дані: 12-20-тижневим mCD16$^{-/-}$, hCD16A^{+}, RAG1$^{-/-}$-мишам C57B1/6, отриманим від MacroGenics і виведеним шляхом схрещування, внутрішньовенно вводили 5×10^{6} клітин Raji на день 0. Потім мишам на дні 6, 9, 13, 16, 20, 23, 27 і 30 також внутрішньоочеревинно (i.p.) уводили 250, 25 або 2,5 мкг MGD261 або PBS (негативний контроль). Після цього мишей щодня спостерігали і реєстрували масу тіла два рази на тиждень. Мишей, у яких розвивався параліч задніх кінцівок, умертвляли.

Результати: PBS-оброблені миші гинули на дні 25-50. MGD261-оброблені миші виживали щонайменше до дня 90 (фіг. 26). Таке підвищення виживаності було статистично значущим. Порівняння кривих виживаності, проведене з використанням логрангового критерію, давало величину χ^2=96,46 (df=9; величина P<0,0001).

6.7. Експресія DART у прокаріотах

Були проведені експерименти для оцінки здатності продукування DART у хазяїнів, що не є ссавцями. Відповідно до цього, клітини Escherichia coli трансформували DART-експресуючою плазмідою, і проводили моніторинг експресії DART.

Матеріали і методи:

Конструювання плазміди: 3G8 являє собою гуманізоване моноклональне антитіло проти HuCD16. Описаний тут DART складається з двох ковалентно зв'язаних ланцюгів, кожен з яких має VL, за якою розташований спейсер, а за ним йде VH, за якою розташований Cys, де вказане розташування є сприятливим для утворення дисульфідного зв'язку з протилежним ланцюгом. Послідовність DART, що кодує 3G8VL-GlyGlyGlySerGlyGlyGlyGly (SEQ ID NO: 10)-

3G8VH-LeuGlyGlyCys, піддавали ПЛР-ампліфікації з наявною еукаріотичною експресійною конструкцією і гідролізували ферментами Nco I і EcoR I. Націлювальний вектор являє собою pET25b (+) (Novagen), що містить лідерну послідовність pelB для секреції в E. coli. Перед убудовуванням послідовностей 3G8/3G8 DART, цей вектор модифікували в такий спосіб. Спочатку, промотор T7 заміняли промотором lac з більш низькою активністю для полегшення продукування розчинного білка, який хоча і експресується під його контролем на більш низькому рівні. Крім того, були введені дві точкові мутації з метою елімінації двох внутрішніх кодонів Met, які присутні на початку сайту множинного клонування (MCS) для того, щоб забезпечити перевагу ініціації Met, який присутній на початку лідерної послідовності pelB. DART, що був продукований з використанням цієї конструкції, складався з двох гілок V-ділянки, що мають одну і ту ж специфічність, а саме, специфічність до HuCD 16.

Експресія: Клітини BL21DE3 (Novagen) були трансформовані плазмідою pET25b(+) T7-lac+3G8/3G8, і amp-резистентні колонії використовували для засіву бульйонної культури. Коли культура досягала OD600=0,5 одиниць додавали 0,5 мМ IPTG для індукування експресії. Культуру вирощували при 30 °C протягом 2 годин і збирали безклітинне середовище.

Очищення: 3G8/3G8-DART очищали в дві стадії за допомогою афінної і ексклюзійної хроматографії. DART захоплювали з кондиціонованого середовища за допомогою афінної хроматографії. Зокрема, CD16A зв'язували з CNBr-активованою сефарозою 4B (GE Healthcare). CD16A-сефарозну смолу врівноважували в 20 мМ tpic/HCl, pH 8,0, а потім завантажували на колонку. Після завершення завантаження смолу промивали врівноважувальним буфером, після чого зв'язаний DART елюювали 50 мМ гліцину, pH 3,0. Елюйований DART відразу нейтралізували 1M tpic/HCl, pH 8,0, і концентрували на концентраторі центрифугального типу (Vivaspin 20, 10k MWCO PES, VivaScience Inc.). Потім концентрований DART очищали за допомогою ексклюзійної хроматографії на колонці з Superdex 200 (GE Healthcare), урівноваженій в PBS.

Результати

1,7 літра кондиціонованого середовища для культивування E. coli пропускали через колонку з CD16A-сефарозою. Вихід DART становив 0,12 мг. Аналіз очищеного DART за допомогою електрофорезу в ДСН-ПААГ і ЕХ-хроматографії продемонстрував його сумісність із клітинами ссавців (CHO), які експресували контрольний DART (фіг. 27).

ELISA-аналіз на зв'язування експресованих у E. coli h3G8-h3G8-DART: Експресію h3G8-h3G8-DART у E. coli вимірювали за допомогою ELISA. 50 мкл/ямку 2 мкг/мл Fv-специфічного анти-h3G8 антитіла 2C11 наносили на 96-ямковий планшет Maxisorp у карбонатному буфері при 4 °C протягом ночі. Цей планшет три рази промивали PBS-T (PBS, 0,1 % твін 20), а потім блокували 0,5 % BSA у PBS-T протягом 30 хвилин при кімнатній температурі, після чого додавали тестований DART. Під час блокування експресовані в E. coli h3G8-h3G8 DART, h2B6-h3G8 DART і h2B6-h2B6 DART (негативний контроль) розводили в 1 мкг/мл і 0,3 мкг/мл у PBST/BSA. У кожну ямку додавали 50 мкл/ямку розведених DART. Планшет інкубували при кімнатній температурі протягом 1 години. Після триразового промивання PBS-T, у планшет додавали 50 мкл/ямку 0,1 мкг/мл гібрида "біотинільований sCD16-Fc". Планшет інкубували при кімнатній температурі протягом 1 години. Після триразового промивання PBS-T, 50 мкл/ямку 1:5000-розведення ПХ-кон'югованого стрептавідину (Amersham Pharmacia Biotech) використовували для детектування і інкубували при кімнатній температурі протягом 1 години. Планшет три рази промивали PBS-T і виявляли з використанням 80 мкл/ямку субстрату TMB. Після 5-хвилинного інкубування реакцію припиняли шляхом додавання 40 мкл/ямку 1 % H_2SO_4. OD450 нм зчитували на 96-ямковому планшет-рідері з використанням програми SOFTmax. За отриманими результатами будували графік з використанням програми GraphPadPrism 3.03. (фіг. 28).

6.8. DART-індукована загибель людських B-клітин

Людські МКПК інкубували протягом ночі з конструкціями "CD16-CD32B-hu3G8-hu2b6" (описаними вище); "ch2B6-aglyc - неглікозиловане химерне антитіло 2B6" (описаними в одночасно розглянутій заявці на патент США, реєстраційний № 11/108135, опублікованій як US2005/0260213, що вводиться в даний опис за допомогою посилання) і з CD16-CD79. Нижче приводяться послідовності ДНК і кодовані послідовності білків CD16-CD79:

H3G8VL-CB3.1VH

Нуклеотидна послідовність (SEQ ID NO: 226):

gacatcgtga tgacccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga 50
gagggccacc atcaactgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg 100
atagttttat gaactggtac caacagaaac caggacagcc acccaaactc 150
ctcatctata ctacatccaa tctagaatct ggggtcccag acaggtttag 200

tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcagc agcctgcagg 250
ctgaggatgt ggcagtttat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac 300
acgttcggac aggggaccaa gcttgagatc aaaggaggcg gatccggagg 350
cggaggccag gtccaactgc agcagcctgg ggctgagctg gtgaggcctg 400
gggcttcagt gaagctgtcc tgcaaggctt ctggctacac cttcaccagc 450
tactggatga actgggtgaa gcagaggcct ggacaaggcc ttgaatggat 500
tggtatggtt gatccttcag acagtgaaac tcactacaat caaatgttca 550
aggacaaggc cacattgact gttgacaaat cctccagcac agcctacatg 600
cagctcagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag 650
agctatgggc tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc tcctcagttg 700
agcccaaatc ttgt 714

Амінокислотна послідовність (SEQ ID NO: 227):

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKASQSVD FDGDSFMNWY QQKPGQPPKL 50
LIYTTSNLES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQQSNEDPY 100
TFGQGTKLEI KGGGSGGGGQ VQLQQPGAEL VRPGASVKLS CKASGYTFTS 150
YWMNWVKQRP GQGLEWIGMV DPSDSETHYN QMFKDKATLT VDKSSSTAYM 200
QLSSLTSEDS AVYYCARAMG YWGQGTSVTV SSVEPKSC 238

CB3.1VL-h3G8VH

Нуклеотидна послідовність (SEQ ID NO: 228):

gatgttgtga tgacccagac tccactcact ttgtcggtta acattggaca 50
accagcctcc atctcttgta agtcaagtca gagcctctta gatactgatg 100
gaaagacata tttgaattgg ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaac 150
cgcctaatct atctggtgtc taaactggac tctggagtcc ctgacaggtt 200
cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc agcagagtgg 250
aggctgagga tttgggaatt tattattgct ggcaaggtac acattttccg 300
ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaaggag gcggatccgg 350
aggcggaggc caggttaccc tgagagagtc tggccctgcg ctggtgaagc 400
ccacacagac cctcacactg acttgtacct tctctgggtt ttcactgagc 450
acttctggta tgggtgtagg ctggattcgt cagcctcccg ggaaggctct 500
agagtggctg gcacacattt ggtgggatga tgacaagcgc tataatccag 550
ccctgaagag ccgactgaca atctccaagg atacctccaa aaaccaggta 600
gtcctcacaa tgaccaacat ggaccctgtg gatactgcca catactactg 650
tgctcaaata aaccccgcct ggtttgctta ctggggccaa gggactctgg 700
tcactgtgag ctcattcaac aggggagagt gt 732

Амінокислотна послідовність (SEQ ID NO: 229):

DWMTQTPLT LSVNIGQPAS ISCKSSQSLL DTDGKTYLNW LLQRPGQSPN 50
RLIYLVSKLD SGVPDRFTGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGI YYCWQGTHFP 100
LTFGAGTKLE LKGGGSGGGG QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLS 150
TSGMGVGWIR QPPGKALEWL AHIWWDDDKR YNPALKSRLT ISKDTSKNQV 200
VLTMTNMDPV DTATYYCAQI NPAWFAYWGQ GTLVTVSSFN RGEC 244

Апоптоз оцінювали за допомогою FACS-аналізу як відсоток PI+анексин-V+популяція В-клітин ($CD20^+$-клітин) від усієї популяції, що не пройшла стадію відбору на FSC/SSC (фіг. 29).

6.9. 8B5-CB3.1-DART

8B5VL-CB3.1VH-VEPKSC

8B5VL ампліфікували з використанням H9 і 1gh630R як праймери, і ch8B5Lc як матрицю. CB3.1VH ампліфікували з використанням Igh628F і Igh629R як праймери, і ch8B5Hc як матрицю. Лінкерна послідовність була включена в праймери Igh630R і Igh628F. С-кінцевий лінкер і стоп-кодон були включені в праймер Igh629R. ПЛР-продукти очищали на гелі і змішували разом у однакових молярних відношеннях, а потім ампліфікували з використанням H9 і Igh629R як праймерів. Продукт ПЛР із перекриванням гідролізували рестриктуючими ендонуклеазами NheI/EcoRI і клонували у вектор pCIneo.

CB3.1VL-8B5VH-FNRGEC

CB3.1VL ампліфікували з використанням H9 і Igh630R, що мають спільні послідовності, аналогічні послідовностям 8B5VL у FR4, як праймерів, і chCB3.1Lc як матриці. 8B5VH ампліфікували з використанням Igh631F і Igh640R як праймерів, і ch8B5Hc як матриці. Лінкерна послідовність була включена в праймери Igh630R і Igh631F. С-кінцевий лінкер і стоп-кодон були включені в праймер Igh640R. ПЛР-продукти очищали на гелі і змішували разом у однакових молярних відношеннях, а потім ампліфікували з використанням H9 і Igh640R як праймерів. Продукт ПЛР із перекриванням гідролізували рестриктуючими ендонуклеазами NheI/EcoRI і клонували у вектор pCIneo.

Антитіло проти мітки Flag-8B5VL-CB3.1VH-VEPKSC

Антитіло проти мітки Flag убудовували між сигнальною послідовністю і 8B5VL за допомогою ПЛР із перекриванням. Сигнальну послідовність і мітку Flag ампліфікували з використанням H9 і Igh647R як праймерів і ch8B5Lc як матриці. 8B5VL-CB3.1VH-VEPKSC знову ампліфікували з використанням Igh647F і Igh629R як праймерів і 8B5VL-CB3.1VH-VEPKSC як матриці. ПЛР-продукти очищали на гелі і змішували разом у однакових молярних відношеннях, а потім ампліфікували з використанням H9 і Igh629R як праймерів. Продукт ПЛР із перекриванням гідролізували рестриктуючими ендонуклеазами NheI/EcoRI і клонували у вектор pCIneo.

8B5VL-CB3.1VH-LGGC

Для одержання іншого С-кінцевого лінкера в конструкції 8B5VL-CB3.1VH-VEPKSC, цю конструкцію знову ампліфікували з використанням H9 і Igh646R як праймерів. С-кінцевий лінкер LGGC вбудовували в праймер Igh646R. ПЛР-продукт гідролізували рестриктуючими ендонуклеазами NheI/EcoRI і клонували у вектор pCIneo.

CB3.1VL-8B5VH-LGGC

Ту ж саму стратегію застосовували для створення CB3.1VL-8B5VH-LGGC. С-кінцевий лінкер LGGC вбудовували в праймер Igh648R і CB3.1VL-8B5VH-FNRGEC використовували як матрицю. Потім ПЛР-продукт гідролізували рестриктуючими ендонуклеазами NheI/EcoRI і клонували у вектор pCIneo.

Антитіло проти мітки Flag-8B5VL-CB3.1VH-LGGC

Ту ж саму стратегію застосовували для створення конструкції "антитіло проти мітки Flag-8B5VL-CB3.1VH-LGGC". С-кінцевий лінкер LGGC вбудовували в праймер Igh648R, а конструкцію "антитіло проти мітки Flag-8B5VL-CB3.1VH-VEPKSC" використовували як матрицю. Потім ПЛР-продукт гідролізували рестриктуючими ендонуклеазами NheI/EcoRI і клонували у вектор pCIneo.

Нуклеотидна послідовність 8B5-CB3.1-VEPKSC (SEQ ID NO: 230):

```
gacattcaga tgacacagtc tccatcctcc ctacttgcgg cgctgggaga      50
aagagtcagt ctcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa     100
gctggcttca gcagaaacca gatggaacta ttaaacgcct gatctacgcc     150
gcatccactt tagattctgg tgtcccaaaa aggttcagtg gcagtgagtc     200
tgggtcagat tatctctca ccatcagcag tcttgagtct gaagattttg     250
cagactatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggtgct     300
gggaccaagc tggagctgaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt     350
ccaactgcag cagcctgggg ctgagctggt gaggcctggg gcttcagtga     400
agctgtcctg caaggcttct ggctacacct tcaccagcta ctggatgaac     450
tgggtgaagc agaggcctgg acaaggcctt gaatggattg gtatggttga     500
tccttcagac agtgaaactc actacaatca aatgttcaag gacaaggcca     550
cattgactgt tgacaaatcc tccagcacag cctacatgca gctcagcagc     600
ctgacatctg aggactctgc ggtctattac tgtgcaagag ctatgggcta     650
ctggggtcaa ggaacctcag tcaccgtctc ctcagttgag cccaaatctt     700
gt                                                        702
```

Амінокислотна послідовність 8B5-CB3.1-VEPKSC (SEQ ID NO: 231):

DIQMTQSPSS LLAALGERVS LTCRASQEIS GYLSWLQQKP DGTIKRLIYA 50
ASTLDSGVPK RFSGSESGSD YSLTISSLES EDFADYYCLQ YFSYPLTFGA 100
GTKLELKGGG SGGGGQVQLQ QPGAELVRPG ASVKLSCKAS GYTFTSYWMN 150
WVKQRPGQGL EWIGMVDPSD SETHYNQMFK DKATLTVDKS SSTAYMQLSS 200
LTSEDSAVYY CARAMGYWGQ GTSVTVSSVE PKSC 234

Нуклеотидна послідовність CB3.1-8B5-FNRGEC (SEQ ID NO: 232):

```
gatgttgtga tgacccagac tccactcact ttgtcggtta acattggaca      50
accagcctcc atctcttgta agtcaagtca gagcctctta gatactgatg     100
gaaagacata tttgaattgg ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaac     150
cgcctaatct atctggtgtc taaactggac tctggagtcc ctgacaggtt     200
cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc agcagagtgg     250
aggctgagga tttgggaatt tattattgct ggcaaggtac acattttccg     300
ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaaggag gcggatccgg     350
aggcggaggc gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac     400
ctggaggatc catgaaactc tcttgtgaag cctctggatt cacttttagt     450
gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct ccagagaagg ggcttgagtg     500
ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca tactatgctg     550
agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt     600
gtctacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta     650
ctgtgggggt ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag     700
tctcctcgtt caacaggggga gagtgt                              726
```

Амінокислотна послідовність CB3.1-8B5-FNRGEC (SEQ ID NO: 233):
DVVMTQTPLT LSVNIGQPAS ISCKSSQSLL DTDGKTYLNW LLQRPGQSPN 50
RLIYLVSKLD SGVPDRFTGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGI YYCWQGTHFP 100
LTFGAGTKLE LKGGGSGGGG EVKLEESGGG LVQPGGSMKL SCEASGFTFS 150
DAWMDWVRQS PEKGLEWVAE IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDSKSS 200
VYLQMNSLRA EDTGIYYCGA LGLDYWGQGT TLTVSSFNRG EC 242

8B5VL-CB3.1VH-LGGC

8B5VL ампліфікували з використанням H9 і Igh694R як праймерів і ch8B5Lc як матриці. 8B5VH ампліфікували з використанням Igh695F і Igh696R як праймерів і ch8B5Hc як матриці. Лінкерна послідовність була включена в праймери Igh694R і Igh695F. HuIgG1Fc ампліфікували з використанням Igh355F і Igh366R як праймерів і ch8B5Hc як матриці. ПЛР-продукти очищали на гелі і змішували разом у однакових молярних відношеннях, а потім ампліфікували з використанням H9 і Igh366R як праймерів. Продукт ПЛР із перекриванням гідролізували рестриктуючими ендонуклеазами NheI/EcoRI і клонували у вектор pCIneo.

Нуклеотидна послідовність 8B5VL-CB3.1VH-LGGC (SEQ ID NO: 234):

```
gacattcaga tgacacagtc tccatcctcc ctacttgcgg cgctgggaga      50
aagagtcagt ctcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa     100
gctggcttca gcagaaacca gatggaacta ttaaacgcct gatctacgcc     150
gcatccactt tagattctgg tgtcccaaaa aggttcagtg gcagtgagtc     200
tgggtcagat tattctctca ccatcagcag tcttgagtct gaagattttg     250
cagactatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggtgct     300
gggaccaagc tggagctgaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt     350
ccaactgcag cagcctgggg ctgagctggt gaggcctggg gcttcagtga     400
agctgtcctg caaggcttct ggctacacct tcaccagcta ctggatgaac     450
tgggtgaagc agaggcctgg acaaggcctt gaatggattg gtatggttga     500
tccttcagac agtgaaactc actacaatca aatgttcaag gacaaggcca     550
cattgactgt tgacaaatcc tccagcacag cctacatgca gctcagcagc     600
ctgacatctg aggactctgc ggtctattac tgtgcaagag ctatgggcta     650
ctggggtcaa ggaacctcag tcaccgtctc ctcactggga ggctgc         696
```

Амінокислотна послідовність 8B5VL-CB3.1VH-LGGC (SEQ ID NO: 235):
DIQMTQSPSS LLAALGERVS LTCRASQEIS GYLSWLQQKP DGTIKRLIYA 50
ASTLDSGVPK RFSGSESGSD YSLTISSLES EDFADYYCLQ YFSYPLTFGA 100
GTKLELKGGG SGGGGQVQLQ QPGAELVRPG ASVKLSCKAS GYTFTSYWMN 150
WVKQRPGQGL EWIGMVDPSD SETHYNQMFK DKATLTVDKS SSTAYMQLSS 200
LTSEDSAVYY CARAMGYWGQ GTSVTVSSLG GC 232

Нуклеотидна послідовність CB3.1-8B5-LGGC (SEQ ID NO: 236):

```
gatgttgtga tgacccagac tccactcact ttgtcggtta acattggaca      50
accagcctcc atctcttgta agtcaagtca gagcctctta gatactgatg     100
gaaagacata tttgaattgg ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaac     150
cgcctaatct atctggtgtc taaactggac tctggagtcc ctgacaggtt     200
cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc agcagagtgg     250
aggctgagga tttgggaatt tattattgct ggcaaggtac acattttccg     300
ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaaggag gcggatccgg     350
aggcggaggc gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac     400
ctggaggatc catgaaactc tcttgtgaag cctctggatt cactttttagt    450
gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct ccagagaagg ggcttgagtg     500
ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca tactatgctg     550
agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt     600
gtctacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta     650
ctgtggggct ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag     700
tctcctcgct gggaggctgc                                     720
```

Амінокислотна послідовність CB3.1-8B5-LGGC (SEQ ID NO: 237)

```
DVVMTQTPLT LSVNIGQPAS ISCKSSQSLL DTDGKTYLNW LLQRPGQSPN      50
RLIYLVSKLD SGVPDRFTGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGI YYCWQGTHFP     100
LTFGAGTKLE LKGGGSGGGG EVKLEESGGG LVQPGGSMKL SCEASGFTFS     150
DAWMDWVRQS PEKGLEWVAE IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDSKSS     200
VYLQMNSLRA EDTGIYYCGA LGLDYWGQGT TLTVSSLGGC               240
```

Праймери:

Lgh628F (SEQ ID NO: 238):

ggaggcggat ccggaggcgg aggccaggtc caactgcagc agcctgg 47

Lgh629R (SEQ ID NO: 239):

tttgaattct aacaagattt gggctcaact gaggagacgg tgactgagg 49

Lgh630R (SEQ ID NO: 240):

gcctccgcct ccggatccgc ctcctttcag ctccagcttg gtccc 45

Lgh631F (SEQ ID NO: 241):

ggaggcggat ccggaggcgg aggcgaagtg aagcttgagg agtctgg 47

Lgh640R (SEQ ID NO: 242):

tttgaattct aacactctcc cctgttgaac gaggagactg tgagagtgg 49

Lgh644R (SEQ ID NO: 243):

tttgtcgtca tcatcgtctt tgtagtcgga gtggacacct gtggagag 48

Lgh646R (SEQ ID NO: 244):

tttgaattct agcagcctcc cagtgaggag acggtgactg ag 42

Lgh647F (SEQ ID NO: 245):

caaagacgat gatgacgaca aagacattca gatgacacag tctcc 45

Lgh648R (SEQ ID NO: 246):

tttgaattct agcagcctcc cagcgaggag actgtgagag tgg 43

Експресія: Конструкції 5 і 6, або 6 і 7, або 8 і 9, або 9 і 10, які кодуються експресійними плазмідами (фіг. 30), спільно переносили в клітини HEK-293 для експресії 8B5-CB3.1-DART у присутності або під час відсутності антитіла проти мітки flag з використанням ліпофектаміну 2000 (Invitrogen). Кондиціоноване середовище збирали три рази через кожні три дні. Потім кондиціоноване середовище очищали на CD32B-афінній колонці.

ELISA: ELISA-аналіз проводили в такий спосіб: 50 мкл/ямку 2 мкг/мл CD32B-Fc наносили на 96-ямковий планшет Maxisorp у карбонатному буфері і залишали на ніч при 4 °C. Планшет три рази промивали PBS-T (PBS, 0,1 % твіну 20) і блокували 0,5 % BSA у PBS-T протягом 30 хвилин при кімнатній температурі, а потім додавали тестований злитий білок одноланцюжкового Fc. Під час блокування 8B5-CB3.1-DART розводили серією дворазових розведень, починаючи з 2 мкг/мл. 25 мкл/ямку розведеного DART, змішаного з 25 мкл/ямку 50 нг/мл ch8B5, переносили з планшета для розведення в ELISA-планшет. Планшет інкубували при кімнатній температурі протягом 1 години. Після триразового промивання PBS-T, у планшет додавали 50 мкл/ямку 1:10000-розведеного ПХ-кон'югованого $F(ab')_2$-фрагмента козячого антитіла проти $F(ab')_2$-фрагмента людського IgG (Jackson ImmunoResearch). Планшет інкубували при кімнатній температурі протягом 1 години. Планшет три рази промивали PBS-T і виявляли з використанням 80 мкл/ямку субстрату TMB. Після 5-хвилинного інкубування реакцію припиняли

шляхом додавання 40 мкл/ямку 1 % H_2SO_4. OD450 нм зчитували на 96-ямковому планшет-рідері з використанням програми SOFTmax. За отриманими результатами будували графік з використанням програми GraphPadPrism 3.03 (фіг.31).

6.10. Конструювання і характеризація Ig-подібного чотиривалентного DART

Чотири поліпептидні ланцюги використовували для продукування Ig-подібних молекул DART, що мають чотиривалентні антигензв'язувальні сайти (фігура 32; фігура 33). Ig-подібні молекули DART мають унікальні властивості, а тому їх домени можуть бути сконструйовані так, щоб вони зв'язувалися з тим самим епітопом (з утворенням чотиривалентного і специфічного до одного епітопу Ig-подібного DART, здатного зв'язуватися з чотирма ідентичними молекулами антигенів) або з різними епітопами або антигенами. Так, наприклад, домени цих молекул можуть бути сконструйовані так, щоб вони зв'язувалися з двома епітопами того самого антигену (з утворенням чотиривалентного специфічного до одного антигену і специфічного до двох епітопів IgG-подібного DART), або з епітопами різних молекул антигенів (з утворенням чотиривалентного IgG-подібного DART, що має пари зв'язувальних сайтів, специфічних до першого антигену, і другу пару зв'язувальних сайтів, специфічних до другого антигену). Гібридні молекули, що мають комбінації таких ознак, можуть бути легко отримані фахівцем.

Для ілюстрації властивостей таких IgG-подібних молекул DART були отримані репрезентативні чотиривалентні IgG-подібні молекули DART, що мають пари зв'язувальних сайтів, специфічних до CD32, і другу пару зв'язувальних сайтів, специфічних до CD16A. Ці IgG-подібні молекули DART були отримані з використанням нижченаведених чотирьох поліпептидних ланцюгів.

Нуклеотидна послідовність 2.4G2-3G8-hKappa (SEQ ID NO: 247):

```
gatgtccaga tgacccagtc tccatctaat cttgctgcct ctcctggaga       50
aagtgtttcc atcaattgca aggcaagtga gagcattagc aagtatttag      100
cctggtatct acagaaacct gggaaagcaa ataagcttct tatgtacgat      150
gggtcaactt tgcaatctgg aattccatcg aggttcagtg gcagtggatc      200
tggtacagat ttcactctca ccatcagaag cctggagcct gaagattttg      250
gactctatta ctgtcaacag cattatgaat atccagccac gttcggttct      300
gggaccaagc tggagatcaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt      350
taccctgaaa gagtctggcc ctgggatatt gcagccctcc cagaccctca      400
gtctgacttg ttctttctct gggttttcac tgaggacttc tggtatgggt      450
gtaggctgga ttcgtcagcc ttcagggaag ggtctagagt ggctggcaca      500
catttggtgg gatgatgaca agcgctataa tccagccctg aagagccgac      550
tgacaatctc caaggatacc tccagcaacc aggtattcct caaaatcgcc      600
agtgtggaca ctgcagatac tgccacatac tactgtgctc aaataaaccc      650
cgcctggttt gcttactggg gccaagggac tctggtcact gtgagctcac      700
tgggaggctg cggcggaggg agccgtacgg tggctgcacc atcggtcttc      750
atcttccccc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt      800
gtgcctgctg aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg      850
tggataacgc cctccaatcg ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag      900
gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc agcaccctga cgctgagcaa      950
agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc acccatcagg     1000
gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgt           1044
```

Кодована амінокислотна послідовність 2.4G2-3G8-hKappa (SEQ ID NO: 248):

```
DVQMTQSPSN LAASPGESVS INCKASESIS KYLAWYLQKP GKANKLLMYD       50
GSTLQSGIPS RFSGSGSGTD FTLTIRSLEP EDFGLYYCQQ HYEYPATFGS      100
GTKLEIKGGG SGGGGQVTLK ESGPGILQPS QTLSLTCSFS GFSLRTSGMG      150
VGWIRQPSGK GLEWLAHIWW DDDKRYNPAL KSRLTISKDT SSNQVFLKIA      200
SVDTADTATY YCAQINPAWF AYWGQGTLVT VSSLGGCGGG SRTVAAPSVF      250
IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ      300
DSKDSTYSLS STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC       350
```

Нуклеотидна послідовність 3G8-2.4G2-hGl (SEQ ID NO: 249):

```
gacactgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca      50
gagggccacc atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg     100
atagttttat gaactggtac caacagaaac caggacagcc acccaaactc     150
ctcatctata ctacatccaa tctagaatct gggatcccag ccaggtttag     200
tgccagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat cctgtggagg     250
aggaggatac tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac     300
acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaaggaggcg gatccggagg     350
cggaggcgag gtggagctag tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg     400
gaaggtccct gaaactctcg tgtgcagcct caggattcac tttcagtgac     450
tattacatgg cctgggtccg gcaggctcca acgacgggtc tggagtgggt     500
cgcatccatt agttatgatg gtggtgacac tcactatcga gactccgtga     550
agggccgatt taccatttcc agagataatg caaaaagcag cctatacctg     600
caaatggaca gtctgaggtc tgaggacacg gccacttatt actgtgcaac     650
agagactacg ggaataccta caggtgttat ggatgcctgg ggtcaaggag     700
tttcagtcac tgtctcctca ctgggaggct gcggcggagg gagcgcctcc     750
accaagggcc catcggtctt ccccctggca ccctcctcca agagcacctc     800
tgggggcaca gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac     850
cggtgacggt gtcgtggaac tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc     900
ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc tactccctca gcagcgtggt     950
gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc tgcaacgtga    1000
atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagttga gcccaaatct    1050
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg    1100
gggaccgtca gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga    1150
tctcccggac ccctgaggtc acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa    1200
gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa    1250
tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg    1300
tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac    1350
aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaaccat    1400
ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc    1450
catcccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc    1500
aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca    1550
gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct    1600
ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag    1650
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta    1700
cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaa                     1734
```

Кодована амінокислотна послідовність 3G8-2.4G2-hGl (SEQ ID NO: 250):

```
DTVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCKASQSVD FDGDSFMNWY QQKPGQPPKL      50
LIYTTSNLES GIPARFSASG SGTDFTLNIH PVEEEDTATY YCQQSNEDPY     100
TFGGGTKLEI KGGGSGGGGE VELVESGGGL VQPGRSLKLS CAASGFTFSD     150
YYMAWVRQAP TTGLEWVASI SYDGGDTHYR DSVKGRFTIS RDNARSSLYL     200
QMDSLRSEDT ATYYCATETT GIPTGVNDAW GQGVSVTVSS LGGCGGGSAS     250
TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT     300
FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS     350
CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE     400
DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY     450
KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT KNQVSLTCLV     500
KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ     550
GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK                            578
```

Препарати IgG-подібних молекул DART, що мають вищевказані послідовності, одержували з різних плазмідних ізолятів і позначали "Ig DART 1" і "Ig DART 2". Здатність цих IgG-подібних молекул DART зв'язуватися з mCD32-hCD16A у ELISA-аналізі порівнювали у випадку використання тільки середовища, DART, що має один CD32 і один CD16A-зв'язувальний сайт

("DART"), і контрольного анти-ch-mCD32 mAb (фігура 34). Було виявлено, що Ig-подібна молекула DART відповідно до винаходу має набагато більш високу афінність зв'язування з антигеном, ніж DART або контрольне антитіло.

6.11. Конструювання і характеризація CD32B-CD79-1- і CD32B-CD79-2-біспецифічних діатіл

Гени, що кодують CD79VL-CD32BVH (послідовність 1), CD32BVL-CD79VH-1 (послідовність 2) і CD32BVL-CD79VH-2 (послідовність 3), були клоновані в експресійний вектор pEE13 з одержанням експресійних конструкцій 1, 2 і 3, відповідно. Плазміда, експресуюча конструкцію 1, була перенесена разом з експресійними плазмідами 2 або 3 у клітини HEK-293 з одержанням CD32B-CD79-1- і CD32B-CD79-2-біспецифічних діатіл, відповідно. Кондиціоноване середовище збирали три рази через кожні три дні. Потім кондиціоноване середовище очищали на CD32B-афінній колонці.

ELISA-аналіз проводили в такий спосіб: 50 мкл/ямку 2 мкг/мл CD32B-Fc наносили на 96-ямковий планшет Maxisorp у карбонатному буфері і залишали на ніч при 4 °C. Планшет три рази промивали PBS-T (PBS, 0,1 % твін 20) і блокували 0,5 % BSA у PBS-T протягом 30 хвилин при кімнатній температурі, а потім додавали тестований злитий білок одноланцюжкового Fc. Під час блокування CD32B-CD79-1- або CD32B-CD79-2-біспецифічне діатіло розводили серією дворазових розведень, починаючи з 2 мкг/мл. 25 мкл/ямку розведеного біспецифічного діатіла змішували з 25 мкл/ямку 50 нг/мл анти-CD32B антитіла і додавали в ELISA-планшет. Планшет інкубували при кімнатній температурі протягом 1 години. Після триразового промивання PBS-T, у планшет додавали 50 мкл/ямку 1:10000-розведеного ПХ-кон'югованого $F(ab')_2$-фрагмента козячого антитіла проти $F(ab')_2$-фрагмента людського IgG (Jackson ImmunoResearch). Планшет інкубували при кімнатній температурі протягом 1 години. Планшет три рази промивали PBS-T і виявляли з використанням 80 мкл/ямку субстрату TMB. Після 5-хвилинного інкубування реакцію припиняли шляхом додавання 40 мкл/ямку 1 % H_2SO_4. OD450нм зчитували на 96-ямковому планшет-рідері з використанням програми SOFTmax. За отриманими даними будували графік з використанням програми GraphPadPrism 3.03. Цей експеримент показав, що CD32B-CD79-1- і CD32B-CD79-2-біспецифічні діатіла мають здатність імуноспецифічно зв'язуватися з CD32-Fc з афінністю, еквівалентною афінності контрольного анти-CD32B антитіла. Нуклеотидні послідовності і кодовані ними амінокислотні послідовності вищеописаних конструкцій представлені нижче.

Послідовність 1 – нуклеотидна послідовність

CD79VL-CD32BVH (SEQ ID NO: 251):

```
gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca      50
gccggcctcc atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg     100
gaaagacata tttgaattgg tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac     150
cgcctaattt atctggtgtc taaactggac tctggggtcc cagacagatt     200
cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc agcagggtgg     250
aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg     300
ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg     350
aggcggaggc gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac     400
ctggaggatc catgaaactc tcttgtgaag cctctggatt cacttttagt     450
gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct ccagagaagg ggcttgagtg     500
ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca tactatgctg     550
agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt     600
gtctacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta     650
ctgtggggct ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag     700
tctcctcgct gggaggctgc                                     720
```

Послідовність 2 – амінокислотна послідовність

CD79VL-CD32BVH (SEQ ID NO: 252):

```
DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW FQQRPGQSPN      50
RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP     100
LTFGGGTKLE IKGGGSGGGG EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS     150
DAWMDWVRQA PGKGLEWVAE IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDAKNS     200
LYLQMNSLRA EDTAVYYCGA LGLDYWGQGT LVTVSSLGGC               240
```

Послідовність 3 – нуклеотидна послідовність

CD32BVL-CD79VH-1 (SEQ ID NO: 253):

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga      50
tagagtcacc atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa     100
gctggctgca gcagaaacca ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc     150
gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc aggttcagtg gcagtgagtc     200
tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct gaagattttg     250
caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg     300
gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt     350
tcagctggtg cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga     400
aggtctcctg caaggcttct ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac     450
tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt gagtggatcg gaatgattga     500
tccttcagac agtgaaactc actacaatca aatgttcaag gacagagtca     550
ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc     600
ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta     650
ctgggggcaa gggaccacgg tcaccgtctc ctcactggga ggctgc         696
```

Послідовність 4 – амінокислотна послідовність
CD32BVL-CD79VH-1 (SEQ ID NO: 254):

```
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQEIS GYLSWLQQKP GKAPRRLIYA      50
ASTLDSGVPS RFSGSESGTE FTLTISSLQP EDFATYYCLQ YFSYPLTFGG     100
GTKVEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYTFTSYWMN     150
WVRQAPGQGL EWIGMIDPSD SETHYNQMFK DRVTMTTDTS TSTAYMELRS     200
LRSDDTAVYY CARAMGYWGQ GTTVTVSSLG GC                        232
```

Послідовність 5 – нуклеотидна послідовність
CD32BVL-CD79VH-2 (SEQ ID NO: 255):

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga      50
tagagtcacc atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa     100
gctggctgca gcagaaacca ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc     150
gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc aggttcagtg gcagtgagtc     200
tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct gaagattttg     250
caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg     300
gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt     350
tcagctggtg cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga     400
aggtctcctg caaggcttct ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac     450
tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt gagtggatcg gaatgattga     500
tccttcagac agtgaaacte actacaatca aaagttcaag gacagagtca     550
ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc     600
ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta     650
ctgggggcaa gggaccacgg tcaccgtctc ctcactggga ggctgc         696
```

Послідовність 6 – амінокислотна послідовність
CD32BVL-CD79VH-2 (SEQ ID NO: 256):

```
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQEIS GYLSWLQQKP GKAPRRLIYA      50
ASTLDSGVPS RFSGSESGTE FTLTISSLQP EDFATYYCLQ YFSYPLTFGG     100
GTKVEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYTFTSYWMN     150
WVRQAPGQGL EWIGMIDPSD SETHYNQKFK DRVTMTTDTS TSTAYMELRS     200
LRSDDTAVYY CARAMGYWGQ GTTVTVSSLG GC                        232
```

6.12. Конструювання й оптимізація біофункціональних діатіл H8B5-HBCRC

Діатіло конструювали так, щоб воно містило варіабельні ділянки, здатні зв'язуватися з CD32 і комплексом B-клітинного рецептора ("BCRC").

Клонування. За допомогою стандартної ПЛР/ПЛР із перекриванням були отримані наступні конструкції:

h8B5VL-G3SG4-hBCRCVH M48I-LGGC:

Повністю гуманізовану VL 8B5 (яка розпізнає CD32) ампліфікували з використанням Igh321F і Igh788R як праймерів. hBCRCVH M48I ампліфікували з використанням Igh784F і Igh386R як праймерів. ПЛР-продукти очищали на гелі, змішували разом і ампліфікували з використанням Igh321F і Igh386R. Потім фрагмент, отриманий у ПЛР із перекриванням, клонували в pEE6 у XbaI-EcoRI-сайт. "G3SG4" являє собою лінкер, що має послідовність: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10);

hBCRCVL R45N-G3SG4-h8B5VH-LGGC

hBCRCVL R45N ампліфікували з використанням Igh321F і Igh785R як праймерів. h8B5VH ампліфікували з використанням Igh787F і Igh786R як праймерів. ПЛР-продукти очищали на гелі, змішували разом і ампліфікували з використанням Igh321F і Igh786R. Потім фрагмент, отриманий у ПЛР із перекриванням, клонували в pEE13 у XbaI-EcoRI-сайт.

Конструювання одного вектора. pEE6hHBCRCVL R45N-h8B5VH гідролізували в BgI II-Sal I-сайтах, і 3,3 т. п.н.-фрагмент очищали і вбудовували в pEE13 hHBCRCVL 45N-h8B5VH у BamHI-

SalI-сайтах. BglII- і BamHI-сайти мають сумісні "липкі" кінці. Послідовності DART і праймерів, використовуваних для конструювання DART, описані нижче:

Нуклеотидна послідовність hHBCRCVL. R45N-h8B5VH-LGGC (SEQ ID NO: 257):

```
gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca      50
gccggcctcc atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg     100
gaaagacata tttgaattgg tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac     150
cgcctaattt atctggtgtc taaactggac tctggggtcc cagacagatt     200
cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc agcagggtgg     250
aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg     300
ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg     350
aggcggaggc gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac     400
ctggaggatc catgaaactc tcttgtgaag cctctggatt cacttttagt     450
gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct ccagagaagg ggcttgagtg     500
ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca tactatgctg     550
agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt     600
gtctacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta     650
ctgtggggct ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag     700
tctcctcgct gggaggctgc                                     720
```

Амінокислотна послідовність hHBCRCVL. R45N-h8B5VH LGGC (SEQ ID NO: 258):

```
DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW FQQRPGQSPN      50
RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP     100
LTFGGGTKLE IKGGGSGGGG EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS     150
DAWMDWVRQA PGKGLEWVAE IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDAKNS     200
LYLQMNSLRA EDTAVYYCGA LGLDYWGQGT LVTVSSLGGC               240
```

Нуклеотидна послідовність H8B5VL-hHBCRCVH M48I-LGGC (SEQ ID NO: 259):

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga      50
tagagtcacc atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa     100
gctggctgca gcagaaacca ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc     150
gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc aggttcagtg gcagtgagtc     200
tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct gaagattttg     250
caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg     300
gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt     350
tcagctggtg cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga     400
aggtctcctg caaggcttct ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac     450
tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt gagtggatcg gaatgattga     500
tccttcagac agtgaaactc actacaatca aatgttcaag gacagagtca     550
ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc     600
ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta     650
ctgggggcaa gggaccacgg tcaccgtctc ctcactggga ggctgc         696
```

Амінокислотна послідовність H8B5VL-HBCRCVH M48I-LGGC (SEQ ID NO: 260):

```
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQEIS GYLSWLQQKP GKAPRRLIYA      50
ASTLDSGVPS RFSGSESGTE FTLTISSLQP EDFATYYCLQ YFSYPLTFGG     100
GTKVEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYTFTSYWMN     150
WVRQAPGQGL EWIGMIDPSD SETHYNQMFK DRVTMTTDTS TSTAYMELRS     200
LRSDDTAVYY CARAMGYWGQ GTTVTVSSLG GC                        232
```

Праймери:

Праймер Lgh321F (SEQ ID NO: 261):

cgagctagct ctagatgaga tcacagttct ctctac 36

Праймер Lgh386R (SEQ ID NO: 262):
tttgaattct agcagcctcc cagtgaggag acggtgaccg tggtc 45
Праймер Lgh784F (SEQ ID NO: 263):
ggcggatccg gaggcggagg ccaggttcag ctggtgcag 39
Праймер Lgh785R (SEQ ID NO: 264):
cctccggatc cgcctccttt gatctcaagc ttggtccc 38
Праймер Lgh786R (SEQ ID NO: 265):
tttgaattct agcagcctcc caggctggag acggtcacca gg 42
Праймер Lgh787F (SEQ ID NO: 266):
ggaggcggat ccggaggcgg aggcgaagtg cagcttgtgg agtc 44

Експресійну плазміду Hu3G8VL 1-G3SG4-Hu2B6VH 4-LGGC переносили разом з Hu2B6VL 5-G3SG4-Hu3G8VH 5-LGGC у клітини HEK-293 з одержанням біспецифічного діатіла Hu2B6 4.5-Hu3G8 5.1, що розпізнає CD32 і CD79. Одночасно з цим, Hu2B6VL 5-G3SG4-Hu2B6VH 4-LGGC і Hu3G8VL 1-G3SG4-Hu3G8VH 5-LGGC окремо переносили в клітини HEK-293 з одержанням діатіла Hu2B6 4.5 і Hu3G8 5.1. Після культивування протягом трьох днів, кондиціоноване середовище збирали й охарактеризовували за допомогою ELISA на зв'язування. Результат цього експерименту представлений на фігурі 36.

Протокол експерименту: 100 нг/ямку розчинного FcRIIb-G2-Agly наносили на 96-ямковий планшет Maxisorp у карбонатному буфері і залишали на ніч при 40 °C. Планшет три рази промивали PBS/0,1 % твін 20, а потім блокували 0,5 % BSA у PBS/0,1 % твін 20 протягом 30 хвилин при кімнатній температурі з наступним додаванням діатіл. У кожну ямку додавали серію дворазових розведень кондиціонованого середовища біспецифічного діатіла Hu2B6 4.5-Hu3G8 5.1, діатіла Hu2B6 4.5 і діатіла hu3G8 5.1, починаючи з 25 нг/ямку. Планшет інкубували при кімнатній температурі протягом 1 години. Після триразового промивання PBS/0,1 % твін 20, у планшет додавали 10 нг/ямку FcRIIIa-G2-біотину. Планшет інкубували при кімнатній температурі протягом 1 години. Після триразового промивання PBS/0,1 % твін 20, 50 мкл 1:5000-розведення ПХ-кон'югованого стрептавідину (Amersham Pharmacia Biotech) використовували для детектування. Після 45-хвилинного інкубування при кімнатній температурі, планшет три рази промивали PBS/0,1 % твін 20 і виявляли з використанням субстрату TMB. Після 10-хвилинного інкубування реакцію припиняли шляхом додавання 1 % H_2SO_4. OD450 нм зчитували з використанням програми SOFTmax. За отриманими результатами будували графік з використанням програми GraphPadPrism 3.03.

6.13. Конструювання діатіл Ig-DART

Були сконструйовані діатіла Ig-DART, які містили варіабельні ділянки, здатні зв'язуватися з CD32 і з комплексом B-клітинного рецептора ("BCRC"). Перше діатіло містило лінкер LGGCGGGS (SEQ ID NO: 267), розташований між послідовностями VH і послідовностями Fc даної молекули. "Друге" діатіло містило або лінкер LEIK, що має послідовність LEIK (SEQ ID NO: 268), або лінкер, що має послідовність TVSS (SEQ ID NO: 269). Послідовності ланцюгів цих діатіл і кодуючих їх полінуклеотидів представлені нижче.

H8B5VL-hBCRCVH M48I, M62K LGGCG3S_hKappa (SEQ ID NO: 270):

```
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQEIS GYLSWLQQKP GKAPRRLIYA       50
ASTLDSGVPS RFSGSESGTE FTLTISSLQP EDFATYYCLQ YFSYPLTFGG      100
GTKVEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYTFTSYWMN      150
WVRQAPGQGL EWIGMIDPSD SETHYNQKFK DRVTMTTDTS TSTAYMELRS      200
LRSDDTAVYY CARAMGYWGQ GTTVTVSSLG GCGGGSRTVA APSVFIFPPS      250
DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS      300
TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC             343
```

Послідовності H8B5VL приєднували до послідовностей hBCRCVH за допомогою лінкеру GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10), розташованого в положеннях 108-115. Послідовності hBCRCVH приєднували до послідовностей Fc за допомогою лінкеру LGGCGGGS (SEQ ID NO: 267), розташованого в положеннях 229-236 (обидва ці лінкери підкреслені, як показано вище). Полінуклеотид, що кодує H8B5VL-hBCRCVH M48I, M62K_LGGCG3S_hKappa, має послідовність:

(SEQ ID NO: 271):

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga        50
tagagtcacc atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa       100
gctggctgca gcagaaacca ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc       150
gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc aggttcagtg gcagtgagtc       200
tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct gaagattttg       250
caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg       300
gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt       350
tcagctggtg cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga       400
aggtctcctg caaggcttct ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac       450
tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt gagtggatcg gaatgattga       500
tccttcagac agtgaaactc actacaatca aaagttcaag gacagagtca       550
ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc       600
ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta       650
ctgggggcaa gggaccacgg tcaccgtctc ctcactggga ggctgcggcg       700
gagggagccg aactgtggct gcaccatcgg tcttcatctt cccgccatct       750
gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa       800
cttctatccc agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc       850
aatcgggtaa ctcccaggag agtgtcacag agcaggacag caaggacagc       900
acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg agcaaagcag actacgagaa      1000
acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg agctcgcccg      1050
tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt ag                        1082
```

,

де послідовності, які кодують лінкери GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10) і LGGCGGGS (SEQ ID NO: 267), знаходяться в положеннях 322-345 і 685-708, відповідно (обидві ці послідовності підкреслені, як показано вище).

HBCRCVL R45N-h8B5VH LGGCGGGS-hGl (SEQ ID NO: 272):

```
DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW FQQRPGQSPN        50
RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP       100
LTFGGGTKLE IKGGGSGGGG EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS       150
DAWMDWVRQA PGKGLEWVAE IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDAKNS       200
LYLQMNSLRA EDTAVYYCGA LGLDYWGQGT LVTVSSLGGC GGGSASTKGP       250
SVFPLAPSSK STSGGTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV       300
LQSSGLYSLS SVVTVPSSSL GTQTYICNVN HKPSNTKVDK RVEPKSCDKT       350
HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV       400
KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV       450
SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV SLTCLVKGFY       500
PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF       550
SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK                                   574
```

Послідовності hBCRCVL приєднували до послідовностей H8B5VH за допомогою лінкеру GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10), розташованого в положеннях 113-120. Послідовності H8B5VH приєднували до послідовностей Fc за допомогою лінкеру LGGCGGGS (SEQ ID NO: 267), розташованого в положеннях 237-244 (обидва ці лінкери підкреслені, як показано вище). Полінуклеотид, що кодує HBCRCVL R45N-h8B5VH_LGGCGGGS-h1, має послідовність:

(SEQ ID NO: 273):

```
gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca        50
gccggcctcc atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg       100
gaaagacata tttgaattgg tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac       150
cgcctaattt atctggtgtc taaactggac tctggggtcc cagacagatt       200
cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc agcagggtgg       250
aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg       300
ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg       350
aggcggaggc gaagtgcagc ttgtggagtc tggaggaggc ttggtgcaac       400
ctggaggatc cctgagactc tcttgtgccg cctctggatt cacttttagt       450
gacgcctgga tggactgggt ccgtcaggcc ccaggcaagg ggcttgagtg       500
ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca tactatgctg       550
agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgacgc caaaaacagt       600
ctgtacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg ccgtgtatta       650
ctgtggggct ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc ctggtgaccg       700
tctccagcct gggaggctgc ggcggaggga gcgcctccac caagggccca       750
tcggtcttcc ccctggcacc ctcctccaag agcacctctg ggggcacagc       800
ggccctgggc tgcctggtca aggactactt ccccgaaccg gtgacggtgt       850
cgtggaactc aggcgccctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc       900
ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc       950
cagcagcttg ggcacccaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca      1000
gcaacaccaa ggtggacaag agagttgagc ccaaatcttg tgacaaaact      1050
cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa ctcctggggg gaccgtcagt      1100
cttcctcttc cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc      1150
ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc      1200
aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa      1250
gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca      1300
ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc      1350
tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa      1400
agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg      1450
agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtcaa aggcttctat      1500
cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa      1550
ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct      1600
acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc      1650
tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag      1700
cctctccctg tctccgggta aa                                   1722
```

,

де послідовності, які кодують лінкери GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10) і LGGCGGGS (SEQ ID NO: 267), знаходяться в положеннях 327-360 і 709-732, відповідно (обидві ці послідовності підкреслені, як показано вище).

H8B5VL-HBCRCVH M48I, M62K_(-4)LEIK_hKappa (SEQ ID NO: 274):

```
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQEIS GYLSWLQQKP GKAPRRLIYA        50
ASTLDSGVPS RFSGSESGTE FTLTISSLQP EDFATYYCLQ YFSYPLTFGG       100
GTKVEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYTFTSYWMN       150
WVRQAPGQGL EWIGMIDPSD SETHYNQKFK DRVTMTTDTS TSTAYMELRS       200
LRSDDTAVYY CARAMGYWGQ GTTVLEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT       250
ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSTL       300
TLSKADYEKH KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC                      335
```

.

Послідовності H8B5VL приєднували до послідовностей HBCRCVH за допомогою лінкеру GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10), розташованого в положеннях 108-115. Послідовності HBCRCVH приєднували до послідовностей Fc за допомогою лінкеру LEIK (SEQ ID NO: 268), розташованого в положеннях 225-228 (обидва ці лінкери підкреслені, як показано вище). Полінуклеотид, що кодує H8B5VL-HBCRCVH M48I, M62K_(-4)LEIK_hKappa, має послідовність:

(SEQ ID NO: 275):

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga        50
tagagtcacc atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa       100
gctggctgca gcagaaacca ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc       150
gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc aggttcagtg gcagtgagtc       200
tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct gaagattttg       250
caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg       300
gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt       350
tcagctggtg cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga       400
aggtctcctg caaggcttct ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac       450
tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt gagtggatcg gaatgattga       500
tccttcagac agtgaaactc actacaatca aaagttcaag gacagagtca       550
ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc       600
ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta       650
ctgggggcaa gggaccacgg tcctggagat caagcgaact gtggctgcac       700
catcggtctt catcttcccg ccatctgatg agcagttgaa atctggaact       750
gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc tatcccagag aggccaaagt       800
acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc caggagagtg       850
tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg       900
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt       950
cacccatcag ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag      1000
agtgt                                                       1005
```

,

де послідовності, які кодують лінкери GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10) і LEIK (SEQ ID NO: 268), знаходяться в положеннях 322-345 і 673-684, відповідно (обидві ці послідовності підкреслені, як показано вище).

HBCRCVL R45N-h8B5VH_(-4)TVSS-hGI=HBCRCVL R45N-h8B5VH – hG1 (SEQ ID NO: 276):

```
DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW FQQRPGQSPN        50
RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP       100
LTFGGGTKLE IKGGGSGGGG EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS       150
DAWMDWVRQA PGKGLEWVAE IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDAKNS       200
LYLQMNSLRA EDTAVYYCGA LGLDYWGQGT LVTVSSASTK GPSVFPLAPS       250
SKSTSGGTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS       300
LSSVVTVPSS SLGTQTYICN VNHKPSNTKV DKRVEPKSCD KTHTCPPCPA       350
PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG       400
VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP       450
IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW       500
ESNGQPENNY KTTPPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA       550
LHNHYTQKSL SLSPGK                                            566
```

.

Послідовності HBCRCVL приєднували до послідовностей h8B5VH за допомогою лінкеру GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10), розташованого в положеннях 113-120. Послідовності H8B5VH приєднували до послідовностей Fc за допомогою лінкеру TVSS (SEQ ID NO: 269), розташованого в положеннях 233-236 (обидва ці лінкери підкреслені, як показано вище). Полінуклеотид, що кодує HBCRCVL R45N-h8B5VH_(-4)TVSS-h1, має послідовність:

(SEQ ID NO: 277):

```
gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca       50
gccggcctcc atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg      100
gaaagacata tttgaattgg tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac      150
cgcctaattt atctggtgtc taaactggac tctggggtcc cagacagatt      200
cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc agcagggtgg      250
aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg      300
ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg      350
aggcggaggc gaagtgcagc ttgtggagtc tggaggaggc ttggtgcaac      400
ctggaggatc cctgagactc tcttgtgccg cctctggatt cacttttagt      450
gacgcctgga tggactgggt ccgtcaggcc ccaggcaagg ggcttgagtg      500
ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca tactatgctg      550
agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgacgc caaaaacagt      600
ctgtacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg ccgtgtatta      650
ctgtggggct ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc ctggtgaccg      700
tctccagcgc ctccaccaag ggcccatcgg tcttcccccc ggcaccctcc      750
tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tggtcaagga      800
ctacttcccc gaaccggtga cggtgtcgtg gaactcaggc gccctgacca      850
gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc      900
ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta      950
catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagagag     1000
ttgagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca     1050
cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc ctcttccccc caaaacccaa    1100
ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc gtggtggtgg     1150
acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc     1200
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag     1250
cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga     1300
atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc     1350
atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt     1400
gtacaccctg cccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc     1450
tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg     1500
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct     1550
ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga     1600
gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct     1650
ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaa       1698
```

,

де послідовності, які кодують лінкери GGGSGGGG (SEQ ID NO: 10) і TVSS (SEQ ID NO: 269), знаходяться в положеннях і 337-360 і 697-708, відповідно (обидві ці послідовності підкреслені, як показано вище).

6.14. Оптимізація лінкерів

Як обговорювалося вище, діатіла IgDART відповідно до винаходу переважно містять лінкери, розташовані між послідовностями VH і послідовностями Fc даної молекули. Експерименти проводили з метою оптимізації лінкерів для досягнення максимального виходу і максимальної активності. Були використані нижченаведені лінкери.

SEQ ID NO	Лінкер
278	FNRGECGGGS
279	FNRGECLQVYYRM
280	LEGEEG
281	LEGEEGC
282	LEIK
283	LGEEG
284	LGEEGC
285	LGGCGGGS
286	LGKKG
287	LGKKGC
288	LKGKKG
289	LKGKKGC
290	LQVYYRM
291	LQVYYRMC
292	TVSS
293	VEPKSCGGGS
294	VEPKSCYLYLRARV
295	VQVHYRM
296	VQVHYRMC
297	YLYLRARV
298	YLYLRARVC

Вищевказані лінкери вбудовували в плазміди для одержання набору діатіл IgDART, що містять різні комбінації лінкерів:

Плазміда pMGX,	Лінкер для ланцюга A, SEQ ID NO	pEE13.4	Лінкер для ланцюга B, SEQ ID NO	pEE6.4	ELISA (мкг/мл)	Очищений білок (після EX) (1 літр)
900	285	√	285	√	0.799	0.3 мг
901	283	√	286	√	0.628	0.4 мг
902	284	√	287	√	0.896	0.47 мг
903	280	√	288	√	0.557	
904	281	√	289	√	0.450	0.4 мг
905	293	√	278	√	0.360	
906	294	√	279	√	N/A	
907	282	√	292	√	N/A	
908	297	√	295	√	0.428	0.2 мг
909	297	√	290	√	0.305	0.3 мг
910	298	√	296	√	N/A	
911	298	√	291	√	0.218	

Була визначена здатність продукованих IgDART до агрегації.

Лінкери Ig-DART	Загальний білок (мг)	Олігомер %	Мономер %	Фрагмент %	Ранг SB
900A/900B	0.51	12	45	43	4
901A/901B	0.72	5	83	12	1
902A/902B	0.78	21	48	31	4
903A/903B	0.5	3	84	13	1
904A/904B	0.66	16	65	26	4
905A/905B	0.5	20	60	20	3
908A/908B	0.5	13	65	17	2
908A/909B	0.38	22	50	28	3
910A/911B	0.2	45	10	45	5

Отримані дані несподівано показали, що конструкції, які мають лінкери, такі як конструкції, використовувані в 901A/901B, 903A/903B і 908A/908B, давали набагато кращі результати (менший ступінь олігомеризації і/або знижений рівень продукування фрагментів), ніж конструкції, що мають лінкери, такі як 910A/911B.

6.15. E-спіральні/K-спіральні DART

З усього вищесказаного очевидно, що окремі поліпептиди біспецифічного DART можуть утворювати дві молекули гомодимерів і одну молекулу гетеродимера. В одному з варіантів даного винаходу, заряджений поліпептид може бути приєднаний до С-кінця одного або, більш переважно, обох поліпептидів DART. Що стосується вибору поліпептидів із протилежними зарядами для окремих поліпептидів біспецифічного DART, то в даному випадку слід зазначити, що включення таких заряджених поліпептидів буде сприяти утворенню гетеродимерів і знижувати ступінь утворення гомодимерів. Переважно, щоб позитивно заряджений поліпептид містив в основному аргінін, глутамін, гістидин і/або лізин (або суміші таких амінокислот), а негативно заряджений поліпептид містив в основному аспартат або глутамат (або суміш таких амінокислот). Особливо переважними є позитивно заряджені поліпептиди, що містять велику кількість лізинових залишків, і негативно заряджені поліпептиди, що містять велику кількість глутаматних залишків. Для максимізації електростатичних взаємодій між такими протилежно зарядженими поліпептидами, переважно використовувати поліпептиди, здатні до спонтанного утворення спіральної конформації.

Таким чином, у переважному варіанті винаходу, позитивно заряджена "E-спіраль" може бути приєднана до одного з поліпептидів, використовуваних для утворення біспецифічного DART, а негативно заряджена "K-спіраль" може бути приєднана до іншого поліпептиду DART (фігура 37).

Особливо переважна E-спіраль має послідовність: $(EVAALEK)_4$:

SEQ ID NO: 299 EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK

Особливо переважна K-спіраль має послідовність: $(KVAALKE)_4$:

SEQ ID NO: 300 KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE

Переважний поліпептид DART, що містить таку E-спіраль, має загальну послідовність: [VL-домен]-[GGGSGGGG]-[VH-домен]-$[(EVAALEK)_4]$-GGGNS, де VL являє собою домен варіабельної ділянки легкого ланцюга Ig DART; GGGSGGGG являє собою SEQ ID NO: 10, VH являє собою домен варіабельної ділянки важкого ланцюга Ig DART; $(EVAALEK)_4$ являє собою SEQ ID NO: 299, а GGGNS представляє собою SEQ ID NO: 301. Переважний поліпептид DART, що містить таку K-спіраль, має загальну послідовність: [VL-домен]- [GGGSGGGG]-[VH-домен]-$[(KVAALKE)_4]$-GGGNS, де VL являє собою домен варіабельної ділянки легкого ланцюга Ig DART, GGGSGGGG являє собою SEQ ID NO: 10, VH являє собою домен варіабельної ділянки важкого ланцюга Ig DART; $(KVAALKE)_4$ являє собою SEQ ID NO: 300, а GGGNS представляє собою SEQ ID NO: 301.

6.15. E-спіральні/K-спіральні DART, що містять Fc

В іншому варіанті винаходу Fc-ділянки можуть бути приєднані до E- і/або K-спіралей E-спіральних або K-спіральних DART.

Додаткове розділення Fc-ділянок і VH-доменів Fc-вмісного DART може виявитися бажаним у тому випадку, коли структура таких доменів з меншим ступенем розділення приводить до зниження рівня взаємодії між вказаними доменами і зв'язуються з ними лігандами або як-небудь інакше перешкоджає збиранню DART. Хоча можуть бути використані роздільники, що складаються з будь-яких амінокислотних послідовностей, однак, переважно використовувати роздільники, що утворюють α-спіральні структури, так, щоб вони були максимально протяжними

і виносили Fc-домен далеко від варіабельних доменів (фігура 37). Оскільки вищеописані спіральні поліпептиди з протилежними зарядами мають додаткову функцію, яка полягає в стимуляції утворення гетеродимера, то такі молекули є особливо переважними роздільниками. Такі спіраль-вмісні молекули Fc-DART мають сприятливі властивості, аналогічними властивостям Fc-DART, включаючи збільшений час напівжиття в сироватці і таку ефекторну функцію, як рекрутинг. Вищеописані E-спіральні і K-спіральні поліпептиди є особливо переважними для цієї мети.

Таким чином, у переважному варіанті винаходу, E-спіральний Fc-вмісний DART має загальну послідовність: [VL-домен]-[GGGSGGGG]-[VH-домен]-[(EVAALEK)$_4$]-GGG-Fc-домен, що починається з D234 (по нумерації Кебата), де VL являє собою домен варіабельної ділянки легкого ланцюга Ig DART; GGGSGGGG являє собою SEQ ID NO: 10, VH являє собою домен варіабельної ділянки важкого ланцюга Ig DART, а (EVAALEK)$_4$ являє собою SEQ ID NO: 299.

Аналогічним чином, у переважному варіанті винаходу, K-спіральний Fc-вмісний DART має загальну послідовність: [VL-домен]-[GGGSGGGG]-[VH-домен]-[(KVAALK)$_4$]-GGG-Fc-домен, що починається з D234 (по нумерації Кебата), де VL являє собою домен варіабельної ділянки легкого ланцюга Ig DART; GGGSGGGG являє собою SEQ ID NO: 10, VH являє собою домен варіабельної ділянки важкого ланцюга Ig DART, а (KVAALKE)$_4$ являє собою SEQ ID NO: 300.

Як вказано вище, спіраль-вмісна молекула DART або спіральна Fc-вмісна молекула DART може включати тільки один такий спіральний роздільник, або він може включати більше ніж один такий роздільник (наприклад, два роздільники, що мають, переважно, протилежні заряди, і один із яких зв'язаний з кожним VH-доменом поліпептидів DART). Завдяки зв'язуванню Fc-ділянки з такою(ими) молекулою(ами)-роздільником(ами), здатність до утворення двовалентних, чотиривалентних і т. п. варіантів молекул Fc-DART може бути посилена за допомогою перестановки ланцюга (фігура 39). Як показано на фігурі 39, можуть бути продуковані молекули Fc-DART, що утворюють мономери або димери залежно від того, чи зв'язується Fc-домен з одним або обома VH-доменами DART.

6.17. Функціональна активність E-спіральних/K-спіральних Fc-вмісних DART

E-спіральні і/або K-спіральні молекули Fc-DART були отримані з біспецифічних молекул DART, що мають: (1) варіабельні ділянки легкого і важкого ланцюгів антитіла, що реагує з CD79b (з комплексом BCR), CB3, і (2) варіабельні ділянки легкого і важкого ланцюгів низькоафінного варіанта (який позначається варіантом "YA") антитіла, що реагує з CD32B, 2B6. Ця варіабельна ділянка легкого ланцюга вказаного антитіла відрізняється від варіабельної ділянки легкого ланцюга антитіла 2B6, тим, що в ній є мутації: N50Y і V51A. Таким чином, антитіло YA2B6 має нижченаведену послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга:

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRTSQSIGTNIHWYQQKPDQSPKLLIKYASE
SISGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQSNTWPFTFGGGTKVEI
K (SEQ ID NO: 302).

Послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга вказаного антитіла являє собою:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWIHWVRQAPGQGLEWMGVIDP
SDTYPNYNKKFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARNGDSDYYS
GMDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 303).

Низькоафінне антитіло було вибране тому, що воно переважно зв'язується з CD32B in cis на клітинах, експресуючих CD79b (B-клітинах). Така конфігурація сама по собі знижує ступінь взаємодії з іншими CD32B-експресуючими клітинами (моноцитами, ендотеліальними клітинами, клітинами печінки), а також ступінь небажаної транс-взаємодії.

Були отримані E-спіральні і/або K-спіральні похідні і E-спіральні і/або K-спіральні Fc-вмісні похідні таких h2B6YAhCB3 DART. Для приблизної оцінки розміру і гетерогенності продукованих молекул була проведена ексклюзійна хроматографія. Як показано на фігурі 40, димери були отримані з E-спіральних/K-спіральних DART, що мають одну зв'язану Fc-ділянку, приєднану до K-спірального домену, а також до E-спірального/K-спіральних DART, які мають одну зв'язану Fc-ділянку, приєднану до E-спірального домену. Бажані мономерні, а також димерні молекули були виділені з препаратів, у яких Fc-ділянки були приєднані до обох E- і K-спіралей однієї і тієї ж молекули DART, де більшість із усіх продуктів, що утворюються, складав мономер. На фігурі 41 показана можлива структура продукованих димерних молекул.

Фракції, проаналізовані за допомогою ексклюзійної хроматографії, додатково аналізували за допомогою електрофорезу в поліакриламідном гелі з ДСН для більш точної оцінки структур отриманих молекул (фігура 42). E-спіральні/K-спіральні похідні DART (без Fc-ділянки) мігрували як дві переважні смуги, кожна з який мала розмір приблизно 28 кД (відповідні KFc-вмісному поліпептиду і дещо меншому EFc-вмісному поліпептиду), і як менш явно виражена смуга розміром приблизно 49 кД (відповідна E-спіральному/K-спіральному DART). Мономерні фракції

E-спіральних/K-спіральних Fc-вмісних похідних DART (EFc/K або E/KFc), проаналізовані за допомогою ексклюзійної хроматографії, виявляли тільки одну смугу, з більшою або з меншою молекулярною масою приблизно в 28 кД (відповідну або KFc-вмісному DART (смуга з більшою молекулярною масою), або EFc-вмісному DART (смуга з меншою молекулярною масою)). Продукт переважно мігрував при масі приблизно 49 кД (відповідний E-спіральному/K-спіральному DART). Спостерігалися також смуги зі значно більш високими молекулярними масами.

Був проведений ELISA-аналіз на біспецифічне зв'язування для характеризації продукованих молекул. CD79 наносили на ELISA-планшет. У результаті цього, DART зв'язувалися з планшетом. Зв'язування DART детектували з використанням sCD32B-біотину, а потім інкубували зі стрептавідином-ПХ. Як показано на фігурі 43, E-спіральні/K-спіральні Fc-вмісні похідні DART h2B6YAhCB3 (EFc/K або E/KFc) виявляли значне підвищення рівня зв'язування в порівнянні з DART h2B6YAhCB3, або в порівнянні з EFc/KFc-похідним DART h2B6YAhCB3.

Перехресне зв'язування антитіл, що зв'язуються з CD79b, приводило до активації B-клітин (Van Kooten, C. et al. (1997) "Cross-Linking Of Antigen Receptor Via Ig-B (B29, CD79b) Can Induce Both Positive And Negative Signals In CD40-Activated Human B Cells, » Clin. Exp. Immunol. 110:509-515). Оскільки молекули DART h2B6YAhCB3 мають здатність зв'язуватися з CD79b- і CD32B-інгібуючим рецептором, то вони мають здатність здійснювати "рекрутинг" CD32B у сайти зв'язування в CD79b, і тим самим блокувати проліферацію B-клітин. Для ілюстрації такої здатності, DART інкубували з B-клітинами, що обробляли антитілами, здатними перехресно зв'язуватися зі зв'язаними анти-CD79b антитілами. Результати цього експерименту представлені на фігурі 44. Ці результати показали, що антитіла, спрямовані тільки проти CD79b або CD32B (Ch2B6N297Q і ChCB3.1N297Q, відповідно), не мали здатність інгібувати проліферацію B-клітин. Похідні EFc/KFc h2B6YA×hCB3 DART були, в основному, більш ефективними відносно інгібування проліферації B-клітин, у порівнянні із самим h2B6YA×hCB3 DART і контрольним h2B6YA×hCB3 VF. Було виявлено, що E-спіральні/K-спіральні DART, що мають тільки одну зв'язану Fc-ділянку (E/KFc h2B6YA×hCB3-похідні DART і EFc/K h2B6YA×hCB3-похідні DART), чинять найбільшу інгібуючу дію на проліферацію B-клітин.

6.18. Модифікації DART, що вводяться з метою зміни часу напівжиття в сироватці in vivo

Як обговорювалося вище, невеликі рекомбінантні молекули антитіла, такі як біспецифічні одноланцюжкові молекули (наприклад, що мають молекулярну масу приблизно 55 кДа), швидко виводяться з кровотоку. Фармакокінетичні дослідження молекул DART у мишей in vivo показали, як і очікувалося, короткий час напівжиття, що становить приблизно 2 години.

У деяких варіантах винаходу, які стосуються, наприклад, лікування гострого запального стану, такий короткий час напівжиття є бажаним, однак, в інших варіантах винаходу, які стосуються, наприклад, лікування раку і хронічних захворювань і станів, переважно, щоб молекули DART відповідно до винаходу мали більш тривалий час напівжиття.

Для поліпшення фармакокінетичних властивостей молекул DART in vivo, використовуваних у цих цілях, ці молекули DART можуть бути модифіковані так, щоб вони містили поліпептидну частину білка, що зв'язується із сироваткою, біля одного або більше кінців молекули DART. Найбільше переважно, щоб така поліпептидна частина білка, що зв'язується із сироваткою, була приєднана біля C-кінця молекули DART. Особливо переважною поліпептидною частиною білка, що зв'язується із сироваткою, використовуваного в цих цілях, є альбумін-зв'язувальний домен (ABD), який походить від стрептококового G-білка. Особливо переважним є альбумін-зв'язувальний домен 3 (ABD3) G-білка стрептококового штаму G148.

Альбумін-зв'язувальний домен 3 (ABD3) G-білка стрептококового штаму G148 складається з 46 амінокислотних залишків, що утворюють стабільний триспіральний пучок і мають широку специфічність зв'язування з альбуміном (Johansson, M.U. et al. (2002) "Structure, Specificity, And Mode Of Interaction For Bacterial Albumin-Binding Modules" J. Biol. Chem. 277(10):8114-8120). Альбумін є найбільш поширеним білком у плазмі людини і має час напівжиття 19 днів. Альбумін має декілька низькомолекулярних зв'язувальних сайтів, що дозволяють йому нековалентно зв'язуватися з іншими білками і сприяють збільшенню їхнього часу напівжиття в сироватці.

Для ілюстрації здатності поліпептидної частини сироваткового білка збільшувати час напівжиття DART, домен ABD3 стрептококові G-білки приєднували до рекомбінантного біспецифічного DART (що вступає в імунну реакцію з антигенами hCD16 і hCD32B) з одержанням рекомбінантної молекули антитіла hCD16-hCD32B ABD-DART (фігура 45). Цей комплекс ABD-DART мав специфічність зв'язування з обома антигенами, а також з альбуміном людської сироватки (HSA), і здатністю перенацілювати ефекторні клітини in vitro. Цей ABD-DART, у порівнянні з контрольним DART, мав значно більш тривалий час напівжиття в сироватці мишей. Такий підхід може бути застосований як практично здійсненний спосіб збільшення часу

напівжиття потенційно цінних фармацевтичних препаратів, таких як DART, більше ніж на 90 хвилин, більше ніж на 2 години, більше ніж на 5 годин, більше ніж на 10 годин, більше ніж на 20 годин і, найбільше переважно, більше ніж на 30 годин.

Матеріали і методи:

Моделювання і конструювання ABD-DART. hCD16-hCD32B ABD-DART одержували з використанням як ланцюга 1:

hCD16VL-G3SG4-hCD32BVH-K-спіраль [(KVAALKE)$_4$],

де CD16VL означає 3G8 CD16VL, G3SG4 означає SEQ ID NO: 10, hCD32BVH означає 2B6 CD32BVH, а (KVAALKE)$_4$ означає SEQ ID NO: 300;

і як ланцюга 2:

hCD32BVL-G3SG4-hCD16VH-GGCGGG-E-спіраль [(EVAALEK)$_4$]-GGGNS-ABD, де CD32BVL означає CD32BVL, G3SG4 означає SEQ ID NO: 10, hCD16VH означає CD16VH, GGCGGG являє собою залишки 2-7 SEQ ID NO: 267, E-спіраль [(EVAALEK)$_4$] являє собою SEQ ID NO: 299, GGGNS являє собою SEQ ID NO: 301, а ABD являє собою:

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLINNAKT VEGVKALIDE ILAALP (SEQ ID NO: 304).

Відповідно до цього, послідовність ланцюга 1 (h3G8VLI-G3SG4-h2B6VH4-K-спіраль-GGGNS) являє собою:

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKASQSVD FDGDSFMNWY QQKPGQPPKL
LIYTTSNLES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQQSNEDPY
TFGQGTKLEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTN
YWIHWVRQAP GQGLEWIGVI DPSDTYPNYN KKFKGRVTMT VVVSTSTAYM
ELRSLRSDDT AVYYCARNGD SDYYSGMDYW GQGTTVTVSS GGCGGGKVAA
LKEKVAALKE KVAALKEKVA ALKEGGGNS **(SEQ ID NO: 305)**

Переважний полінуклеотид, що кодує ланцюг 1 (h3G8VLI-G3SG4-h2B6VH4-K-спіраль-GGGNS), являє собою:

gacatcgtga tgacccaatc tccagacact ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc
atcaactgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct
ggggtcccag acaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcagc
agcctgcagg ctgaggatgt ggcagtttat tactgtcagc aaagtaatga agatccgtac
acgttcggac aggggaccaa gcttgagatc aaaggaggcg gatccggcgg cggaggccag
gttcagctgg tgcagtctgg agctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc
tgcaaggctt ctggttacac ctttaccaac tactggatac actgggtgcg acaggccact
ggacaagggc ttgagtggat tggagtgatt gatccttctg atacttatcc aaatacaaat
aaaaagttca agggcagagt caccatgacc gtagtcgtat ccacgagcac agcctacatg
gagctgagga gcctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgcgag aaacggtgat
tccgattatt actctggtat ggactactgg gggcaaggga ccacggtcac cgtctcctcc
ggaggatgtg gcggtggaaa agtggccgca ctgaaggaga aagttgctgc tttgaaagag
aaggtcgccg cacttaagga aaaggttcgca gccctgaaag agggcggcgg gaattct

(SEQ ID NO: 306)

Відповідно до цього, послідовність ланцюга 2 (h2B6VL5-G3SG4-h3G8VH5-E-спіраль-GGGNS-ABD), являє собою:

EIVLTQSPDF QSVTPKEKVT FTCRTSQSIG TNIHWYQQKP DQSPKLLIKE
VSESISGVPS RFSGSGSGTD FTLTINSLEA EDAATYYCQQ SNTWPFTFGG
GTKVEIKGGG SGGGGQVTLR ESGPALVKPT QTLTLTCTFS GFSLSTSGMG
VGWIRQPPGK ALEWLAHIWW DDDKRYNPAL KSRLTISKDT SKNQVVLTMT
NMDPVDTATY YCAQINPAWF AYWGQGTLVT VSSGGCGGGE VAALEKEVAA
LEKEVAALEK EVAALEKGGG NSLAEAKVLA NPELDKYGVS DYYKNLINNA
KTVEGVKALI DEILAALP **(SEQ ID NO: 307)**

Переважний полінуклеотид, що кодує ланцюг 2 (h2B6VL5-G3SG4-h3G8VH5-E-спіраль-GGGNS-ABD), являє собою:

gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc
ttcacctgca ggaccagtca gagcattggc acaaacatac actggtacca gcagaaacca
gatcagtctc caaagctcct catcaaggag gtttctgagt ctatctctgg agtcccatcg
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaccctca ccatcaatag cctggaagct
gaagatgctg caacgtatta ctgtcaacaa agtaatacct ggccgttcac gttcggcgga
gggaccaagg tggagatcaa aggaggcgga tcgggcggcg gaggccaggt tacgctgaga
gagtctggcc ctgcgctggt gaagcccaca cagaccctca cactgacttg tacctttctc
gggttttcac tgagcacttc tggtatgggt gtaggctgga ttcgtcagcc tccgggaag
gctctagagt ggctggcaca catttggtgg gatgatgaca agcgctataa tccagccctg
aagagccgac tgacaatctc caaggatacc tccaaaaacc aggtagtcct cacaatgacc
aacatggacc ctgtggatac tgccacatac tactgtgctc aaataaacgc cgcctggttt
gcttactggg gccaagggac tctggtcact gtgagctccg gaggatgtgg cggtggagga
gtggccgcac tggagaaaga ggttgctgct ttggagaagg aggtcgctgc acttgaaaag
gaggtcgcag ccctggagaa aggcggcggg aattctctgg ccgaagcaaa agtgctggcc
aacgcgaac tggataaata tggcgtgagc gattattata agaacctgat taacaacgca
aagaccgtgg aaggcgtgaa agcactgatt gatgaaatta tggccgccct gcct

(SEQ ID NO: 308)

Кожний з VL- і VH-сегментів ампліфікували за допомогою ПЛР із використанням hCD16-hCD32B DART як матриці. Для ланцюга 2 нуклеотидні послідовності, що містять E-спіраль і ABD, одержували з використанням димерного праймера, а потім субклонували біля C-кінця VH-ділянки hCD16 шляхом гідролізу рестриктуючими ферментами і лігування. Обидва сайти клонували у вектор pCIneo (Promega, inc.) у NheI-NotI-сайтах. Окремі плазміди, що мають відповідні експресійні кластери для ланцюга 1, гідролізованого в NgoMIV-NheI-сайтах, і ланцюга 2, гідролізованого у BstBI-PmeI-сайтах, клонували в одну плазміду для перенесення в клітини CHO і одержували стабільні клітинні лінії.

Експресія й очищення білка: Для стабільної трансфекції клітини CHO-S трансфікували плазмідною ДНК hCD16-hCD32B EK ABD-DART. Білок ABD-DART очищали за допомогою афінної хроматографії з використанням розчинного варіанта антигену FcRIIB, зв'язаного з CNBr-активованою сефарозою 4B. Потім концентрований білок знову очищали за допомогою ексклюзійної хроматографії на Superdex 200HR 10/30.

ELISA-аналіз на зв'язування: Для CD-16-захоплення планшети сенсибілізували антигеном FcRIIB у концентрації 2 мкг/мл і залишали на ніч при 4°C. Потім планшети блокували 0,5 % пептону в PBS-T. Очищені білки, розведені шляхом серійного дворазового розведення, зв'язувалися з планшетом протягом 1 години при кімнатній температурі. І нарешті, здійснювали детектування з використанням біотинільованого CD32B (50 нг/мл), а потім ПХ-кон'югованого стрептавідину (1/1000, BD-Pharm). ПХ-активність вимірювали шляхом додавання TMB, і планшет зчитували на планшет-рідері при OD 450 нм.

Для захоплення альбуміну людської сироватки (HSA), планшети сенсибілізували HSA у концентрації 2 мкг/мл і залишали на ніч при 4°C. Після цього, ті ж самі процедури були проведені для ELISA-аналізу з подвійною афінністю.

Аналіз на ADCC, опосередковувану мононуклеарними клітинами периферичної крові: Цитотоксичність вимірювали за допомогою аналізу на вивільнення LDH. Мононуклеарні клітини периферичної крові (МКПК) виділяли з цільної людської крові (Lonza Walkersville, Inc, Gaithersburg, MD) шляхом центрифугування в градієнті щільності фікола-гіпака (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) відповідно до інструкцій виробників. 2×10^4 клітин-мішеней висівали в кожну ямку круглодонного 96-ямкового планшета для культивування тканини. До клітин, що міститься в планшеті, додавали 1-4-кратні серійні розведення різних молекул DART або молекул антитіла. Після цього, у ті ж самі ямки додавали 6×10^5 МКПК. Потім планшет інкубували в інкубаторі при 37 °C у 5 % CO_2. Після цього, планшет центрифугували при 1200 об/хв. протягом 5 хвилин, і 50 мкл супернатанта переносили в плоскодонний ELISA-планшет. У кожну ямку додавали 50 мкл розчину субстрату LDH (Promega), і планшет інкубували протягом 30 хвилин у темряві при кімнатній температурі. Потім у кожну ямку додавали 50 мкл блокуючого

розчину, і планшет зчитували при 490 нм протягом однієї години. Відсоток цитотоксичності для кожної ямки обчислювали виходячи з оптичної густини (OD) по формулі:

(Проба - AICC)/(Клітини-мішені, максимальний вихід - Клітини-мішені, спонтанний вихід)×100,

де AICC являє собою антитіло-незалежну клітинну цитотоксичність. Криву «-відповідь" будували за допомогою програми Prism.

Фармакокінетичне дослідження: Мишам C57B1/6 вводили одну внутрішньовенну ін'єкцію hCD16-hCD32B DART у дозі 5 мг/кг. Мишачу сироватку брали перед уведенням дози, через 2 хвилини, 30 хвилин і через 1, 3, 6, 24 і 72 год. Потім оцінювали концентрацію hCD16-hCD32B DART у сироватці. Фармакокінетичні аналізи hCD16-hCD32B DART здійснювали за допомогою пакета програм для фармакокінетичних досліджень WinNonlin Professional 5.1 (Pharsight Corporation, USA). Параметри визначали за допомогою не камерного аналізу (NCA). Не камерний аналіз оснований на моделі (Model 201), що вимагає внутрішньовенної ін'єкції лікарського засобу. Для обчислення параметрів застосовували лінійний трапецеїдальний метод.

Результати

Дослідження експресії і зв'язування за допомогою ELISA: hCD16-hCD32B ABD-DART ефективно експресувався при концентрації 6,5 мг/літр у клітинах ссавців CHO-S. Активність зв'язування очищеного білка ABD-DART з відповідними антигенами оцінювали за допомогою ELISA. Результати показали, що hCD16-hCD32B ABD-DART зв'язується з обома антигенами одночасно, тобто з CD16 і з CD32B (фігура 46A). Профіль зв'язування збігався з профілем зв'язування контрольного білка hCD16-hCD32B DART. Афінність зв'язування очищеного hCD16-hCD32B ABD-DART з альбуміном людської сироватки (HSA) також була продемонстрована за допомогою ELISA (фігура 46B). Отриманий результат указував на сильне зв'язування гібрида ABD-DART з HSA, тоді як зв'язування з контрольним hCD16-hCD32B DART не спостерігалося. Для того, щоб продемонструвати, що молекула ABD-DART здатна одночасно зв'язуватися з CD32B, CD16A і HSA, на поверхню з іммобілізованим HSA упорскували ABD-DART, а потім упорскували 200 нМ CD32B і 200 нМ CD16A (F158) (фігура 46C, суцільна лінія). У контрольному експерименті (фігура 46C, пунктирна лінія) антигени заміняли буфером. Результати показали, що молекула ABD-DART має здатність одночасно зв'язуватися з CD32B, CD16A і HSA.

Було виявлено, що hCD16-hCD32B ABD-DART і його ABD-гібридне похідне мають еквівалентну здатність зв'язуватися з розчинним CD32B (sCD32B) і з розчинним CD16A (158F) (sCD16A); DART можуть бути легко ідентифіковані по здатності гібрида ABD-DART зв'язуватися з альбуміном людської сироватки (HSA); (фігури 46D-46I). DART інкубували на CD16A-покритих планшетах, і зв'язування детектували з використанням біотинільованого sCD32B у присутності або під час відсутності 3 мг/мл HSA (блокування здійснювали з використанням 0,5 % пептону в PBS-T). Було виявлено, що гібрид ABD-DART зберігав свою здатність до біспецифічного зв'язування з батьківським DART і був здатний зв'язуватися з sCD16A і CD32B, і на це зв'язування не впливала присутність альбуміну людської сироватки (фігура 46J).

In vitro цитотоксичність ABD-DART: Для того, щоб продемонструвати одночасне зв'язування такого біспецифічного ABD-DART із двома антигенами, тобто, з одним антигеном на ефекторних клітинах і з одним антигеном на клітинах-мішенях, був проведений аналіз на їх перенаціlений кілінг. У присутності людських МКПК, використовуваних як ефекторні клітини, hCD16-hCD32B ABD-DART індукував сильну дозозалежну цитотоксичність CD32B-позитивних B-клітинних ліній Дауді (фігура 47A). Отриманий результат показав, що активність ABD-DART була еквівалентна активності батьківського DART. CD16xCD32B DART може зв'язуватися з CD16B-експресуючими ефекторними клітинами і може здійснювати рекрутинг таких клітин для знищення (шляхом перенаціленого кілінгу) клітин, що експресують CD32B. Таким чином, було виявлено, що CD16xCD32B DART має здатність ефективно знищувати клітини Raji (фігура 47B).

Фармакокінетичні властивості ABD-DART: Фармакокінетичні властивості hCD16-hCD32B ABD-DART аналізували за допомогою ELISA проб сироватки після введення i.v. однієї дози мишам C57B1/6 (фігура 48). Обидва білки DART і ABD-DART виводилися з кровотоку в дві фази. Фармакокінетичні дослідження ABD-DART указували на більш тривале знаходження цієї молекули в кровотоці, тобто, її кінцевий час напівжиття становив 35,1 години, тоді як час напівжиття стандартного DART становив 1,2 години (фігура 48, таблиця 17). Поліпшення фармакокінетичних властивостей було також продемонстроване шляхом порівняння площі під кривої (AUC). У випадку конструкції ABD-DART, AUC майже в 30 разів перевищувала AUC для ABD-гібрида (таблиця 17).

Таблиця 17

	ABD-DART	DART
T½ (година)	35,1	1,2
C_{max} (мкг/мл)	156,3	103,7
T_{max} (год.)	0,5	0,033
AUC	4408,2	138,3

Біологічна активність ABD-DART in vivo: Для того, щоб продемонструвати, що hCD16-hCD32B ABD-DART зберігав біологічну активність in vivo, Tg(mCD16-/-hCD16A+32B+)-мишам була введена одна доза ABD-DART або батьківського DART, а потім був проведений моніторинг зміни концентрацій B-клітин, T-клітин і PM-клітин. Результати показали, що DART мали здатність знижувати концентрації B-клітин (фігура 49A), і отримані дані були інтерпретовані як доказ того, що спрямований перенаціlений кілінг B-клітин досягався in vivo ще до видалення DART із кровотоку в мишей. Концентрації T-клітин (фігура 49B) і ПМ-клітин (фігура 49C) не знижувалися з використанням DART, що підтверджувало специфічність DART.

У цілому, конструювання і продукування альбумін-зв'язувального домену, приєднаного до білка DART (що позначається ABD-DART), пройшло успішно. Було виявлено, що hCD16-hCD32B ABD-DART зберігав специфічність до двох розпізнаваних антигенних детермінантів: CD16 і CD32B. Було виявлено, що ABD-DART зв'язується з альбуміном людської сироватки з високою афінністю. ABD-гібрид не виявляв зниження біологічної активності (тобто, активності DART відносно перенаціленого знищення пухлинних клітин). Приєднання молекули DART до ABD приводило до значного збільшення часу напівжиття in vivo, і така ціль була досягнута без істотного збільшення розміру молекули. Здатність DART зберігати невеликий розмір є важливою і переважною властивістю, оскільки це дозволяє молекулі DART дифундувати в пухлинні тканини.

6.19. DART, зв'язані з Her2/B-клітинним рецептором

Було сконструйовано діатіло IgDART, що містить варіабельні ділянки, здатні зв'язуватися з Her2/neu і з T-клітинним рецептором ("TCR").

Як обговорювалося вище, TCR, по своїй природі, експресується $CD4^+$- або $CD8^+$-T-клітинами, що дозволяє цим клітинам розпізнавати антигенні пептиди, що зв'язуються і презентуються білками MHC класу I або класу II антигенпрезентуючих клітин. Розпізнавання комплексу pMHC (пептид-MHC) TCR ініціює поширення клітинної імунної відповіді, що приводить до продукування цитокінів і до лізису антигенпрезентуючих клітин. Оскільки HER2/neu, як важливий член сімейства ErbB, відіграє певну роль у розвитку деяких людських карцином і в еволюції ссавців, то він був підданий ретельному дослідженню. (Hynes & Stern (1994) Biochim. et Biophys. Acta 1198:165-184; і Dougall et al. (1994) Oncogene 9:2109-2123; Lee et al. (1995) Nature 378:394-398). Людський ген HER2/neu і білок HER2/neu описані в Semba et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 82:6497-6501 і Yamamoto et al. (1986) Nature 319:230-234, а їхні послідовності є в базі даних GenBank під реєстраційним номером X03363. HER2/neu містить чотири домени: позаклітинний домни, з яким зв'язується ліганд; ліпофільний трансмембранний домен; консервативний внутрішньоклітинний тирозинкіназний домен; і карбокси-кінцевий сигнальний домен, що має декілька тирозинових залишків, які можуть бути фосфориловані. (Plowman et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:1746-1750). Послідовність позаклітинного домену HER2/neu (ECD) описана Franklin et al. (2004) Cancer Cell. 5(4):317-328, і є в базі даних білків (Protein DataBank) під реєстр. № 1S78 (2004).

HER2/neu функціонує як рецептор фактора росту і, у більшості випадків, експресується пухлинами, такими як рак молочної залози, товстої кишки, сечового міхура, яєчника і легень. HER2/neu надекспресується в 25-30 % випадків раку молочної залози і яєчника в людини, і асоціюється зі швидким прогресуванням і з поганим прогнозом захворювання в цих пацієнтів. (Slamon et al. (1987) Science 235:177-182; Slamon et al. (1989) Science 244:707-712). Надекспресія HER2/neu також спостерігалася й в інших карциномах, включаючи карциному шлунка, ендометрія, слинних залоз, легень, нирок, товстої кишки, щитовидної залози, підшлункової залози і сечового міхура. (Див., наприклад, King et al. (1985) Science 229:974; McCann et al. (1990) Cancer 65:88-92; Yonemura et al. (1991) Cancer Research 51:1034).

Був отриманий ряд моноклональних антитіл і низькомолекулярних тирозинкіназних інгібіторів, націлених на HER-1 або HER2/neu, включаючи, зокрема, гуманізований варіант мишачого моноклонального антитіла, відомого як 4D5 (HERCEPTIN®, Genentech, Inc.), що розпізнає позаклітинний епітоп (амінокислоти 529-627) у багатому цистеїном домені II

HER2/neu, розташованому дуже близько від трансмембранної ділянки білка. Дослідження показали, що у випадку HER2/neu-надекспресуючих ракових клітин молочної залози, лікування антитілами, специфічними до HER2/neu у комбінації з хіміотерапевтичними засобами (наприклад, з цисплатином, доксорубіцином, таксолом), дає більш високий цитотоксичний відповідь, ніж лікування з застосуванням тільки однієї хіміотерапії (Hancock et al. (1991) Cancer Res. 51:4575-4580; Arteaga et al. (1994) Cancer 54:3758-3765; Pietras et al. (1994) Oncogene 9:1829-1838). Одним з можливих механізмів, за допомогою яких анти-HER2/neu антитіла можуть підсилювати відповідь на хіміотерапевтичні агенти, є модуляція експресії білка HER2/neu або запобігання репарації ДНК. (Stancovski et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:8691-8695; Bacus et al. (1992) Cell Growth & Diff. 3:401-411; Bacus et al. (1993) Cancer Res. 53:5251-5261; Klapper et al. (1997) Oncogene 14:2099-2109; Klapper et al. (2000) Cancer Res. 60:3384-3388; Arteaga et al. (2001) J Clinical Oncology 19(18s):32s-40s). Хоча в деяких випадках анти-HER2/neu антитіла, такі як HERCEPTIN®, дають терапевтичний ефект при лікуванні пацієнтів, однак, більшість пацієнтів з раком молочної залози й інших пухлин не піддаються лікуванню такими антитілами. Ці відповіді, почасти, указують на розходження рівнів надекспресії HER2/neu раковими клітинами пацієнтів.

Оскільки DART містить варіабельні ділянки, здатні зв'язуватися з Her2/neu і з Т-клітинним рецептором ("TCR"), то він має здатність зв'язуватися з HER2-експресуючими клітинами, і тим самим приєднувати до цих клітин домен, здатний зв'язуватися з Т-клітинним рецептором. Якщо такі Т-клітини зв'язуються з цим доменом, то вони ініціюють імунну відповідь, що приводить до знищення HER2-експресуючих клітин.

Амінокислотні послідовності і послідовності нуклеїнової кислоти для такого DART представлені нижче, де послідовності VL і VH вказані звичайним шрифтом, VL-VH-лінкери підкреслені, а послідовність, яка кодує С-кінцевий мотив гетеродимеризації (SEQ ID NO: 313: GFNRGEC або SEQ ID NO: 314: GVEPKSC), показана жирним шрифтом і курсивом.

Амінокислотна послідовність TCRVL-HER2VH (SEQ ID NO: 315)

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCSATSSVS YMHWYQQKPG KAPKRWIYDT SKLASGVPSR
FSGSGSGTEF TLTISSLQPE DFATYYCQQW SSNPLTFGQG TKLEIKGGGS GGGGQVQLQQ
SGPELVKPGA SLKLSCTASG FNIKDTYIHW VKQRPEQGLE WIGRIYPTNG YTRYDPKFQD
KATITADTSS NTAYLQVSRL TSEDTAVYYC SRWGGDGFYA MDYWGQGASV TVSS***GFNRGE***
C

TCRVL-HER2VH-і-кодуюча послідовність нуклеїнової кислоти (SEQ ID NO: 316)

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
ctctcctgca gtgccacctc aagtgtaagt tacatgcact ggtatcagca gaaaccaggg
aaagccccta agcgctggat ctatgacaca tccaaactgg cttctggggt cccatcaagg
ttcagcggca gtggatctgg gacagaattt actctcacaa tcagcagcct gcagcctgaa
gattttgcaa cttattactg tcagcagtgg agtagtaacc cgctcacgtt tggccagggg
accaagcttg agatcaaagg aggcggatcc ggcggcggag gccaggttca gctgcagcag
tctgggccag agcttgtgaa gccagggccc tcactcaagt tgtcctgtac agcttctggc
ttcaacatta aagacaccta tatacactgg gtgaaacaga ggcctgaaca gggcctggaa
tggattggaa ggatttatcc tacgaatggt tatactagat atgaccccgaa gttccaggac
aaggccacta taacagcaga cacatcctcc aacacagcct acctgcaggt cagccgcctg
acatctgagg acactgccgt ctattattgt tctagatggg gaggggacgg cttctatgct
atggactact ggggtcaagg agcctcggtc accgtgagct cc***ggattcaa caggggagag***
tgt

Амінокислотна послідовність HER2VL-TCRVH (SEQ ID NO: 317)

DIVMTQSHKF MSTSVGDRVS ITCKASQDVN TAVAWYQQKP GHSPKLLIYS ASFRYTGVPD
RFTGSRSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYTTPPTFGG GTKVEIKGGG SGGGGQVQLV
QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYKFTSYVMH WVRQAPGQGL EWIGYINPYN DVTKYNEKFK
GRVTITADKS TSTAYMELSS LRSEDTAVHY CARGSYYDYD GFVYWGQGTL VTVSS***GVEPK***
SC

HER2VL-TCRVH-кодуюча послідовність нуклеїнової кислоти

(SEQ ID NO: 318)

gacatcgtga tgacccagtc ccacaagttc atgtccacct ctgtgggcga tagggtcagc
atcacctgca aggccagcca ggatgtgaat actgctgtag cctggtatca gcagaaacca
ggacattctc ccaaactgct gatttactcc gcatccttcc ggtacactgg agtccctgat
cgcttcactg gcagcagatc tgggacagat ttcactttca ccatcagcag tgtgcaggct
gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatacta cacctcccac cttcggaggg
ggtaccaagg tggagatcaa aggaggcgga tccggcggcg gaggccaggt tcagctggtg
cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggg gcctcagtga aggtctcctg caaggccagc
ggttacaagt ttaccagcta cgtgatgcac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt
gagtggatcg gatatattaa tccttacaat gatgttacta agtacaatga gaagttcaaa
ggcagagtca cgattaccgc ggacaaatcc acgagcacag cctacatgga gctgagcagc
ctgagatccg aggacacggc cgtgcactac tgtgcgagag ggagctacta tgattacgac
gggtttgttt actggggcca agggactctg gtcactgtga gctcc***ggagt tgagcccaaa***
tcttgt

У переважному варіанті винаходу такі конструкції були модифіковані так, щоб вони містили E-спіральний або K-спіральний домен, що полегшує утворення гетеродимерів (тобто, димерів TCRVL-HER2VH×HER2VL-TCRVH). Амінокислотні послідовності і послідовності нуклеїнової кислоти для таких DART представлені нижче, де послідовності VL і VH вказані звичайним шрифтом, VL-VH-лінкери підкреслені, а послідовність, яка кодує Cys-вмісний лінкер для димеризації (GGCGGG; залишки 2-7 SEQ ID NO: 267), показана курсивом. E-спіраль K-спірального домену гетеродимеризації підкреслена подвійною лінією (переважна "E-спіральна" послідовність являє собою 4 гептамерних повтори EVAALEK; SEQ ID NO: 299; а переважна "K-спіральна" послідовність являє собою 4 гептамерних повтори KVAALKE (SEQ ID NO: 300). Послідовність, що йде за E-спіраллю або K-спіраллю, не має точно визначеної функції.

Амінокислотна послідовність TCRVL-HER2VH- E-спіраль

(SEQ ID NO: 319)

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCSATSSVS YMHWYQQKPG KAPKRWIYDT SKLASGVPSR
FSGSGSGTEF TLTISSLQPE DFATYYCQQW SSNPLTFGQG TKLEIKGGGS GGGGQVQLQQ
SGPELVKPGA SLKLSCTASG FNIKDTYIHW VKQRPEQGLE WIGRIYPTNG YTRYDPKFQD
KATITADTSS NTAYLQVSRL TSEDTAVYYC SRWGGDGFYA MDYWGQGASV TVSS***GGCGGG***
EVAALEKEVA ALEKEVAALE KEVAALEKGG GNS

Послідовність нуклеїнової кислоти , яка кодує

TCRVL-HER2VH-E-спираль (SEQ ID NO: 320)

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
ctctcctgca gtgccacctc aagtgtaagt tacatgcact ggtatcagca gaaaccaggg
aaagccccta agcgctggat ctatgacaca tccaaactgg cttctggggt cccatcaagg
ttcagcggca gtggatctgg gacagaattt actctcacaa tcagcagcct gcagcctgaa
gattttgcaa cttattactg tcagcagtgg agtagtaacc cgctcacgtt tggccagggg
accaagcttg agatcaaagg aggcggatcc ggcggcggag gccaggttca gctgcagcag
tctgggccag agcttgtgaa gccaggggcc tcactcaagt tgtcctgtac agctttctggc
ttcaacatta aagacaccta tatacactgg gtgaaacaga ggcctgaaca gggcctggaa
tggattggaa ggatttatcc tacgaatggt tatactagat atgacccgaa gttccaggac
aaggccacta taacagcaga cacatcctcc aacacagcct acctgcaggt cagcgcctg
acatctgagg acactgccgt ctattattgt tctagatggg gaggggacgg cttctatgct
atggactact ggggtcaagg agcctcggtc accgtgagct ccggaggatg tggcggtgga
gaagtggccg cactggagaa agaggttgct gctttggaga aggaggtcgc tgcacttgaa
aaggaggtcg cagccctgga gaaaggcggc gggaattct

Амінокислотна послідовність HER2VL-TCRVH-I K-спіраль

(SEQ ID NO: 321)

DIVMTQSHKF MSTSVGDRVS ITCKASQDVN TAVAWYQQKP GHSPKLLIYS ASFRYTGVPD
RFTGSRSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYTTPPTFGG GTKVEIKGGG SGGGGQVQLV
QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYKFTSYVMH WVRQAPGQGL EWIGYINPYN DVTKYNEKFK
GRVTITADKS TSTAYMELSS LRSEDTAVHY CARGSYYDYD GFVYWGQGTL VTVSS*GGCGG*
*G*KVAALKEKV AALKEKVAAL KEKVAALKEG GGNS

Послідовність нуклеїнової кислоти , яка кодує

HER2VL-TCRVH-K-спираль **(SEQ ID NO: 322)**

gacatcgtga tgacccagtc ccacaagttc atgtccacct ctgtgggcga tagggtcagc
atcacctgca aggccagcca ggatgtgaat actgctgtag cctggtatca gcagaaacca
ggacattctc ccaaactgct gatttactcc gcatccttcc ggtacactgg agtccctgat
cgcttcactg gcagcagatc tgggacagat ttcactttca ccatcagcag tgtgcaggct
gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatacta cacctcccac cttcggaggg
ggtaccaagg tggagatcaa aggaggcgga tccggcggcg gaggccaggt tcagctggtg
cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggg gcctcagtga aggtctcctg caaggcagc
ggttacaagt ttaccagcta cgtgatgcac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt
gagtggatcg gatatattaa tccttacaat gatgttacta agtacaatga gaagttcaaa
ggcagagtca cgattaccgc ggacaaatcc acgagcacag cctacatgga gctgagcagc
ctgagatccg aggacacggc cgtgcactac tgtgcgagag ggagctacta tgattacgac
gggtttgttt actggggcca agggactctg gtcactgtga gctccggagg *atgtggcggt*
*gga*aaagtgg ccgcactgaa ggagaaagtt gctgctttga aagaggaggt cgccgcactt
aaggaaaagg tcgcagccct gaaagagggc ggcgggaatt ct

Молекули DART, що мають домени, які зв'язуються з Her2 і Т-клітинним рецептором (TCR), тестували на їхню здатність опосередковувати цитотоксичність у багатьох клітинних лініях раку молочної залози, товстої кишки і сечового міхура, що були попередньо охарактеризовані як клітинні лінії з низькими рівнями експресії HER2 (а тому не піддавалися лікуванню анти-Her2/neu антитілом, Herceptin®). Тестованими клітинними лініями раку молочної залози є ZR75-1 (HER2 2+) (фігура 50A), MCF-7 (HER2 1+) (фігура 50B) і MDA-MB468 (HER2-ve) (фігура 50C). Тестованими клітинними лініями раку, що не є раком молочної залози, були HT-29 (клітинна

лінія раку товстої кишки) (фігура 50D) і SW780 (клітинна лінія раку сечового міхура) (фігура 50E). Як показано на фіг. 49A-E, такі молекули DART по суті є більш ефективними, ніж HERCEPTIN®, відносно опосередкування цитотоксичності пухлинних клітинних ліній у концентраціях, необхідних для досягнення еквівалентної цитотоксичності і максимальних рівнів цитотоксичності, яка спостерігається.

6.20. In vitro приєднання DART до ABD за допомогою E- і K-спіралей

Як обговорювалося вище, молекули DART відповідно до винаходу можуть бути сконструйовані так, щоб вони мали здатність біспецифічно зв'язуватися з рецептором NKG2D і афінністю до гаптену, флуоресцеїну, і тим самим могли служити як універсальні адаптери, і мали здатність зв'язувати рецептор NKG2D з молекулами, взаємодіючими з партнерами по зв'язуванню, кон'югованими з флуоресцеїном. Для додаткової ілюстрації застосування ABD, DART конструювали з використанням поліпептидних ланцюгів:

(1) KYK2VL-4420VH-GFNRGEC (SEQ ID NO: 313) - E-спіраль: Цей поліпептид конструювали з використанням VL-домену вищеописаного антитіла KYK 2.0 (Kwong, KY et al. (2008) "Generation, Affinity Maturation, And Characterization Of A Human Anti-Human NKG2D Monoclonal Antibody With Dual Antagonistic And Agonistic Activity" J. Mol. Biol. 384:1143-1156; і PCT/US09/54911) і VH-домену вищеописаного MAb проти флуоресцеїну, 4420.

(2) 4420VL-KYK2VH-GVEPKSC (SEQ ID NO: 314): Цей поліпептид конструювали з використанням VL-домену вищеописаного MAb проти флуоресцеїну, 4420, і VH-домену антитіла KYK 2.0. "E-спіраль" означає E-спіральну амінокислотну послідовність 4 гептамерних повторів EVAALEK; SEQ ID NO: 299.

Поліпептиди KYK2VL-4420VH-GFNRGEC (SEQ ID NO: 313) - E-спіраль і 4420VL-KYK2VH-GVEPKSC (SEQ ID NO: 314) переносили в клітини CHO для експресії DART, позначеного "KYK2 4420 VF E-спіраль". Очищення цих молекул проілюстровані на фігурах 51A і 51B. Афінність DART "KYK2 4420 VF E-спіраль" визначали шляхом детектування здатності NKG2D Fc 012210 зв'язувати DART з іммобілізованим антигеном ФІТЦ. Отримані результати експерименту продемонстрували, що DART має здатність зв'язуватися з обома молекулами (фігура 52).

Крім того, був отриманий гібрид "K-спіраль-GGGNS (SEQ ID NO: 301)-ABD", де "K-спіраль" означає K-спіральну амінокислотну послідовність 4 гептамерних повторів KVAALKE (SEQ ID NO: 300). На фігурі 53 проілюстрована рестрикційна карта плазміди pPAL7 і конструювання плазміди pPAL7 K-coil ABD, що експресує гібрид "K-спіраль-ABD", з використанням мітки PROFINITY EXACT™ (Bio-Rad, Hercules, CA) для полегшення очищення. Вектор pPAL7 K-coil ABD переносили в клітини BL21DE3 E. coli. Експресію міченого гібрида "K-спіраль-ABD" індукували шляхом додавання 2 мМ IPTG протягом 4 годин. Експресію білка підтверджували за допомогою електрофорезу в ДСН-ПААГ і вестерн-блот-аналіза. Коротко, система конструювання гібридної мітки PROFINITY EXACT™ включає опосередкування лізису клітин, зв'язування білків, що вивільняються, з афінною колонкою, яка містить іммобілізовану субтилізин-протеазу, промивання колонки для елюювання незв'язаних білків, додавання фторид-вмісного елюючого буфера з метою ініціації активності субтилізину для швидкого і точного відщеплення мітки від злитого білка після відщеплення розпізнавальної послідовності, видалення неміченого білка з колонки після такого відщеплення шляхом промивання і діаліз елюйованого білка в PBS. На фігурі 54 проілюстрований вестерн-блот-аналіз злитого білка "K-спіраль ABD", очищеного на смолі для очищення PROFINITY EXACT™ (у лабораторному масштабі виходячи з 10 мл культури).

Білок "K-спіраль-AFD", отриманий на смолі для очищення PROFINITY EXACT™, додатково очищали за допомогою електрофорезу в ДСН-ПААГ (фігура 55). З 250 мл культури E. coli одержували 6,523 мг очищеного білка (таблиця 18).

Таблиця 18

Елюйовані фракції	Буфер	Концентрація (мг/мл)	Об'єм	Загальний білок (мг)
1-6	PBS	0,412	6	2,06
7-9	PBS+100 мМ NaF	0,924	1,8	1,663
10-13	PBS+100 мМ NaF	0,800	3,5	2,8
				6,523

DART KYK2 4420 VF-E-спіраль і білок "K-спіраль-ABD" інкубували в PBS протягом 30 хвилин при кімнатній температурі й одержували DART "E-спіраль-K-спіраль ABD" з поліпшеними властивостями. Результати ELISA-аналізу показали, що всі домени в цьому комплексі здатні

зв'язуватися з їх відповідними лігандами (фігури 56A-56C). При бажанні, додаткове очищення комплексу KYK2 4420 VF-E-спіраль і K-ABD може бути проведене на колонці з анти-EK антитілом.

Оскільки утворення комплексу не залежить від конкретних зв'язувальних доменів DART, то вищевказаний спосіб може бути застосований для одержання DART "E-спіраль-K-спіраль ABD", що мають інші специфічності зв'язування (наприклад, за допомогою утворення комплексу анти-CD32B (наприклад, антитіла 2B6)/анти-CD16A (наприклад, антитіла 3G8) VF-E-DART з гібридом "K-спіраль ABD").

Таким чином, як показано вище, в одному з варіантів винаходу обидва поліпептиди DART, що містять антигензв'язувальний домен, можуть включати додаткову послідовність, що служить для ініціації утворення гетеродимера (наприклад, K-спіралі або E-спіралі), і необов'язково один з таких поліпептидів може містити поліпептидну частину білка, що зв'язується із сироваткою, здатну зв'язуватися із сироватковим білком (наприклад, фігура 45). В альтернативному варіанті винаходу один, а переважно тільки один поліпептид DART, що містить антигензв'язувальний домен, може включати таку додаткову послідовність для ініціації утворення гетеродимера (наприклад, або K-спіралі, або E-спіралі), і вказаний DART може включати комплекс з іншим (наприклад, третім) поліпептидом, що не містить антигензв'язувального сайту, але містить поліпептид, що має комплементуючу послідовність для запуску утворення гетеродимера (наприклад, K-спіралі, де поліпептид DART, що містить антигензв'язувальний домен, включає E-спіраль; або E-спіралі, де поліпептид DART, що містить антигензв'язувальний домен, включає K-спіраль) і необов'язково поліпептидну частину білка, що зв'язується із сироваткою, здатну зв'язуватися із сироватковим білком. Поліпептидна частина вказаного додаткового (наприклад, третього) поліпептиду такого білка, що зв'язується із сироваткою, може бути локалізована або біля N-кінця, або біля C-кінця відносно поліпептиду, що має таку комплементуючу послідовність.

6.21. Деімунізація альбумін-зв'язувального домену

Як обговорювалося вище, молекули DART відповідно до винаходу можуть бути сконструйовані так, щоб вони містили альбумін-зв'язувальний домен (ABD), такий як ABD, що походить від стрептококового G-білка, а більш переважно, альбумін-зв'язувальний домен 3 (ABD3) G-білка стрептококового штаму G148.

Для зниження імуногенності ABD були введені амінокислотні модифікації в положення залишків 60-79 амінокислотної послідовності ABD3: (SEQ ID NO: 304):

LAEAKVLANR	ELDKYGVSDY	YKNLINNAKT	VEGVKALIDE	ILAALP	
41	50	60	70	80	86

і був оцінений вплив таких модифікацій на зв'язування з HSA (таблиця 19).

Таблиця 19

Амінокислота	Зв'язування з HSA	Амінокислота	Зв'язування з HSA	Амінокислота	Зв'язування з HSA
WT	**1**	I65A	1	V71E	0.8
Y60F	1	I65Y	N/A (низький рівень експресії)	V71C	1
Y60L	1	I65H	N/A (низький рівень експресії)	V71W	0.4
Y60I	1	I65Q	N/A (низький рівень експресії)	V71R	1
Y60M	1	I65N	N/B	V71G	1
Y60V	0.87	I65K	0.2	E72F	0.2
Y60S	0.26	I65D	N/B (низький рівень експресії)	E72L	0.3
Y60P	0.43	I65E	N/B (низький рівень експресії)	E72I	0.5
Y60T	0.74	I65C	N/B	E72M	0.4
Y60A	0.56	I65W	N/B	E72V	0.5
Y60H	0.22	I65R	N/B	E72S	1
Y60Q	0.47	I65G	0.2 (Низький рівень експресії)	E72P	0.4
Y60N	0.19	A68F	0.1	E72T	0.4
Y60K	0.56	A68L	0.06	E72A	1
Y60D	N/B	A68I	0.1	E72Y	0.6
Y60E	N/B	A68M	N/B	E72H	1
Y60C	N/B	A68V	0.05	E72Q	0.34
Y60W	1.7	A68S	0.9	E72N	1
Y60R	0.73	A68P	N/B (низький рівень експресії)	E72K	1
Y60G	N/B (низький рівень експресії)	A68T	0.56	E72D	1
Y61L	0.48	A68Y	0.09	E72C	0.1

Таблиця 19

Амінокислота	Зв'язування з HSA	Амінокислота	Зв'язування з HSA	Амінокислота	Зв'язування з HSA
Y61I	1.33	A68H	N/B	E72W	0.34
Y61M	1.2	A68Q	N/B	E72R	1
Y61V	1.24	A68N	N/B	E72G	1
Y61S	0.47	A68K	N/B	G73F	0.1
Y61P	0.87 (Низький рівень експресії)	A68D	N/B	G73L	0.15
Y61T	1	A68E	N/B	G73I	0.1
Y61A	1	A68C	0.25	G73M	0.1
Y61H	1 (Низький рівень експресії)	A68W	0.05	G73V	0.15
Y61Q	0.35	A68R	N/B	G73S	0.3
Y61N	0.26 (Низький рівень експресії)	A68G	1	G73P	0.1
Y61K	N/B	K69F	0.2	G73T	0.15
Y61D	N/B	K69L	0.55	G73A	1
Y61E	N/B (низький рівень експресії)	K69I	0.38	G73Y	0.15
Y61C	N/B (низький рівень експресії)	K69M	0.69	G73H	0.15
Y61W	0.33 (низький рівень експресії)	K69V	0.58	G73Q	0.1
Y61R	0.41	K69S	0.47	G73N	0.1
Y61G	0.45	K69P	N/B	G73K	0.1
L64F	0.6 (Низький рівень експресії)	K69T	0.15	G73D	0.1
L64I	1	K69A	1	G73E	0.1
L64M	1	K69Y	0.48	G73C	0.1
L64V	1	K69H	0.67	G73W	0.1
L64S	0.55	K69Q	0.6	G73R	0.1
L64P	0.8 (Низький рівень експресії)	K69N	0.75	D79F	1
L64T	0.8	K69D	0.19	D79L	1
L64A	0.6	K69E	0.2	D79I	1.2
L64Y	0.85	K69C	0.35	D79M	0.6
L64H	1	K69W	0.27	D79V	1.1
L64Q	0.4 (Низький рівень експресії)	K69R	1	D79S	1.2
L64N	0.7 (Низький рівень експресії)	K69G	1	D79P	1
L64K	0.5	V71F	0.1	D79T	1
L64D	N/B	V71L	1	D79A	1
L64E	N/B	V71I	1	D79Y	1
L64C	0.6 (Низький рівень експресії)	V71M	1	D79H	1
L64W	1.2	V71S	1	D79Q	1
L64R	0.94	V71P	1	D79N	1
L64G	1	V71T	1	D79K	1
I65F	0.43	V71A	1	D79E	1
I65L	1	V71Y	0.8	D79C	0.4
I65M	1.1	V71H	1	D79W	0.2
I65V	1	V71Q	1	D79R	1
I65S	0.5	V71N	1	D79G	1
I65P	N/A (Низький рівень експресії)	V71K	1		
I65T	0.6	V71D	0.4		

Для додаткового поліпшення властивостей ABD може виявитися бажаним зменшення або придушення зв'язування з MHC класу II. Пептиди, які походять від Y60 і Y61, мають загальний залишок у "кишені" у положенні N66 (P6/P7), а L64 і I65 мають загальний залишок у "кишені" P6/P7 у положенні T70. Тому було висловлене припущення, що заміна N66 на D або E у комбінації з заміною T70D буде ефективно придушувати зв'язування з MHC класу II. Альтернативно, було висловлене припущення, що зв'язування з MHC класу II може інгібуватися за допомогою мутації в чотирьох якорях p1 Y60, Y61, L64 і I65. Відповідно до цього було проведено два раунди мутаційного аналізу. У таблиці 20 представлені результати першого раунду мутаційного аналізу.

Таблиця 20

Якір p1	Ймовірні мутації	Високоафінні ліганди MHC II	Середня оцінка	Зв'язування з HSA*
Y60	-	10	0.6176	
	P1 Y60A	0	0	++
	P1 Y60H	0	0	+
	P1 Y60T			+++
	P1 Y60S			+
	P1 Y60G			(-)
	P7 N66D	2	0.5891	+++
	P7 N66E	3	0.5967	+++
	P7 N66S	4		
Y61	-	12	0.6577	
	P1 Y61A	0	0	+++
	P1 Y61H	0	0	+++
	P1 Y61T			+++
	P1 Y61S			++
	P1 Y61G			++
	P6 N66D	4	0.6120	+++
	P6 N66E	3	0.5940	+++
	P6 N66S	0		
L64	-	11	0.6067	
	P1 L64A	0	0	+
	P1 L64T			+++
	P1 L64S			++
	P1 L64G			+++
	P7 T70D	5	0.5998	(-)
	P7 T70S	4		
I65	-	20	0.6235	
	P1 I65A	0	0	+++
	P1 I65T			++
	P1 I65S			++
	P1 I65G			+
	P7 T70D	0	0	(-)
	P7 T70S	3		
V71	-	8	0.61430	
	P1 V71A	0	0	+++

* з HSA звязувались MHC чотирьох використовуваних класів:
+++ (0,7 – 1,0), ++ (0,4 – 0,7), ++ (0,1 – 0,4), (-)(<0,1)

Отримані результати показали, що мутація V71 > A якоря p1 являє собою найбільш ефективний варіант, але може також розглядатися комбінація (1+3) або комбінація (2+3). Усі протестовані комбінації є ефективними, за винятком T70D і Y60G.

Результати другого раунду мутаційного аналізу представлені в таблиці 21 і в таблиці 22.

Таблиця 21

Y61A/N66S/T70S

Якір p1	Зв'язування з високою афінністю
Y60	4
Y61	0
L64	4
I65	3
Додаткова заміна V71A	

Таблиця 22

Результат

Амінокислотні мутації	Зв'язування з HSA
66S/70S	+++
61A/66S 70S	(-)

У таблиці 23 приводяться систематизовані результати, отримані в двох раундах мутаційного аналізу.

Таблиця 23

Амінокислотні мутації	Зв'язування з HSA	Амінокислотні мутації	Зв'язування з HSA*
60A/61A	(-)	70S	+++
60T/61A	(-)	60A/61A/65A	(-)
61A/65A	(-)	60T/61A/65A	(-)
61A/66D	+	60A/61A/71A	(-)
61A/66S	++	60T/61A/71A	(-)
64A/70S	+	61A/65A/71A	(-)
64A/65A	++	61A/66D/71A	+
64A/66D	+	64A/65A/71A	++
64G/65A	N/A	64A/66D/71A	+
64G/66D	(-)	64G/65A/71A	-
65A/66D	++	64G/66D/71A	+
66S/70S	+++	65A/66D/71A	+
66S	+++	Y61A/N66S/T70S	(-)

* з HSA звязувались МНС чотирьох використовуваних класів: +++ (0,7 – 1,0), ++ (0,4 – 0,7), ++ (0,1 – 0,4), (-)(<0,1)

Виходячи з результатів комбінаторного мутаційного аналізу можна зробити висновок, що нижченаведені комбінації замін являють собою переважні заміни для утворення деімунізованого альбумін-зв'язувального домену: 66S/70S+71A; 66S/70S+79A; 64A/65A/71A+66S; 64A/65A/71A+66D; 64A/65A/71A+66E; 64A/65A/79A+66S; 64A/65A/79A+66D; 64A/65A/79+66E. Зірочка («*») означає положення 71 → P1 і положення 79 → P9.

Як показано на фігурі 57, варіанти ABD, що мають модифікації L64A, I65A і D79A або модифікації N66S, T70S і D79A:

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNA$_{64}$A$_{65}$NNAKT VEGVKALIA$_{79}$E ILAALP (SEQ ID NO: 323),

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLIS$_{66}$NAKS$_{70}$ VEGVKALIA$_{79}$E ILAALP (SEQ ID NO: 324), по суті, здатні зв'язуватися з молекулами дикого типу.

ABD-варіанти 61A/65A, 61A/66D, 64A/65A* і 64A/66D були оцінені разом з молекулами дикого типу на їхню здатність зв'язуватися з альбуміном. Результати таких аналізів представлені на фігурі 58. ABD-варіанти 64G/66D, 65A/66D, 66S/70S* і 61A/66S/70S були оцінені разом з молекулами дикого типу на їхню здатність зв'язуватися з альбуміном. Результати таких аналізів представлені на фігурі 59. На фігурі 60 представлені результати аналізів на зв'язування ABD-варіантів Y60A/Y61A, Y60T/Y61A, I65A/N66D/V71A, Y61A/I65A/V71A, L64A/N66D/V71A і молекул дикого типу (SEQ ID NO: 304) з альбуміном. На фігурі 61 представлені результати аналізів на зв'язування ABD-варіантів Y60A/Y61A/V71A, Y60T/Y61A/V71A, L64A/I65A/V71A і молекул дикого типу з альбуміном. На фігурі 62 представлені результати аналізів на зв'язування ABD-варіантів L64G/I65A/V71A, L64G/N66D/V71A, Y61A/T70S, N66S, T70S, Y61A/N66S, L64A/I65A і молекул дикого типу з альбуміном.

6.22. Підтвердження деімунізації альбумін-зв'язувального домену

ABD-варіанти, включаючи, зокрема, варіанти в положенні V71 (наприклад, V71A), мали знижену імуногенність. Для ілюстрації такої деімунізації три зразки пептиду оцінювали на

імуногенний потенціал протягом визначеного періоду часу за допомогою Т-клітинних аналізів EpiScreen™ залежно від часу. Оцінені зразки являли собою 21-вимірні фрагменти (Y60-E80) ABD-пептиду дикого типу (SEQ ID NO: 304):

```
LAEAKVLANR  ELDKYGVSDY  YKNLINNAKT  VEGVKALIDE
41        50          60          70          80
```

ABD Y60-E80 дикого типу («Зразок 1») (SEQ ID NO: 325):

Y YKNLINNAKT VEGVKALIDE

Y60-E80-варіант ABD N66D/T70S/V71A («Зразок 2») (SEQ ID NO: 326):

Y YKNLI**D**$_{66}$NAK**S**$_{70}$ **A**$_{71}$EGVKALIDE і

Y60-E80-варіант ABD L64A/I65A/V71A («Зразок 3») (SEQ ID NO: 327):

Y YKN**A**$_{64}$**A**$_{65}$NNAKT **A**$_{71}$EGVKALIDE

Мононуклеарні клітини периферичної крові (МКПК) виділяли з лейкоцитарної плівки в групи здорових донорів (із крові, узятої протягом 24 годин). МКПК виділяли з лейкоцитарної плівки шляхом центрифугування в градієнті щільності Lymphoprep™ (Axis-shield, Dundee, UK), і CD8$^+$-Т-клітини виснажували з використанням CD8$^+$RosetteSep™ (StemCell Technologies Inc, London, UK). Донори були обстежені шляхом ідентифікації HLA-DR-гаплотипів з використанням набору для типування тканини на основі ПЛР HLA SSP (Biotest, Solihull, UK). Також оцінювали Т-клітинні відповіді на контрольні антигени (гемоціанін лімфи равлика (KLH) [Pierce (Perbio), Cramlington, UK)] і на пептиди, які походять від вірусів грипу А і Епштейна-Барра. Потім МКПК заморожували і зберігали в рідкому азоті до їхнього використання. Була обстежена група з 50 донорів, що мали алотипи, що охоплюють >80 % усіх алотипів, які зустрічаються в природі, де всі основні алотипи HLA-DR (окремі алотипи, експресовані з частотою >5 % у населення усього світу) добре описані в літературі.

МКПК, узяті від кожного донора, відморожували, підраховували, а потім оцінювали їхню життєздатність. Клітини індукували при кімнатній температурі в культуральному середовищі AIM-V®, промивали і ресуспендували в AIM-V® до об'єму 4-6×10^6 МКПК/мл. Для кожного донора брали культури в їхній загальній масі, а потім у відповідні ямки 24-ямкового планшета додавали 1 мл маточного розчину проліферуючих клітин. До МКПК додавали культуральне середовище (0,5 мл) і тестований пептид (0,5 мл) до кінцевої концентрації 5 мкМ. Для кожного донора використовували репродукований контроль (клітини, інкубовані з 100 мкг/мл KLH) і "тільки одне культуральне середовище", що також цілком достатньо. Культури інкубували всі 8 днів при 37 °C у 5 % CO_2. На дні 5, 6, 7 і 8 клітини в кожній ямці злегка ресуспендували, і 3×100 мкл аліквот переносили в кожну ямку круглодонного 96-ямкового планшета. Культури піддавали імпульсному міченню 0,75 мкКі [^{3}H]-тимідину (Perkin Elmer®, Beaconsfield, UK) у 100 мкл культурального середовища AIM-V® і інкубували протягом ще 18 годин, а потім збирали на фільтрах-матах (Perkin Elmer) з використанням збирача клітин TomTec Mach III™. Число імпульсів на хвилину (ім./хв.) для кожної ямки визначали шляхом підрахунку сцинтиляційних імпульсів на приладі Meltilex™ (Perkin Elmer®), приєднаному до рідинного сцинтиляційному лічильнику 1450 Microbeta Wallac Trilux (Perkin Elmer®), у біноклі Паралюкс, і було виявлено, що ці клітини мали низький тіньовий фенотип.

Для оцінки впливу такої обробки на життєздатність клітин, на день 7, культури в загальній масі можуть бути злегка ресуспендовані, а потім 20 мкл кожного зразка брали у всіх донорів і змішували з 20 мкл трипанового синього. Потім ці зразки можуть бути оцінені на життєздатність по витисненню барвника трипанового синього на автоматичному пристрої для підрахунку клітин Countess® (Invitrogen). Життєздатність переважно виражали як відсоток витиснення трипанового синього/загальне число клітин. В експериментах, проведених з використанням зразка 1 (дикого типу) і різних тестованих пептидів, що не є зразком 2 або зразком 3, було виявлено, що культивовані клітини, узяті у всіх обстежуваних донорів, зберігали свою життєздатність у середньому більш ніж на 87 %. Відповідно до обчислень, середня життєздатність клітин, інкубованих тільки із середовищем, становила 90 %, а середня життєздатність клітин, інкубованих з тестованими пептидами, становила 88, 88 і 87 %, відповідно. Життєздатність KLH-оброблених клітин становила 83 %, що значно не відрізнялася

від життєздатності клітин, оброблених пептидом. Отже, можна зробити висновок, що інкубування клітин (МКПК) з пептидами не приводило до якої-небудь помітної токсичності протягом усього періоду культивування клітин.

В аналізі на IL-2 ELISpot™ брали участь ті ж донори. які брали участь в аналізі на проліферацію. Клітини відморожували й активували, як описано вище. Планшети ELISpot (Millipore, Watford, UK) попередньо зволожували, сенсибілізували 100 мкл/ямку антитілом для захоплення IL-2 (R&D Systems, Abingdon, UK) у PBS і залишали на ніч. Потім планшети 3 рази промивали в PBS, інкубували протягом ночі у блокувальному буфері (1 % BSA (альбуміну бичачої сироватки, Sigma) у PBS) і промивали в середовищі AIM-V®. Щільність клітин для кожного донора доводили до 4-6×10^6 МКПК/мл у культуральному середовищі AIM V® і в кожну ямку додавали 100 мкл клітин. У відповідні ямки додавали 50 мкл тестованого пептиду і контроль.

Пептиди (ABD Y60-E80 ("Зразок 1"), Y60-E80-варіант ABD N66D/T70S/V71A ("Зразок 2") (SEQ ID NO: 326) або Y60-E80-варіант ABD L64A/I65A/V71A ("Зразок 3") (SEQ ID NO: 327) додавали до $CD8^+$-виснажених культур МКПК у своїй загальній масі. Після інкубування зі зразками проліферацію $CD4^+$-Т-клітин вимірювали по включенню [^{3}H]-тимідину в різні періоди часу одночасно з вимірюванням рівня секреції IL-2 за допомогою аналізу ELISpot™ (аналіз на IL-2 ELISpot™ включає попереднє покриття мембрани антитілом для захоплення, що зв'язується із секретованим цитокіном). Пептиди розводили в культуральному середовищі AIM-V® (Invitrogen, Paisley, UK) безпосередньо перед їхнім застосуванням, і кінцева аналітична концентрація становила 5 мкМ. KLH використовували як репродукований контроль і зберігали при -20 °C у вигляді 10 мг/мл маточного розчину у воді. Для дослідження аліквоти KLH відморожували, а потім відразу розводили до 400 мкг/мл у AIM-V® (у кінцевій концентрації 100 мкг/мл). Фітогемаглютинін (PHA, Sigma, Poole, UK) використовували як позитивний контроль у ELISpot™ і 1 мг/мл маточного розчину зберігали при -20 °C, а потім розводили до кінцевої концентрації 2,5 мкг/мл у клітинних культурах.

Тестовані пептиди аналізували в культурах із шістьма повторностями, і для кожного донора, у кожен планшет також уключали негативний контроль (тільки середовище AIM-V®), безклітинний контроль і мітоген-позитивний контроль (PHA при 2,5 мкг/мл - використовували як внутрішній тест на функцію ELISpot™ і життєздатність клітин, Sigma). Після 8-денного періоду інкубування планшети ELISpot™ виявляли шляхом наступного промивання в dH_2O і PBS (x3) і додавання 100 мкл фільтрованого біотинільованого детектучого антитіла (R&D Systems) у PBS/1 % BSA. Після інкубування при 37 °C протягом 1,5 години, планшети знову промивали в PBS (×3), і протягом 1,5 години додавали 100 мкл фільтрованого стрептавідину-AP (R&D Systems) у PBS/1 % BSA при кімнатній температурі. Потім стрептавідин-AP відкидали, і планшети промивали в PBS (x4). У кожну ямку додавали субстрат BCIP/NBT (R&D Systems) (100 мкл) і інкубували протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Розвиток плями припиняли шляхом промивання ямок, і дно ямок три рази промивали dH_2O. Осушені планшети сканували на аналізаторі Immunoscan® Analyser, і число плям на ямку (spw) визначали за допомогою програми Immunoscan® Version 4.

Для проведення аналізів на проліферацію і IL-2 ELISpot™, зразки, індукуючі відповіді, дорівнюють або в два рази перевищуючі емпіричний поріг індексу стимуляції (SI) (SI≥2,00), розглядалися як позитивні. Для серії даних аналізів на проліферацію (n=3) і аналізів на IL-2 ELISpot (n=6), позитивні відповіді визначали по статистичних і емпіричних порогах: значимість ($p<0,05$) відповіді визначали шляхом порівняння величин імп./хв… або плям/ямку для тест-ямок з такими величинами для контрольних ямок (середовище) з використанням непарного Т-критерію Стьюдента для двох зразків; причому індекс стимуляції дорівнює 2 або вище (SI≥2,00), де SI=середнє для тест-ямок (імп./хв. або плям/ямку)/фон (імп./хв. або плям/ямку). Дані, отримані таким способом, представлені як SI≥2,00, $p<0,05$. Крім того, розходження між даними одного аналізу оцінювали шляхом обчислення коефіцієнта варіації і стандартного відхилення (SD) вихідних даних від даних культур, отриманих у дубльованих аналізах.

Було виявлено, що пептид дикого типу індукує позитивні проліферативні відповіді в аналізі EpiScreen™ на проліферацію Т-клітин залежно від часу, а саме, $CD4^+$-Т-клітинні відповіді з SI≥2,00 ($p<0,05$) у семи донорів, включаючи одну граничну відповідь (SI≥1,90 ($p<0,05$)), яка давала частоту позитивної відповіді 14 %. Середня величина (SI) позитивних (SI≥2,00, $p<0,05$) Т-клітинних проліферативних відповідей у порівнянні з відповіддю пептиду дикого типу становила SI=2,55, тобто, була дещо вища, ніж величина для двох деімунізованих пептидів (таблиця 24). У таблиці 24 приводяться систематизовані величини (±SD (порівн. кв. відх.)) позитивних Т-клітинних проліферативних відповідей у порівнянні з відповідями, що спостерігаються для тестованих пептидів і KLH. Середнє значення SI обчислювали виходячи із

середньої величини всіх позитивних відповідей, що спостерігаються в донорів за весь курс лікування (дні 5-8). Отримані дані включають граничні проліферативні відповіді (SI≥1,90), p<0,05).

Таблиця 24

Зразок	Середнє SI	SD (порівн. кв. відх.)	% відповіді
Дикого типу	2,55	0,73	14
N66D/T70S/V71A	2,63	0,56	4
L64A/I65A/V71A	2,17	0,24	6
KLH-контроль	5,38	5,22	92

Таким чином, виходячи з аналізу на проліферацію, величини (SI) Т-клітинної відповіді і частота (%) донорів, що відповідають, в експериментальній групі вказували на те, що загальна імуногенність пептидів дикого типу в даному дослідженні може розглядатися як помірна, а імуногенность деімунізованих пептидів може розглядатися як низька. Ці дані підтвердили, що видалення специфічних Т-клітинних епітопів дикого типу шляхом уведення мутацій N66D/T70S/V71A і L64A/I65A/V71A було успішним.

Загальний хронометраж проліферативних відповідей може служити показником імуногенного потенціалу, типу Т-клітинної відповіді (первинного або вторинного). Максимальна Т-клітинна проліферація, детектована на 5-ий день, указувала на те, що є велике число Т-клітин-попередників, а максимальна проліферація на 8-ий день указувала на те, що є невелике число Т-клітин-попередників. Високий імуногенний потенціал повинний відповідати стимуляції Т-клітин на ранній фазі проведення аналізу. Тестований пептид варіанта ABD Y60-E80 N66D/T70S/V71A ("Зразок 2") (SEQ ID NO: 326) давав 1, 0, 1 і 1 відповідь на дні 5, 6, 7 і 8, відповідно. Тестований пептид варіанта ABD Y60-E80 L64A/I65A/V71A ("Зразок 3") (SEQ ID NO: 327) давав 0, 1, 2 і 1 відповідь на дні 5, 6, 7 і 8, відповідно. Низьке число реагуючих донорів, що спостерігаються у випадку N66D/T70S/V71A і L64A/I65A/V71A, утруднювало інтерпретацію кінетичного аналізу Т-клітинної проліферативної відповіді цього типу, хоча декілька відповідей, що спостерігалися для цих зразків, відбувалися пізніше за часом і підтвердили ту думку, що здорові індивідууми не були примовані Т-клітинними епітопами, які присутні у цих послідовностях.

Аналогічно аналізу на проліферацію, позитивні відповіді реєстрували в донорів, що мали SI≥2,00 зі значимим (p<0,05) розходженням, що спостерігається між тестованим числом плям/ямку (spw) і фоном (необроблений контроль, середовище). Пептид N66D/T70S/V71A у 6 % донорів індукував позитивну відповідь в аналізі на IL-2 ELISpot, а пептид L64A/I65A/V71A індукував позитивні відповіді в 4 % донорів. Ці результати суперечать результатам, що спостерігаються для послідовності дикого типу, де позитивні відповіді в аналізі на IL-2 ELISpot були зареєстровані в 20 % донорів у групі. Середня величина позитивних Т-клітинних відповідей для обох деімунізованих пептидів була низькою і становила 2,02 і 2,43 (таблиця 25), відповідно, і ця величина була аналогічна величині, отриманій для пептиду дикого типу. У таблиці 25 представлені систематизовані величини (±SD) позитивних Т-клітинних відповідей відносно секреції IL-2 (SI≥2,00, p<0,05) для тестованих пептидів і для KLH. Середню величину SI обчислювали виходячи із середніх значень для всіх донорів, що спостерігаються, з позитивними відповідями. Ці дані включають граничні проліферативні відповіді (SI≥1,90, p<0,05).

Таблиця 25

Зразок	Середнє SI	SD (порівн. кв. відх.)	% відповіді
Дикого типу	2,25	0,38	20
N66D/T70S/V71A	2,02	0,15	6
L64A/I65A/V71A	2,43	0,19	4
KLH-контроль	4,14	2,02	96

Для двох тестованих пептидів загальна кореляція між даними аналізу на проліферацію і на IL-2 ELISpot™ була високою і мала місце в 100 % і 67 % донорів, що позитивно відповідають в аналізі на проліферації, а також в аналізі на IL-2 ELISpot. Така висока кореляція між двома аналізами також спостерігалася у випадку KLH-контролю по відтворюваності аналізу, де в 98 % донорів, що відповідають в аналізі на проліферацію, також спостерігалися відповіді в аналізі на IL-2 ELISpot™ (звичайно в межах 85-100 % для Т-клітинного аналізу EpiScreen™ залежно від

часу). Таким чином, в аналізах на проліферацію і на IL-2 ELISpot™, частота і величини Т-клітинних відповідей для пептидів N66D/T70S/V71A і L64A/I65A/V71A дають підставу припустити, що вони можуть розглядатися як низький потенціал клінічної імуногенності в порівнянні з високим ризиком клінічної імуногенності у випадку використання пептиду дикого типу.

Дані аналізу на проліферацію й аналізу на IL-2 ELISpot показали, що позитивні Т-клітинні відповіді детектувались у випадку тестованих пептидів у ряду донорів. Загальна кореляція між даними аналізу на проліферацію і на IL-2 ELISpot™ становила 98 % для KLH, 70 % для пептиду дикого типу і 100 % і 67 % для N66D/T70S/V74A і L64A/I65A/V74A, відповідно. Тому донори, які відповідають, були визначені як донори, у яких вироблялася позитивна відповідь на кожен зразок в аналізах на IL-2 ELISpot™ і на проліферацію. У всіх донорів продукувалася позитивна Т-клітинна відповідь на PHA, що вказувало на те, що клітини в культурах ex vivo були функціональними. Аналіз об'єднаних наборів даних, отриманих при проведенні цих двох аналізів, показав, що загальна частота і величини відповідей в аналізах і на проліферацію, і в аналізах ELISpot™ є низькими для двох деімунізованих пептидів у 4 % донорів, що відповідають на N66D/T70S/V71A і L64A/I65A/V71A. Ці результати відрізняються від результатів, отриманих у випадку пептиду дикого типу (який давав значно більш високе число позитивних відповідей (у 14 % донорів, що відповідають в аналізах на IL-2 ELISpot і на проліферацію)). HLA-аналіз не проводили, оскільки відповіді на два тестовані пептиди були нижчі мінімального граничного значення для аналізу цього типу.

У цілому, Т-клітинний аналіз EpiScreen™ залежно від часу проводили для визначення потенційної клінічної імуногенності для двох тестованих пептидів. Здатність пептидів індукувати $CD4^+$-Т-клітинні відповіді, оцінені в аналізі на проліферацію і на IL-2 ELISpot, тестували для групи з 50 HLA-типованих донорів. Дані, отримані в дослідженні пептиду дикого типу, показали, що загальний ризик виробляння імуногенності, у випадку використання пептиду дикого типу, був помірним, оскільки загальна частота проліферативних відповідей і IL-2-відповідей спостерігалася в 14 % донорів, що беруть участь у дослідженні. Однак загальна частота проліферативних відповідей і IL-2-відповідей на два деімунізованих пептиди в цьому дослідженні була низькою і спостерігалася в 4 % донорів, що відповідають на N66D/T70S/V71A, і в 6 % донорів, що відповідають на L64A/I65A/V71A.

Т-клітинні аналізи EpiScreen™ залежно від часу для множини комерційних біологічних препаратів указували на явну кореляцію між відсотками Т-клітинних відповідей у донорів в аналізі EpiScreen™ і рівнем імуногенності (гуморальних відповідей, тобто, виробляння терапевтичного антитіла проти білка), що спостерігається в клінічних умовах. Висока частота відповідей у донорів спостерігалася в аналізах EpiScreen™ на імуногенні антитіла, такі як Campath, тоді як відносно низька частота відповідей у донорів спостерігалася для неімуногенних антитіл, таких як ксолаїр і герцептин. Загалом, терапевтичні білки, індукуючі >10 % позитивних відповідей в аналізі EpiScreen™, асоціювалися з високим ризиком імуногенності в клінічних умовах. Ці дані показали, що в порівнянні з терапевтичними білками, протестованими в аналізах EpiScreen™, деімунізовані пептиди N66D/T70S/V71A і L64A/I65A/V71A давали $CD4^+$-Т-клітинні відповіді, що входили в той же інтервал рівнів відповідей, продукованих антитілами ксолаїром (Xolair), герцептином (Herceptin) і авастином (Avastin), а тому вони повинні розглядатися як пептиди з низьким ризиком імуногенності. Таким чином, можна зробити висновок, що деімунізовані пептиди мали сприятливий профіль імуногенності в аналізі на імуногенність EpiScreen™

6.23. Поліпшені фармакокінетичні властивості ABD-DART in vivo

Як обговорювалося вище, альбумін-зв'язувальний домен (ABD) стрептококового G-білка був приєднаний до С-кінця DART (на відстані від антигензв'язувальних сайтів) ("ABD-DART") з метою поліпшення фармакокінетичних властивостей DART in vivo. Фармакокінетичні дослідження таких ABD-DART виявили, що вони мають більш тривалий час напівжиття в кровотоці, що становить 35,1 години, тоді як кінцевий час напівжиття звичайних DART (без ABD) у кровотоці становив 1,2 години. Аналіз in silico виявив, що мається п'ять положень якоря p1 у послідовності ABD, у яких існує висока імовірність зв'язування з MHC класу II. Для продукування деімунізованого варіанта ABD були введені мутації методом сайт-направленого мутагенезу, проведеного на основі передвіщених даних, отриманих в аналізі in silico. Після проведення декількох раундів введення однієї мутації і комбінації цих мутацій були отримані два варіанти ABD, "ABD (AAA)» і "ABD (DSA)», що мають афінність зв'язування із сироватковим альбуміном, аналогічну афінності зв'язування ABD дикого типу із сироватковим альбуміном, або більш низьку афінність такого зв'язування.

L64A/I65A/V71A («ABD (AAA)») (SEQ ID NO: 328):

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKN$\underline{A}_{64}\underline{A}_{65}$NNAKT $\underline{A}_{71}$EGVKALIDE ILAALP

N66D/T70S/V71A («ABD (DSA)») (SEQ ID NO: 329):

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLI$\underline{D}_{66}$NAKS_{70} $\underline{A}_{71}$EGVKALIDE ILAALP

Ці два варіанти давали найнижчу оцінку рівня зв'язування з пептидами MHC класу II (таблиця 26).

Таблиця 26

In silico аналіз комбінацій мутацій										
Комбінація мутацій	AA60		AA61		AA64		AA65		AA71	
	Lig.	Score	Lig.	Score	Lig.	Score	Lig.	Score	Lig.	Score
Дикого типу	10	0.6102	12	0.6577	11	0.6067	20	0.6235	8	0.6143
ABD (AAA)	10	0.6102	12	0.6577	0	-	0	-	0	-
ABD (DSA)	2	0.5891	4	0.6120	7	0.6086	2	0.5776	0	-
Lig. = Ліганди **Score** = Бали										

Для оцінки часу напівжиття цих двох варіантів ABD у сироватці було проведено фармакокінетичне дослідження in vivo на мишах C57B1/6, яким вводили одну i.v. ін'єкцію білків у концентрації 5 мг/кг. Фармакокінетичні дослідження показали, що час напівжиття мутантного ABD (DSA) був таким же тривалим, як і час напівжиття ABD дикого типу (фігура 63). Інший мутант, hCD16xhCD32B ABD (AAA) DART, мав на декілька годин більш тривалий час напівжиття в сироватці, ніж вихідний hCD16xhCD32B EK DART. Таким чином, ці дослідження продемонстрували, що, незважаючи на знижену афінність зв'язування з альбуміном, гібрид деімунізованого варіанта ABD (тобто, ABD (DSA)) значно збільшував час напівжиття білків DART у сироватці. Такий збільшений час напівжиття в сироватці дає ті переваги, що цей менш імуногенний ABD-DART може бути використаний як потенційний кандидат на терапевтичний засіб, який, зокрема, може бути введений з меншою частотою і/або в меншій дозі. Фармакокінетичні профілі hCD16xhCD32B ABD DART представлені в таблиці 27.

Таблиця 27

Фармакокінетичні профілі hCD16xhCD32B ABD DART

	EK-DART	ABD	ABD (AAA)	ABD (DSA)
T½ бета (день)	NA	1,1693	0,2388	1,0883
C_{max} (мкг/мл)	60,7800	78,0000	78,3600	94,2100
T_{max} (день)	0,0208	0,0208	0,0208	0,0208
AUC (день·мкг/мл)	30,3900	119,8113	42,5868	118,1240

Пояснення: **T½ бета** (кінцевий час напівжиття); **C_{max}** (максимальна концентрація в сироватці); **T_{max}** (кількість часу, за який досягається максимальна концентрація в сироватці, тобто **C_{max}**); **AUC** (площа під кривою (величина, пропорційна загальній кількості в крові пацієнта)

6.24. Вплив підвищеної валентності ABD на час напівжиття рекомбінантних ABD-DART in vivo

Різні білки ABD DART були сконструйовані або шляхом приєднання ABD до кінця обох ланцюгів (фігура 64A), або шляхом приєднання тандемних ABD до кінця одного ланцюга (фігура 64B). Одна конструкція була також отримана шляхом приєднання ABD (AAA) до C-кінця обох ланцюгів. У цьому дослідженні одержували hCD16xhCD32B Fc DART для порівняння часу

напівжиття в сироватці. Усі ABD-варіанти мали здатність біспецифічни зв'язуватися з обома антигенами (фігура 65). Для визначення часу напівжиття всіх цих ABD DART і Fc DART у сироватці було проведено фармакокінетичне дослідження in vivo на мишах C57B1/6, яким вводили одну внутрішньовенну (i.v.) ін'єкцію вказаних білків у концентрації 5 мг/кг. Отриманий результат показав, що на збільшення часу напівжиття ABD у сироватці впливає валентність зв'язування ABD з альбуміном (фігура 66). Кінцевий час напівжиття молекули DART, приєднаної до двох ABD, несподівано виявився в три рази вищим, ніж час напівжиття DART з одним ABD (таблиця 28).

Таблиця 28

Фармакокінетичні профілі hCD16xhCD32B ABD і Fc-DART

	E ABD/K ABD	E ABD(AAA)/K ABD(AAA)	E ABD-ABD/K	E Fc/ДО
T½ бета (день)	3,55	0,31	2,29	9,02
C_{max} (мкг/мл)	132,20	111,50	130,00	93,97
T_{max} (день)	0,02	0,02	0,02	0,02
AUC (день· мкг/мл)	322,2	66,66	315,4	158,9

Пояснення: **T½ бета** (кінцевий час напівжиття); **C_{max}** (максимальна концентрація в сироватці); **T_{max}** (кількість часу, за який досягається максимальна концентрація в сироватці, тобто **C_{max}**); **AUC** (площа під кривою (величина, пропорційна загальній кількості в крові пацієнта)

Для фахівця в даній галузі очевидно, що в даний винахід можуть бути внесені різні модифікації і зміни, що не виходять за рамки суті й обсягу даного винаходу. Описані тут конкретні варіанти винаходу приводяться лише з метою ілюстрації, і при цьому слід зазначити, що даний винахід обмежений тільки прикладеною формулою винаходу, а також повним обсягом еквівалентів об'єктів заявленого винаходу. Такі модифікації входять в обсяг прикладеної формули винаходу. Усі цитовані тут публікації, патенти і непатентні заявки у всій своїй повноті і у всіх цілях вводяться в даний опис за допомогою посилання, так, ніби кожна публікація, патент або патентна заявка у всій своїй повноті і у всіх цілях були конкретно й окремо включені в опис даної заявки за допомогою посилання.

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> MacroGenics, Inc.
Barat, Bhaswati
Huang, Ling
Johnson, Leslie
Bonvini, Ezio

<120> Домени, які зв'язуються із імунізованою сироваткою, і їхнє застосування для збільшення часу напівжиття в сироватці

<130> 1301.0007P9E

<150> US 61/488,725
<151> 2011-05-21

<160> 329

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 13
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 1

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
1 5 10

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 2

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro
1 5 10

<210> 3
<211> 60
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 3

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys
1 5 10 15

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
20 25 30

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu
35 40 45

Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg

50 55 60

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 4

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser
1 5 10

<210> 5
<211> 217
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 5

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
115 120 125

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 6
<211> 216
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
1 5 10 15

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
20 25 30

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
35 40 45

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
50 55 60

Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln
65 70 75 80

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
85 90 95

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro
100 105 110

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
115 120 125

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

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
145 150 155 160

Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
165 170 175

```
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
            180                 185                 190

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
        195                 200                 205

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    210                 215
```

<210> 7
<211> 217
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 7

```
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1               5                   10                  15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
            20                  25                  30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
        35                  40                  45

Val Asp Gly Val Gln Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Gln
    50                  55                  60

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65                  70                  75                  80

Gln Asn Trp Leu Asp Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
                85                  90                  95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
            100                 105                 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
        115                 120                 125

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145                 150                 155                 160

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
                165                 170                 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
```

```
            180                 185                 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
        195                 200                 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    210                 215


<210>  8
<211>  217
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens

<400>  8

Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1               5                   10                  15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
            20                  25                  30

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
        35                  40                  45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
    50                  55                  60

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65                  70                  75                  80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
                85                  90                  95

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
            100                 105                 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
        115                 120                 125

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145                 150                 155                 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
                165                 170                 175

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
            180                 185                 190
```

```
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
        195                 200                 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
    210                 215


<210>  9
<211>  237
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens

<400>  9

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1               5                   10                  15

Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Arg Thr Ser Glu Ser Ile Gly Thr Asn
            20                  25                  30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Lys Glu Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65                  70                  75                  80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
            100                 105                 110

Gly Gly Gly Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys
        115                 120                 125

Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
    130                 135                 140

Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
145                 150                 155                 160

Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr
                165                 170                 175

Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
            180                 185                 190
```

Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala
195 200 205

Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
210 215 220

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225 230 235

<210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 10

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 11
<211> 244
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 11

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
115 120 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser

130 135 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
145 150 155 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr
165 170 175

Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val
180 185 190

Val Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp
195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr
210 215 220

Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
225 230 235 240

Leu Gly Gly Cys

<210> 12
<211> 240
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 12

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Glu Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

```
Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
        115                 120                 125

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

Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
145                 150                 155                 160

Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr Pro Asn Tyr Asn
                165                 170                 175

Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val Val Ser Thr Ser
            180                 185                 190

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
        195                 200                 205

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp
    210                 215                 220

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225                 230                 235                 240
```

<210> 13
<211> 241
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 13

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
            20                  25                  30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

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

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

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
                85                  90                  95
```

```
Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
            100                 105                 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro
        115                 120                 125

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

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln
145                 150                 155                 160

Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp
                165                 170                 175

Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys
            180                 185                 190

Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro
        195                 200                 205

Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe
    210                 215                 220

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly
225                 230                 235                 240

Cys
```

<210> 14
<211> 470
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 14

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1               5                   10                  15

Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
            20                  25                  30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Lys Glu Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
```

```
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65                  70                  75                  80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
            100                 105                 110

Gly Gly Gly Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys
        115                 120                 125

Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
    130                 135                 140

Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
145                 150                 155                 160

Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr
                165                 170                 175

Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
            180                 185                 190

Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala
        195                 200                 205

Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
    210                 215                 220

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys Val Glu Pro
225                 230                 235                 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
                245                 250                 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
            260                 265                 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
        275                 280                 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
    290                 295                 300

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470


<210>  15
<211>  477
<212>  PRT
<213>  homo sapiens

<400>  15

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
            20                  25                  30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
```

65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
115 120 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
130 135 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
145 150 155 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr
165 170 175

Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val
180 185 190

Val Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp
195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr
210 215 220

Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
225 230 235 240

Leu Gly Gly Cys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
245 250 255

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
260 265 270

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
275 280 285

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
290 295 300

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
305 310 315 320

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu

335 340 345

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
340 345 350

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
355 360 365

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

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
385 390 395 400

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

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
420 425 430

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

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
450 455 460

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470 475

<210> 16
<211> 243
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 16

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Glu Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys
115 120 125

Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
130 135 140

Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
145 150 155 160

Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr
165 170 175

Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
180 185 190

Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala
195 200 205

Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
210 215 220

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys Phe Asn Arg
225 230 235 240

Gly Glu Cys

<210> 17
<211> 10
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Лінкер + С-кінець легкого ланцюга IgG каппа

<400> 17

Leu Gly Gly Cys Phe Asn Arg Gly Glu Cys
1 5 10

<210> 18
<211> 477
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 18

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
115 120 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
130 135 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
145 150 155 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr
165 170 175

Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val
180 185 190

Val Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp
195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr
210 215 220

Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
225 230 235 240

Leu Gly Gly Cys Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys

```
                245                 250                 255

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
            260                 265                 270

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
        275                 280                 285

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
    290                 295                 300

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
305                 310                 315                 320

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
                325                 330                 335

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
            340                 345                 350

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
        355                 360                 365

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

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
385                 390                 395                 400

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

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
            420                 425                 430

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

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
    450                 455                 460

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470                 475
```

<210> 19
<211> 485
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 19

Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
20 25 30

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
35 40 45

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
50 55 60

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
65 70 75 80

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
85 90 95

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
100 105 110

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
115 120 125

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
130 135 140

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
145 150 155 160

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
165 170 175

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
180 185 190

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
195 200 205

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
210 215 220

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
225 230 235 240

Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
245 250 255

```
Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe
            260                 265                 270

Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
        275                 280                 285

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro
    290                 295                 300

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
305                 310                 315                 320

Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser
                325                 330                 335

Asn Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            340                 345                 350

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
        355                 360                 365

Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
    370                 375                 380

Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala
385                 390                 395                 400

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr
                405                 410                 415

Tyr Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val
            420                 425                 430

Val Val Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser
        435                 440                 445

Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr
    450                 455                 460

Tyr Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
465                 470                 475                 480

Ser Leu Gly Gly Cys
                485
```

<210> 20
<211> 469

<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 30

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
115 120 125

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
210 215 220

Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
225 230 235 240

Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe
245 250 255

Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
260 265 270

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro
275 280 285

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
290 295 300

Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser
305 310 315 320

Asn Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
325 330 335

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
340 345 350

Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
355 360 365

Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala
370 375 380

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr
385 390 395 400

Tyr Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val
405 410 415

Val Val Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser
420 425 430

Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr
435 440 445

Tyr Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
450 455 460

Ser Leu Gly Gly Cys
465

<210> 21
<211> 466
<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 21

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1               5                  10                  15

Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
            20                  25                  30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Lys Glu Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65                  70                  75                  80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
            100                 105                 110

Gly Gly Gly Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys
        115                 120                 125

Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
    130                 135                 140

Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
145                 150                 155                 160

Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr
                165                 170                 175

Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
            180                 185                 190

Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala
        195                 200                 205

Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
    210                 215                 220

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
225                 230                 235                 240
```

```
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
                245                 250                 255

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
            260                 265                 270

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
        275                 280                 285

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
    290                 295                 300

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
305                 310                 315                 320

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
                325                 330                 335

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
            340                 345                 350

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

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

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
385                 390                 395                 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
                405                 410                 415

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
        435                 440                 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
    450                 455                 460

Gly Lys
465
```

<210> 32
<211> 246
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 22

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
            20                  25                  30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Pro Pro
        35                  40                  45

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

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

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
                85                  90                  95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
            100                 105                 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
        115                 120                 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
    130                 135                 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
145                 150                 155                 160

Gly Gln Cys Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr
                165                 170                 175

Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val
            180                 185                 190

Val Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp
        195                 200                 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr
    210                 215                 220

Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
225                 230                 235                 240

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
```

245

<210> 23
<211> 6
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 33

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
1 5

<210> 24
<211> 5
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR1 варіабельної області важкого ланцюга 2B6

<400> 34

Asn Tyr Trp Ile His
1 5

<210> 25
<211> 5
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR1 варіабельної області важкого ланцюга 3H7

<400> 25

Asp Ala Trp Met Asp
1 5

<210> 26
<211> 17
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR2 варіабельної області важкого ланцюга 2B6

<400> 26

Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 27
<211> 19
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR2 варіабельної області важкого ланцюга 3H7

<400> 27

Glu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Asn Leu Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 28
<211> 12
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR3 варіабельної області важкого ланцюга 2B6

<400> 28

Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 29
<211> 6
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR3 варіабельної області важкого ланцюга 3H7

<400> 29

Tyr Ser Pro Phe Ala Tyr
1 5

<210> 30
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR1 варіабельної області легкого ланцюга 2B6

<400> 30

Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
1 5 10

<210> 31
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR1 варіабельної області легкого ланцюга 3H7

<400> 31

Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr Leu Ser
1 5 10

<210> 32
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR2 варіабельної області легкого ланцюга 286

<400> 32

Asn Val Ser Glu Ser Ile Ser
1 5

<210> 33
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR2 варіабельної області легкого ланцюга 286

<400> 33

Tyr Val Ser Glu Ser Ile Ser
1 5

<210> 34
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR2 варіабельної області легкого ланцюга 286

<400> 34

Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
1 5

<210> 35
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR2 варіабельної області легкого ланцюга 287

<400> 35

Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser
1 5

<210> 36

<211> 9
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR3 варіабельної області легкого ланцюга 3B6

<400> 36

Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe Thr
1 5

<210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR3 варіабельної області легкого ланцюга 3H7

<400> 37

Leu Gln Tyr Val Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 38
<211> 121
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Варіабельна область важкого ланцюга 3B6

<400> 38

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

```
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  39
<211>  107
<212>  PRT
<213>  Штучна послідовність

<220>
<223>  Hu2B6VL-1 варіабельної області легкого ланцюга 2B6

<400>  39

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1               5                  10                  15


Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
            20                  25                  30


Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45


Lys Asn Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60


Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65                  70                  75                  80


Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
                85                  90                  95


Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105


<210>  40
<211>  107
<212>  PRT
<213>  Штучна послідовність

<220>
<223>  Hu2B6VL-2 Варіабельна область легкого ланцюга гуманізованого
       2B6

<400>  40

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1               5                  10                  15


Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
            20                  25                  30


Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45
```

```
Lys Tyr Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65                  70                  75                  80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 41
<211> 107
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Hu2B6VL-3 Варіабельна область легкого ланцюга гуманізованого 2B6

<400> 41

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1               5                   10                  15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
            20                  25                  30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65                  70                  75                  80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 42
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 42

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

Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr
            20                  25                  30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Arg Arg Leu Ile
        35                  40                  45

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

Ser Trp Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Val Ser Tyr Pro Tyr
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 43
<211> 9
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> IgG-зв'язувальний сайт рецептора FcγRIIB

<400> 43

```
Lys Lys Phe Ser Arg Ser Asp Pro Asn
1               5
```

<210> 44
<211> 9
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> IgG-зв'язувальний сайт рецептора FcγRIIB

<400> 44

```
Gln Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Asn
1               5
```

<210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> IgG-зв'язувальний сайт рецептора FcγRIIB

<400> 45

Gln Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Thr
1 5

<210> 46
<211> 9
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> IgG-зв'язувальний сайт рецептора FcγRIIB

<400> 46

Lys Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Thr
1 5

<210> 47
<211> 9
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> IgG-зв'язувальний сайт рецептора FcγRIIB

<400> 47

Gln Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr
1 5

<210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> IgG-зв'язувальний сайт рецептора FcγRIIB

<400> 48

Lys Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr
1 5

<210> 49
<211> 9
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> IgG-зв'язувальний сайт рецептора FcγRIIB

<400> 49

Gln Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Asn
1 5

<210> 50
<211> 9
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> IgG-зв'язувальний сайт рецептора FcγRIIB

<400> 50

Lys Lys Phe Ser Arg Ser Asp Pro Asn
1 5

<210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> IgG-зв'язувальний сайт рецептора FcγRIIB

<400> 51

Gln Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Thr
1 5

<210> 52
<211> 9
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> IgG-зв'язувальний сайт рецептора FcγRIIB

<400> 52

Gln Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr
1 5

<210> 53
<211> 9
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> IgG-зв'язувальний сайт рецептора FcγRIIB

<400> 53

Lys Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro Thr
1 5

<210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> IgG-зв'язувальний сайт рецептора FcγRIIB

<400> 54

Lys Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr
1 5

<210> 55
<211> 36
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Праймер Lgh321F

<400> 55
cgagctagct ctagatgaga tcacagttct ctctac 36

<210> 56
<211> 47
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Праймер Lgh318R

<400> 56
gctccgcct ccggatccgc ctcctttgat ctccaccttg gtccctc 47

<210> 57
<211> 47
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Праймер Lgh319F

<400> 57
ggaggcggat ccggaggcgg aggccaggtt cagctggtgc agtctgg 47

<210> 58
<211> 43
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Праймер Lgh320R

<400> 58
tttgaattct agcagcctcc cagtgaggag acggtgaccg tgg 43

<210> 59
<211> 46
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Праймер Lgh315R

<400> 59

gcctccgcct ccggatccgc ctccttgat ctcaagcttg gtccc 46

<210> 60
<211> 48
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Праймер Lgh316F

<400> 60
gyaggcggat ccggaggcgg aggccaggtt accctgagag agtctggc 48

<210> 61
<211> 47
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Праймер Lgh317R

<400> 61
tttgaattcc tagcaggctc ccagtgagct cacagtgacc agagtcc 47

<210> 62
<211> 27
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Праймер Lgh339R

<400> 62
ctcaacgcag cctcccagtg agctcac 27

<210> 63
<211> 31
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Праймер Lgh340R

<400> 63
aacgcagcct cccagtgagg agacggtgac c 31

<210> 64
<211> 37
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Праймер Lgh366R

<400> 64
tttgaattct atttacccgg agacagg 37

<210> 65
<211> 33

<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Праймер Lhg367F

<400> 65
ctgggaggct gcgcagagcc caaatcttgt gac 33

<210> 66
<211> 33
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Праймер Lgh368R

<400> 66
gtcacaagat ttgggctctg cgcagcctcc cag 33

<210> 67
<211> 50
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Праймер Lgh369R

<400> 67
tttgaattct aacaccctcc cctgttgaag cagcctccca gtgaggagac 50

<210> 68
<211> 118
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Варіабельна область важкого ланцюга гуманізованого анти-CD16 антитіла Hu3G8VH-1

<400> 68

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 69
<211> 118
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Варіабельна область важкого ланцюга гуманізованого анти-CD16A антитіла Hu3G8VH-5

<400> 69

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 70
<211> 117
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Варіабельна область важкого ланцюга гуманізованого анти-CD16A антитіла Hu3G8VH-22

<400> 70

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Val Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ile Asn Pro Ala Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser
115

<210> 71
<211> 111
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Варіабельна область легкого ланцюга гуманізованого анти-CD16A антитіла Hu3G8VL-1

<400> 71

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 72
<211> 111
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Варіабельна область легкого ланцюга гуманізованого анти-CD16A антитіла Hu3G8VL-43

<400> 72

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Ser Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 73
<211> 111
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Варіабельна область легкого ланцюга гуманізованого анти-CD16A антитіла Hu3G8VL-43

<400> 73

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Ser Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 74
<211> 24
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Послідовність ДНК SEQ ID NO:10

<400> 74
ggaggcggat ccggaggcgg aggc 24

<210> 75
<211> 18
<212> ДНК
<213> homo sapiens

<400> 75
ttcaacaggg gagagtgt 18

<210> 76
<211> 30
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Лінкер + С-кінець людського ланцюга IgG каппа

<400> 76
ctgggaggct gttcaacag gggagagtgt 30

<210> 77
<211> 6
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 77

Val Glu Pro Lys Ser Cys
1 5

<210> 78
<211> 18
<212> DNA
<213> homo sapiens

<400> 78
gtgagccca aatcttgt 18

<210> 79
<211> 118
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 79

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Arg Thr Ser
20 25 30

Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val
65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 80
<211> 354
<212> DNA
<213> homo sapiens

<400> 80
caggttscac tgmaagagtc tggcctgygg stattgcagc cctcccagac catcagtctg 60

actgttctct tctctgggtt ttcactgagg actttgggta tgggtgtagg ctggattcgt 120

cagccttcag ggaagggtct agagtggctg gcacacattt ggtgggatga tgacaagcgc 180

tataatccag ccctgaagag ccgactgaca atctccaagg atacctccag caaccaggta 240

ttcctcaaaa tcgccagtgt ggacactgcc gatactgcca catactactg tgctcaaata 300

aaccccgcct ggtttgctta ctggggccaa gggactctgg tcactgtgag ctca 354

<210> 81
<211> 354
<212> DNA
<213> homo sapiens

<400> 81
caggttaccc tgagagagtc tggccctgcg ctggtgaagc ccacacagac cctcacactg 60

acttgtacct tctctgggtt ttcactgagc acttctggta tgggtgtagg ctggattcgt 120

cagcctccag ggaaggctct agagtggctg gcacacattt ggtgggatga tgacaagcgc 180

tataatccag ccctgaagag ccgactgaca atctccaagg atacctccaa aaaccaggta 240

gtcctcacaa tgaccaacat ggaccctgtg gatactgcca catactactg tgctcaaata 300

aaccccgcct ggtttgctta ctggggccaa gggactctgg tcactgtgag ctca 354

<210> 82
<211> 111
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 82

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 83

<211> 333
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 83
gacactgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60

atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac 120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct 180

gggatcccag ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240

cctgtggagg aggaggatac tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac 300

acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaa 333

<210> 84
<211> 332
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Варіабельна область легкого ланцюга гуманізованого анти-CD16 антитіла Hu3G8VL-1

<400> 84
gacatcgtga tgacccaatc tccagacttt ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc 60

atcaactgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac 120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct 180

ggggtcccag acaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcagc 240

agcctgcagg ctgaggatgt ggcagtttat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac 300

acgttcggac aggggaccaa gcttgagatc aa 332

<210> 85
<211> 121
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Варіабельна область важкого ланцюга гуманізованого 2B6

<400> 85

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 86
<211> 363
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Варіабельна область важкого ланцюга гуманізованого 2В6

<400> 86
caggttcagc tggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttctggtta cacctttacc aactactgga tacactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gattggagtg attgatcctt ctgatactta tcaaaattac 180

aataaaaagt tcaagggcag agtcaccatg accgtagtcg tatccacgag cacagcctac 240

atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagaaacggt 300

gattccgatt attactctgg tatggactac tggggccaag gaccacggt caccgtctcc 360

tca 363

<210> 87
<211> 111
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Варіабельна область легкого ланцюга гуманізованого 2В6

<400> 87

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 88
<211> 321
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Варіабельна область легкого ланцюга гуманізованого 286

<400> 88
gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc 60

ttcacctgca ggaccagtca gagcattggc acaacatac actggtacca gcagaaacca 120

gatcagtctc caaagctcct catcaaggag gtttctgagt ctatctctgg agtcccatcg 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaccctca ccatcaatag cctggaagct 240

gaagatgctg caacgtatta ctgtcaacaa agtaatacct ggccgttcac gttcggcgga 300

gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 89
<211> 6
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Сайт розпізнавання і розщеплення тромбіном

<400> 89

Leu Val Pro Arg Gly Ser
1 5

<210> 90
<211> 4
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Сайт розпізнавання і розщеплення фактором Xa

<220>
<221> VARIANT

<223> (2)..(2)
<223> Xaa=Glu або Asp

<400> 90

Ile Xaa Gly Arg
1

<210> 91
<211> 5
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Сайт розпізнавання і розщеплення ентерокіназою

<400> 91

Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 92
<211> 4
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Сайт розпізнавання і розщеплення фурином

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (2)..(3)
<223> Xaa=будь-яка амінокислота

<400> 92

Arg Xaa Xaa Arg
1

<210> 93
<211> 4
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Перевжний сайт розпізнавання і розщеплення фурином

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (2)..(2)
<223> Xaa=будь-яка амінокислота

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> (3)..(3)
<223> Xaa=Lys або Arg

<400> 93

Arg Xaa Xaa Arg
1

<210> 94
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Сайт розпізнавання і розщеплення AcTEV

<400> 94

Gln Asn Leu Tyr Phe Gln Gly
1 5

<210> 95
<211> 487
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Ковалентно зв'язаний полікротеїновий попередник диантигіла

<400> 95

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser
130 135 140

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro

145 150 155 160

Thr Thr Gly Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Tyr Asp Gly Gly Asp
165 170 175

Thr His Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
180 185 190

Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu
195 200 205

Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Thr Glu Thr Thr Gly Ile Pro Thr
210 215 220

Gly Val Met Asp Ala Trp Gly Gln Gly Val Ser Val Thr Val Ser Ser
225 230 235 240

Leu Gly Gly Cys Gly Gly Arg Ala Lys Arg Asp Val Gln Met Thr Gln
245 250 255

Ser Pro Ser Asn Leu Ala Ala Ser Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Asn
260 265 270

Cys Lys Ala Ser Glu Ser Ile Ser Lys Tyr Leu Ala Trp Tyr Leu Gln
275 280 285

Lys Pro Gly Lys Ala Asn Lys Leu Leu Met Tyr Asp Gly Ser Thr Leu
290 295 300

Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
305 310 315 320

Phe Thr Leu Thr Ile Arg Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Gly Leu Tyr
325 330 335

Tyr Cys Gln Gln His Tyr Glu Tyr Pro Ala Thr Phe Gly Ser Gly Thr
340 345 350

Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Thr
355 360 365

Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln Thr Leu Ser
370 375 380

Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Arg Thr Ser Gly Met Gly
385 390 395 400

Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala

405 410 415

His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser
420 425 430

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

Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
450 455 460

Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
465 470 475 480

Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
485

<210> 96
<211> 1464
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність ДНК SEQ ID NO:97 (яка кодує ковалентно зв'язаний поліпрогеїновий попередник домагріла)

<400> 96
gacactgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60

atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac 120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct 180

gggatcccag ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240

cctgtggagg aggaggatac tgcaacctat tactgtccag caagtaatga ggatccgtac 300

acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaaggaggcg gatccggagg cggaggcgag 360

gtggagctag tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gaaggtccct gaaactctcg 420

tgtgcagcct caggattcac tttcagtgac tattacatgg cctgggtccg gcaggctcca 480

acgacgggtc tggagtgggt cgcatccatt agttatgatg gtggtgacac tcactatcga 540

gactccgtga agggccgatt taccatttcc agagataatg caaaaagcag cctatacctg 600

caaatggaca gtctgaggtc tgaggacacg gccacttatt actgtgcaac agagactacg 660

ggaatacctt caggtgttat ggatgcctgg ggtcaaggag tttcagtcac tgtctcctca 720

ctgggaggct gaggcgggag agctaagagg gatgtccaga tgacccagtc tccatctaat 780

cttgctgcct ctcctggaga aagtgtttcc atcaattgca aggcaagtga gagcattagc 840

aagtatttag cctggtatca acagaaacct gggaaagcaa ataagcttcc tatgtacgat 900

gggtcaactt tgcaatctgg aattccatcg aggttcagtg gcagtggatc tggtacagat 960

ttcactctca ccatcagaag cctggagcct gaagattttg gactttatta ctgtcaacag 1020

cattatgaat atccagccac gttcggttcc gggaccaagc tggagatcaa aggaggcgga 1080

tcgggaggcg gaggccaggt tacgctgaaa gagtctggcc ctgggatatt gcagccctcc 1140

cagaccctca gtctgacttg ttctttctct gggttttcac tgaggactic tggtatgggt 1200

gtaggctgga ttcgtcagcc ttcagggaag ggtctagagt ggctggcaca catttggtgg 1260

gatgatgaca agcgctataa tccagccctg aagagccgac tgacaatctc caaggatacc 1320

tccagcaacc aggtattcct caaaatcgcc agtgtggaca ctgcagatac tgccacatac 1380

tactgtgctc aaatagaccc cgcctggttt gcttactggg gccaagggac tctggtcact 1440

gtgagctcac tgggaggctg ctag 1464

<210> 97
<211> 511
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Ковалентно зв'язаний поліпротеїновий попередник ламантиліна

<400> 97

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly
115 120 125

```
Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser
    130                 135                 140

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro
145                 150                 155                 160

Thr Thr Gly Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Tyr Asp Gly Gly Asp
                165                 170                 175

Thr His Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
            180                 185                 190

Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu
        195                 200                 205

Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Thr Glu Thr Thr Gly Ile Pro Thr
    210                 215                 220

Gly Val Met Asp Ala Trp Gly Gln Gly Val Ser Val Thr Val Ser Ser
225                 230                 235                 240

Leu Gly Gly Cys Gly Gly Arg Ala Lys Arg Ala Pro Val Lys Gln Thr
                245                 250                 255

Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro
            260                 265                 270

Gly Pro Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Asn Leu Ala Ala Ser
        275                 280                 285

Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Asn Cys Lys Ala Ser Glu Ser Ile Ser
    290                 295                 300

Lys Tyr Leu Ala Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Lys Ala Asn Lys Leu
305                 310                 315                 320

Leu Met Tyr Asp Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe
                325                 330                 335

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Arg Ser Leu
            340                 345                 350

Glu Pro Glu Asp Phe Gly Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Glu Tyr
        355                 360                 365

Pro Ala Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly
    370                 375                 380
```

```
Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile
385                 390                 395                 400

Leu Gln Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe
                405                 410                 415

Ser Leu Arg Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser
            420                 425                 430

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys
        435                 440                 445

Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr
    450                 455                 460

Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp
465                 470                 475                 480

Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr
                485                 490                 495

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
            500                 505                 510
```

<210> 98
<211> 1536
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність ДНК SEQ ID NO:99 (яка кодує ковалентно зв'язаний поліпротеїновий попередник жанітуміла)

<400> 98

```
gacactgtgc tgacccaatc tccagctttc ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc       60

atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagtttcat gaactggtac      120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct      180

gggatccctg ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat      240

cctgtggagg aggaggatac tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac      300

acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaaggaggcg gatccggagg cggaggcgag      360

gtggagctag tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gaaggtccct gaaactctcc      420

tgtgcagcct caggattcac tttcagtgac tattacatgg cctgggtccg ccaggctcca      480

acgaagggtc tggagtgggt cgcatccatt agttatgatg gtggtgacac ttactatcga      540

gactccgtga agggccgatt caccatttcc agagataatg caaaaagcag cctatacctg      600
```

caaatggaca gtctgaggtc tgaggacacg gccacttatt actgtgcaac agagactacg 660

ggaataccta caggtgttat ggatgcctgg ggtcaaggag tttcagtcac tgtctcctca 720

ctgggaggct gcggcgggag agctaagagg gcccctgtga agcagaccct gaacttcgac 780

ctgctgaagc tggcggggaga cgtggagagc aaccccgggcc ccgatgtcca gatgaccctag 840

tctccatcta atcttgctgc ctctcctgga gaaagtgttt ccatcaattg caaggcaagt 900

gagagcatta gcaagtattt agcctggtat ctacagaaac ctgggaaagc aaataagctt 960

cttatgtacg atgggtcaac tttgcaatct ggaattccat cgaggttcag tggcagtgga 1020

tctggtacag atttcactct caccatcaga agcctggagc ctgaagattt tggactctat 1080

tactgtcaac agcattatga atatccagcc acgttcggtt ctgggaccaa gctggagatc 1140

aaaggaggcg gatccggagg cggaggctcag gttacactga aagagtctgg ccctgggata 1200

ttgcagccct cccagaccct cagtctgact tgttctttct ctgggtttte actgaggact 1260

tctggtatgg gtgtaggctg gattcgtcag ccttcaggga agggtctaga gtggctggca 1320

cacatttggt gggatgatga caagcgctat aatccagccc tgaagagccg actgacaatc 1380

tccaaggata cctccagcaa ccaggtattc ctcaaaatcg ccagtgtgga cactgcagat 1440

actgccacat actactgtgc tcaaataaac ccgcctggt ttgcttactg gggccaaggg 1500

actctggtca ctgtgagctc actgggaggc tgrtag 1536

<210> 99
<211> 339
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 99

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Glu Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
85 90 95

```
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
            100                 105                 110

Gly Gly Gly Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys
        115                 120                 125

Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
    130                 135                 140

Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
145                 150                 155                 160

Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr
                165                 170                 175

Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
            180                 185                 190

Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala
        195                 200                 205

Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
    210                 215                 220

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235
```

<210> 100
<211> 720
<212> DNA
<213> homo sapiens

<400> 100

```
gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc      60

ttcacctgca ggaccagtca gagcattggc acaaacatac actggtacca gcagaaacca     120

gatcagtctc caaagctcct catcaaggag gtttctgagt ctatctctgg agtcccatcg     180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaccctca ccatcaatag cctggaagct     240

gaagatgctg caacgtatta ctgtcaacaa agtaatacct ggccgttcac gttcggcgga     300

gggaccaagg tggagatcaa acggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt tacactgaga     360

gagtctggcc ctgcgctggt gaagcccaca cagaccctca cactgacttg taccttctct     420

gggttttcac tgagcacttc tggtatgggt gtaggctgga ttcgtcagcc tccagggaag     480

gctctagagt ggctggcaca catttggtgg gatgatgaca agcgctataa tccagccctg     540

aagagccgac tgacaatctc caaggatacc tccaaaaacc aggtagtcct cacaatgacc     600

aacatggacc ctgtggatac tgccacatac tactgtgctc aaataaacct cgcctggttt     660
```

gcttactggg gccaggggac cctggtcacc gtgagctcat tcaacagggg agagtgttag 720

<210> 101
<211> 246
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 101

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
115 120 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
130 135 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
145 150 155 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr
165 170 175

Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val
180 185 190

Val Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp
195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr
210 215 220

```
Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
225                 230                 235                 240

Val Glu Pro Lys Ser Cys
                245

<210>  102
<211>  741
<212>  DNK
<213>  Homo sapiens

<400>  102
gacatcgtga tgacccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc       60

atcaactgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac      120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct      180

ggggtcccag acaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcagc      240

agcctgcagg ctgaggatgt ggcagtttat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac      300

acgttcggac aggggaccaa gcttgagatc aaaggaggcg gatccggagg cggaggccag      360

gttcagctgg tgcagtctgg agctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc      420

tgcaaggctt ctggttacac ctttaccaac tactggatac actgggtgcg acaggcccct      480

ggacaagggc ttgagtggat tggagtgatt gatccttctg atacttatcc aaattacaat      540

aaaaagttca agggcagagt caccatgacc gtagtcgtat ccacgagcac agcctacatg      600

gagctgagga gcctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgcgag aaacggtgat      660

tccgattatt actctggtat ggaccactgg gggcaaggga ccacggtcac cgtctcctca      720

gttgagccca aatcttgtta g                                                741

<210>  103
<211>  30
<212>  PRT
<213>  Штучна послідовність

<220>
<223>  Послідовності VH, які походять від 3G8 VH FR1

<400>  103

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
1               5                   10                  15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Arg
            20                  25                  30

<210>  104
<211>  30
<212>  PRT
```

<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH FR1

<400> 104

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser
20 25 30

<210> 105
<211> 30
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH FR1

<400> 105

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser
20 25 30

<210> 106
<211> 30
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH FR1

<400> 106

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Arg
20 25 30

<210> 107
<211> 30
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH FR1

<400> 107

Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser
20 25 30

<210> 108
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * CDR1

<400> 108

Thr Ser Gly Met Gly Val Gly
1 5

<210> 109
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * CDR1

<400> 109

Thr Ser Gly Val Gly Val Gly
1 5

<210> 110
<211> 14
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * FR2

<400> 110

Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 111
<211> 14
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * FR2

<400> 111

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 112
<211> 16
<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * CDR2

<400> 112

His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 113
<211> 16
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * CDR2

<400> 113

His Ile Tyr Trp Asn Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 114
<211> 16
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * CDR2

<400> 114

His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 115
<211> 16
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * CDR2

<400> 115

His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 116
<211> 16
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * CDR2

<400> 116

His Ile Trp Trp Asn Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 117
<211> 16
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * CDR2

<400> 117

Leu Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 118
<211> 16
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * CDR2

<400> 118

His Ile Phe Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 119
<211> 16
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * CDR2

<400> 119

Leu Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 120
<211> 16
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * CDR2

<400> 120

His Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 121
<211> 16
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * CDR2

<400> 121

Leu Ile Trp Trp Asn Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 122
<211> 29
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * FR3

<400> 122

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys
1 5 10 15

Ile Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
20 25

<210> 123
<211> 29
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * FR3

<400> 123

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25

<210> 124
<211> 29
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * FR3

<400> 124

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
20 25

<210> 125
<211> 29
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * FR3

<400> 125

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Thr
20 25

<210> 126
<211> 29
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * FR3

<400> 126

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Lys
20 25

<210> 127
<211> 29
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * FR3

<400> 127

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25

<210> 128
<211> 29
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * FR3

<400> 128

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His
20 25

<210> 129
<211> 29
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * FR3

<400> 129

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25

<210> 130
<211> 29
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * FR3

<400> 130

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His
20 25

<210> 131
<211> 29
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * FR3

<400> 131

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
20 25

<210> 132
<211> 29

<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * FR3

<400> 132

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys
1 5 10 15

Ala Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
20 25

<210> 133
<211> 29
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * FR3

<400> 133

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25

<210> 134
<211> 29
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * FR3

<400> 134

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
20 25

<210> 135
<211> 29
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * FR3

<400> 135

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Thr
20 25

<210> 136
<211> 29
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * FR3

<400> 136

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Lys
20 25

<210> 137
<211> 29
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * FR3

<400> 137

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25

<210> 138
<211> 29
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * FR3

<400> 138

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His
20 25

<210> 139
<211> 29
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * FR3

<400> 139

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25

<210> 140
<211> 29
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * FR3

<400> 140

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His
20 25

<210> 141
<211> 29
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * FR3

<400> 141

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Thr Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
20 25

<210> 142
<211> 29
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * FR3

<400> 142

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys
1 5 10 15

Ser Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
20 25

<210> 143
<211> 29
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * FR3

<400> 143

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25

<210> 144
<211> 29
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * FR3

<400> 144

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
20 25

<210> 145
<211> 29
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VK * FR3

<400> 145

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Thr
20 25

<210> 146
<211> 29
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * FR3

<400> 146

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Lys
20 25

<210> 147
<211> 29
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * FR3

<400> 147

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25

<210> 148
<211> 29
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * FR3

<400> 148

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His
20 25

<210> 149
<211> 29
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * FR3

<400> 149

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25

<210> 150
<211> 29
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * FR3

<400> 150

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His
20 25

<210> 151
<211> 29
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * FR3

<400> 151

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Asn Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
20 25

<210> 152
<211> 29
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * FR3

<400> 152

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys
1 5 10 15

Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
20 25

<210> 153
<211> 29
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * FR3

<400> 153

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25

<210> 154
<211> 29
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * FR3

<400> 154

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
20 25

<210> 155
<211> 29
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * FR3

<400> 155

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Thr
20 25

<210> 156
<211> 29
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * FR3

<400> 156

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Lys
20 25

<210> 157
<211> 29
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * FR3

<400> 157

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25

<210> 158
<211> 29
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * FR3

<400> 158

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His
20 25

<210> 159
<211> 29
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * FR3

<400> 159

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25

<210> 160
<211> 29
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * FR3

<400> 160

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His
20 25

<210> 161
<211> 29
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * FR3

<400> 161

Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln
20 25

<210> 162
<211> 8
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * CDR3

<400> 162

Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5

<210> 163
<211> 8
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * CDR3

<400> 163

Ile Asn Pro Ala Trp Phe Asp Tyr
1 5

<210> 164
<211> 8
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * CDR3

<400> 164

Ile Asn Pro Ala Tyr Phe Ala Tyr
1 5

<210> 165
<211> 8
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * CDR3

<400> 165

Ile Asn Pro Ala Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 166
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * FR4

<400> 166

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
1 5 10

<210> 167
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VH, які походять від 3G8 VH * FR4

<400> 167

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 168
<211> 15
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* FR1

<400> 168

Asp Thr Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu
1 5 10 15

<210> 169
<211> 15
<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* FR1

<400> 169

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

<210> 170
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR1

<400> 170

Lys Ala Ser Gln Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 171
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR1

<400> 171

Arg Ala Ser Gln Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 172
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR1

<400> 172

Lys Ser Ser Gln Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 173
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR1

<400> 173

Lys Ala Ser Gln Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn

1 5 10

<210> 174
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR1

<400> 174

Lys Ala Ser Gln Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn
1 5 10

<210> 175
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR1

<400> 175

Lys Ala Ser Gln Asp Gly Asp Ser Phe Met Ala
1 5 10

<210> 176
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR1

<400> 176

Lys Ala Ser Gln Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 177
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR1

<400> 177

Lys Ala Ser Ser Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 178
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR1

<400> 178

Arg Ala Ser Ser Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 179
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR1

<400> 179

Lys Ser Ser Ser Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 180
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR1

<400> 180

Lys Ala Ser Ser Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
1 5 10

<210> 181
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR1

<400> 181

Lys Ala Ser Ser Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn
1 5 10

<210> 182
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR1

<400> 182

Lys Ala Ser Ser Asp Gly Asp Ser Phe Met Ala
1 5 10

<210> 183
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR1

<400> 183

Lys Ala Ser Ser Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 184
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR1

<400> 184

Lys Ala Ser Val Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 185
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR1

<400> 185

Arg Ala Ser Val Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 186
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR1

<400> 186

Lys Ser Ser Val Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 187
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR1

<400> 187

Lys Ala Ser Val Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
1 5 10

<210> 188
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR1

<400> 188

Lys Ala Ser Val Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn
1 5 10

<210> 189
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR1

<400> 189

Lys Ala Ser Val Asp Gly Asp Ser Phe Met Ala
1 5 10

<210> 190
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR1

<400> 190

Lys Ala Ser Val Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 191
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR1

<400> 191

Lys Ala Ser Asp Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 192

<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR1

<400> 192

Arg Ala Ser Asp Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 193
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR1

<400> 193

Lys Ser Ser Asp Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 194
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR1

<400> 194

Lys Ala Ser Asp Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
1 5 10

<210> 195
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR1

<400> 195

Lys Ala Ser Asp Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn
1 5 10

<210> 196
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR1

<400> 196

Lys Ala Ser Asp Asp Gly Asp Ser Phe Met Ala
1 5 10

<210> 197
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR1

<400> 197

Lys Ala Ser Asp Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 198
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR1

<400> 198

Lys Ala Ser Phe Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 199
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR1

<400> 199

Arg Ala Ser Phe Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 200
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR1

<400> 200

Lys Ser Ser Phe Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn
1 5 10

<210> 201
<211> 11
<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR1

<400> 201

Lys Ala Ser Phe Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
1 5 10

<210> 202
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR1

<400> 202

Lys Ala Ser Phe Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn
1 5 10

<210> 203
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR1

<400> 203

Lys Ala Ser Phe Asp Gly Asp Ser Phe Met Ala
1 5 10

<210> 204
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR1

<400> 204

Lys Ala Ser Phe Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 205
<211> 16
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* FR2

<400> 205

Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 206
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR2

<400> 206

Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 207
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR2

<400> 207

Asp Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 208
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR2

<400> 208

Trp Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 209
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR2

<400> 209

Thr Thr Ser Asn Leu Glu Thr
1 5

<210> 210
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR2

<400> 210

Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr
1 5

<210> 211
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR2

<400> 211

Asp Ala Ser Asn Leu Ala Thr
1 5

<210> 212
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR2

<400> 212

Ser Ala Ser Asn Leu Gln Ser
1 5

<210> 213
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR2

<400> 213

Ser Thr Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 214
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR2

<400> 214

Ser Thr Ser Asn Leu Gln Ser
1 5

<210> 215
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G6 VL* CDR2

<400> 215

Thr Thr Ser Asn Leu Gln Ser
1 5

<210> 216
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR2

<400> 216

Thr Thr Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 217
<211> 32
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* FR3

<400> 217

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 218
<211> 32
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* FR3

<400> 218

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 219
<211> 9
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR3

<400> 219

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 220
<211> 9
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR3

<400> 220

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 221
<211> 9
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR3

<400> 221

Gln Gln Ser Tyr Glu Asp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 222
<211> 9
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR3

<400> 222

Gln Gln Ser Asn Ser Asp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 223
<211> 9
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* CDR3

<400> 223

Gln Gln Ser Asn Glu Thr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 224
<211> 10
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* FR4

<400> 224

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 225
<211> 10
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовності VL, які походять від 3G8 VL* FR4

<400> 225

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 226
<211> 714
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> H3G8VL-CB3.1VH

<400> 226
gacatcgtga tgacccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc 60

atcaactgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac 120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct 180

ggggtccctg acaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcagc 240

agcctgcagg ctgaggatgt ggcagtttat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac 300

acgttcggac aggggaccaa gcttgagatc aaagggaggcg gatccggagg cggaggctcg 360

gtccaactgc agcagcctgg ggctgagctg gtgaggcctg gggcttcagt gaagctgtcc 420

tgcaaggctt ctggctacac cttcaccagc tactggatga actgggtgaa gcagaggcct 480

ggacaaggcc ttgaatggat tggtatggtt gatccttcag acagtgaaac tcactacaat 540

caaatgttca aggacaaggc cacattgact gttgacaaat cctccagcac agcctacatg 600

cagctcagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag agctatgggc 660

cactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc tcctcagttg agcccaaatc ttgt 714

<210> 227
<211> 238
<212> PRT
<213> Вгучна поспнозиіся

<220>
<223> H3C8VL-CB3.1VH

<400> 227

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala
115 120 125

Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser
130 135 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro
145 150 155 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Met Val Asp Pro Ser Asp Ser Glu
165 170 175

Thr His Tyr Asn Gln Met Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp
180 185 190

Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu
195 200 205

Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln
210 215 220

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Val Glu Pro Lys Ser Cys
225 230 235

<210> 228
<211> 732
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CB3.1VL-h3G8VH

<400> 228
gatgttgtga tgacccagac tccactcact ttgtcggtta acattggaca accagcctcc 60

atcttgtca agtcaagtca gagcctctta gatactgatg gaaagacata tttgaattgg 120

ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaac cgcctaatct atctggtgtc taaactggac 180

tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc 240

agcagagtgg aggctgagga tttgggaatt tattattgct ggcaaggtac acattttccg 300

ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaaggag gcggatccgg aggcggaggc 360

caggttaccc tgagagagtc tggccctgcg ctggtgaagc ccacacagac cctcacactg 420

acttgtaccc tctctgggtt ttcactgagc acttctggta tgggtgtagg ctggattcgt 480

cagcctcccg ggaaggctct agagtggctg gcacacattt ggtgggatga tgacaagcgc 540

tataatccag ccctgaagag ccgactgaca atctccaagg atacctccaa aaaccaggta 600

gtcctcacaa tgaccaacat ggaccctgtg gatactgcca catactactg tgctcaaata 660

aacccgcct ggtttgctta ctggggccaa gggactctgg tcactgtgag ctcattcaac 720

aggggagagt gt 732

<210> 229
<211> 244
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CB3.1VL-h3G8VH

<400> 229

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Thr
20 25 30

```
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
        35                  40                  45

Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
                85                  90                  95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
            100                 105                 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly
        115                 120                 125

Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe
    130                 135                 140

Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg
145                 150                 155                 160

Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp
                165                 170                 175

Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser
            180                 185                 190

Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp
        195                 200                 205

Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp
    210                 215                 220

Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Phe Asn
225                 230                 235                 240

Arg Gly Glu Cys
```

<210> 230
<211> 702
<212> DNA
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> 885-CB3.1-VEPRSC

<400> 330
gacattcaga tgacacagtc tccatcctcc ctactttgcgg cgctgggaga aagagtcagt 60

ctcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggcttca gcagaaacca 120

gatggaacta ttaaacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccaaaa 180

aggttcagtg gcagtgagtc tgggtcagac tattctctca ccatcagcag tcttgagtct 240

gaagattttg cagactatta ctgtctacaa tatttagtt atccgctcac gttcggtgct 300

gggaccaagc tggagctgaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt ccaactgcag 360

cagcctgggg ctgagctggt gaggcctggg gcttcagtga agctgtcctg caaggcttct 420

ggctacacct tcaccagcta ctggatgaac tgggtgaagc agaggcctgg acaaggcctt 480

gaatggattg gtatggttga tccttcagac agtgaaactc actacaatca aatgttcaag 540

gacaaggcca cattgactgt tgacaaatcc tccagcacag cctacatgca gctcagcagc 600

ctgacatctg aggactctgc ggtctattac tgtgcaagag ctatgggcta ctggggtcaa 660

ggaacctcag tcaccgtctc ctcagttgag cccaaatctt gt 702

<210> 231
<211> 234
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> 885-CB3.1-VEPRSC

<400> 331

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

Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile
35 40 45

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

Ser Glu Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

```
Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg
        115                 120                 125

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

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
145                 150                 155                 160

Glu Trp Ile Gly Met Val Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn
                165                 170                 175

Gln Met Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
            180                 185                 190

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
        195                 200                 205

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
    210                 215                 220

Thr Val Ser Ser Val Glu Pro Lys Ser Cys
225                 230
```

<210> 232
<211> 726
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CB3.1-8B5-FNRGSC

<400> 232
gatgttgtga tgacccagac tccactcact ttgtcggtta acattggaca accagcctcc 60

atcrcttgta agtcaagtca gagcctctta gatactgatg gaaagacata tttgaatttgg 120

ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaac cgcctaatct atctggtgtc taaactggac 180

tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc 240

agcagagtgg aggctgagga tttgggaatt tattattgct ggcaaggtac acattttccg 300

ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaaggag gcggatccgg aggcggaggc 360

gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc catgaaactc 420

tcttgtgaag cctctggatt cactttagt gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct 480

ccagagaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca 540

tactatgctg agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt 600

gcctacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta ctgtggggct 660

ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcagt caacagggga 720

gagtgt 726

<210> 233
<211> 242
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CB3.1-BB5-FNRGEC

<400> 233

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Thr
20 25 30

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

Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Ser Cys Glu Ala
130 135 140

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser
145 150 155 160

Pro Gln Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Asn Lys Ala Lys
165 170 175

Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Ile Gly Arg Phe Thr Ile
180 185 190

Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
195 200 205

Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys Gly Ala Leu Gly Leu Asp
210 215 220

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Phe Asn Arg Gly
225 230 235 240

Glu Cys

<210> 234
<211> 696
<212> DNA
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> 8B5VL-CB3.1VH-LGGC

<400> 234
gacattcaga tgacacagtc tccatcctcc ctacttgcgg cgctgggaga aagagtcagt 60

ctcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggcttca gcagaaacca 120

gatggaacta ttaaacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccaaaa 180

aggttcagtg gcagtgagtc tgggtcagat tatttctctca ccatcagcag tcttgagtct 240

gaagattttg cagactatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggtgct 300

gggaccaagc tggagctgaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt ccaactgcag 360

cagcctgggg ctgagctggt gaggcctggg gcttcagtga agctgtcctg caaggcttct 420

ggctacacct tcaccagcta ctggatgaac tgggtgaagc agaggcctgg acaaggcctt 480

gaatggattg gtatggttga tcttcagac agtgaaactc actacaatca aatgttcaag 540

gacaaggcca cattgactgt tgacaaatcc tccagcacag cctacatgca gctccagcagc 600

ctgacatctg aggactctgc ggtctattac tgtgcaagag ctatgggcta ctggggtcaa 660

ggaacctcag tcaccgtctc ctcactggga ggcvgc 696

<210> 235
<211> 232
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> 8B5VL-CB3.1VH-LGGC

<400> 235

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

```
Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr
            20                  25                  30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile
        35                  40                  45

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

Ser Gln Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Gly Ser Gly
            100                 105                 110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg
        115                 120                 125

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

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
145                 150                 155                 160

Gln Trp Ile Gly Met Val Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn
                165                 170                 175

Gln Met Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
            180                 185                 190

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
        195                 200                 205

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
    210                 215                 220

Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225                 230
```

<210> 236
<211> 739
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CB3.1-8B5-LGGC

<400> 236
gatgttgtga tgacccagac tccactcact ttgtcggtta ccattggacc accagcctcc 60

atctcttgta agtcaagtca gagcctctta gatactgatg gaaagacata tttgaattgg 120

ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaac cgcctaatct atctggtgtc taaactggac 180

tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcagggg cagatttcac actgaaaatc 240

agcagagtgg aggctgagga tttgggaatt tattattgct ggcaaggtac acatttccg 300

ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaaggag gcggatccgg aggcggaggc 360

gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc catgaaactc 420

tcttgtgaag cctctggatt cactttttagt gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct 480

ccagagaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca 540

tactatgctg agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt 600

gtctacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta ctgtgtgggt 660

ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcagc tggaggctgc 720

<210> 237
<211> 240
<212> PRT
<213> Enyema neonipomiera

<220>
<223> CB3.1-8B5-LGGC

<400> 237

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Thr
20 25 30

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

Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Ser Cys Glu Ala
130 135 140

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser
145 150 155 160

Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Asn Lys Ala Lys
165 170 175

Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Ile Gly Arg Phe Thr Ile
180 185 190

Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
195 200 205

Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys Gly Ala Leu Gly Leu Asp
210 215 220

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225 230 235 240

<210> 238
<211> 47
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Lgh628F Праймер

<400> 238
ggaggcggat ccggaggcgg aggccaggtc caactgcagc agcctgg 47

<210> 239
<211> 49
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Lgh628R Праймер

<400> 239
tttgaattct aacaagattt gggctcaact gaggagacgg tgactgagg 49

<210> 240
<211> 45
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Lgh630R Праймер

<400> 240
gcctccgcct ccggatccgc ctccttccag ctccagcttg gtccc 45

<210> 241
<211> 47
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Lgh631F Праймер

<400> 241
ggaggcggat ccggaggcgg aggcgaagtg aagcttgagg agtctgg 47

<210> 242
<211> 49
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Lgh640R Праймер

<400> 242
tttgaattct aacactctcc cctgttgaac gaggagactg tgagagtgg 49

<210> 243
<211> 48
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Lgh644R Праймер

<400> 243
tttgtcgtca tcatcgtctt tgtagtcgga gtggacacct gtggagag 48

<210> 244
<211> 42
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Lgh646R Праймер

<400> 244
tttgaattct agcagccgcc cagtgaggag acggtgactg ag 42

<210> 245
<211> 45
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Lgh647F Праймер

<400> 245
casagacgat gatgacgaca aagacattca gatgacacag tctcc 45

<210> 246
<211> 43
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Lgh648R Праймер

<400> 246
ttcgaattcc agcagcctcc cagcgaggag actgtgagag tgg 43

<210> 247
<211> 1044
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> 2.4G2-3G8-hKappa

<400> 247
gatgttccaga tgacccagtc tccatctaat cttgctgcct ctcctggaga aagtgtttcc 60

atcaattgca aggcaagtga gagcattagc aaatatttag cctggtatct acagaaacct 120

gggaaagcaa ataagcttct tatgtacgat gggtccaactt tgcaatctgg aattccatcg 180

aggttcagtg gcagtggatc tggtacagat ttcactctca ccatcagaag cctggagcct 240

gaagattttg gactctatta ctgtcaacag cattatgaat atccagccac gttcggttct 300

ggaccaagc tggagatcaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt tacccctgaaa 360

gagtctggcc ctgggatatt gcagcccctcc cagaccctca gtctgacttg ttctttctct 420

gggttttcac tgaggacttc tggtatgggt gtaggctgga ttcgtcagcc ttcagggaag 480

ggtctagagt ggctggcaca catttggtgg gatgatgaca agcgctataa tccagccctg 540

aagagccgac tgacaatctc caaggatacc tccagcaacc aggtattcct caaaatcgcc 600

agtgtggaca ctgcagatac tgccacatac tactgtgctc aaataaaccc cgcctggttt 660

gcttactggg gccaagggac tctggtcact gtgaggctcac tgggaggctg cggcggaggg 720

agccgtacgg tggctgcacc atcggtcttc atcttccccgc catctgatga gcagttgaaa 780

tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg aataacttct atcccagaga ggccaaagta 840

cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg ggtaactccc aggagagtgt cacagaggcag 900

gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc agcaccctga cgctgagcaa agcagactac 960

gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca 1020

aagagcttca acaggggaga gtgt 1044

<210> 248
<211> 348
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> 2.4G2-3G8-hKappa

<400> 248

```
Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Asn Leu Ala Ala Ser Pro Gly
1               5                  10                  15

Glu Ser Val Ser Ile Asn Cys Lys Ala Ser Glu Ser Ile Ser Lys Tyr
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Lys Ala Asn Lys Leu Leu Met
        35                  40                  45

Tyr Asp Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Arg Ser Leu Glu Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Gly Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Glu Tyr Pro Ala
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
            100                 105                 110

Gly Gly Gly Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln
        115                 120                 125

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
    130                 135                 140

Arg Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys
145                 150                 155                 160

Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr
                165                 170                 175

Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser
            180                 185                 190

Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala
        195                 200                 205

Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
    210                 215                 220

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys Gly Gly Gly
225                 230                 235                 240
```

```
Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
                245                 250                 255

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
            260                 265                 270

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
        275                 280                 285

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
    290                 295                 300

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
305                 310                 315                 320

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
                325                 330                 335

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
            340                 345
```

<210> 249
<211> 1734
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> 3G8-2.4G2-hG1

<400> 249

```
gacactgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc       60

atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac      120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct      180

gggatccctg ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat      240

cctgtggagg aggaggatac tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac      300

acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaaggagggg gatccggagg cggaggcgag      360

gtggagctag tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gaaggtccct gaaactctcg      420

tgtgcagcct caggattcac tttcagtgac tactacatgg cctgggtccg gcaggctcca      480

acgacgggtc tggagtgggt cgcatccatt agttatgatg gtggtgacac tcactatcga      540

gactccgtga agggccgatt tactatttcc agagataatg caaaaagcag cctatacctg      600

caaatggaca gtctgaggtc tgaggacacg gccacttatt actgtgcaac agagactacg      660

ggaatacctt caggtgttat ggatgcctgg ggtcaaggag tttcagtcac tgtctcctca      720

ctgggagggt gcggcggagg gagcggcctcc accaagggcc catcggtctt ccccctggca      780

ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca gcggccctgg gctgcctggt caaggactac      840
```

ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc 900

ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc 960

tccagcagct tgggcaccca gacctacatc tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc 1020

aaggtggaca agagagttga gcccaaatct tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc 1080

ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac 1140

accctcatga tctcccggac ccctgaggtc acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa 1200

gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 1260

aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 1320

caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca 1380

gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc ccgagaacca caggtgtac 1440

accctgcccc catcccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc 1500

aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac 1560

aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag 1620

ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 1680

gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaa 1734

<210> 250
<211> 578
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> 3GB-2.4G2-hCl

<400> 250

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser
130 135 140

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro
145 150 155 160

Thr Thr Gly Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Tyr Asp Gly Gly Asp
165 170 175

Thr His Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
180 185 190

Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu
195 200 205

Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Thr Glu Thr Thr Gly Ile Pro Thr
210 215 220

Gly Val Met Asp Ala Trp Gly Gln Gly Val Ser Val Thr Val Ser Ser
225 230 235 240

Leu Gly Gly Cys Gly Gly Gly Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
245 250 255

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
260 265 270

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
275 280 285

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
290 295 300

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
305 310 315 320

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
325 330 335

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
340 345 350

```
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
        355                 360                 365

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
    370                 375                 380

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
385                 390                 395                 400

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
                405                 410                 415

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
            420                 425                 430

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

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

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
465                 470                 475                 480

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
                485                 490                 495

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
            500                 505                 510

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
        515                 520                 525

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
    530                 535                 540

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
545                 550                 555                 560

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
                565                 570                 575

Gly Lys
```

<210> 351
<211> 720

<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CD79VL-CD32BVH

<400> 251
gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca ccttggacca gccggcctcc 60

atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg 120

tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac cgcctaattt atctggtgtc taaactggac 180

tctggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240

agcagggtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg 300

ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg aggcggaggc 360

gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc catgaaactc 420

tcttgtgaag cctctggatt cactttttagt gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct 480

ccagagaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca 540

tactatgctg agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt 600

gtcttacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta ctgtggggct 660

ctgggcttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcgct gggaggctgc 720

<210> 252
<211> 240
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CD79VL-CD32BVH

<400> 252

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
130 135 140

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala
145 150 155 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Asn Lys Ala Lys
165 170 175

Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Ile Gly Arg Phe Thr Ile
180 185 190

Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
195 200 205

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Ala Leu Gly Leu Asp
210 215 220

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225 230 235 240

<210> 253
<211> 696
<212> DNA
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CD32BVL-CD79VR-1

<400> 253
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc tvatctgcct ctgtgggaga tagagtcacc 60

atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggctacttaa gctggctgca gcagaaacca 120

ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc 180

aggttcagtg gcagtgagtc tgggacagag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct 240

gaagattttg caacttatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg 300

gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt tcagctggtg 360

cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga aggtctcctg caaggcttct 420

ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt 480

gagtggatcg gaatgattga tccttcagac agtgaaacte actacaatca aargttcaag 540

gacagagtca ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc 600

ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta ctgggggcaa 660

gggaccacgg tcaccgtctc ctcactggga ggctgc 696

<210> 354
<211> 232
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CD32BVL-CD79VH-1

<400> 354

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Glu Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
115 120 125

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

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
145 150 155 160

Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn
165 170 175

Gln Met Phe Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser
180 185 190

```
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
        195                 200                 205

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
    210                 215                 220

Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225                 230
```

<210> 255
<211> 696
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CD32BVL-CD79VH-2

<400> 255
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga tagagtcacc 60

atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggctgca gcagaaacca 120

ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc 180

aggttcagtg gcagtggagc tgggaccgag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct 240

gaagattttg caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg 300

gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt tcagctggtg 360

cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga aggtctcctg caaggcttct 420

ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt 480

gagtggatcg gaatgattga tccttcagac agtgaaactc actacaatca aaagttcaag 540

gacagagtca ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc 600

ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta ctgggggcaa 660

gggaccacgg tcaccgtctc ctcactggga ggctgc 696

<210> 256
<211> 232
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CD32BVL-CD79VH-2

<400> 256

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr
            20                  25                  30
```

```
Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Arg Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Glu Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
            100                 105                 110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
        115                 120                 125

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

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
145                 150                 155                 160

Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn
                165                 170                 175

Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser
            180                 185                 190

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
        195                 200                 205

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
    210                 215                 220

Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225                 230


<210>  257
<211>  720
<212>  ДНК
<213>  Штучна послідовність

<220>
<223>  hMBCPCVL. P49N-h8B5VH-LOGC

<400>  257
gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc        60
```

atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg 120

tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac cgcctaattt atctggtgtc taaactggac 180

tctggggtcc cagacagatt cagcggcagc gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240

agcagggtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg 300

ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg aggcggaggc 360

gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc catgaaactc 420

tcttgtgaag cctctggatt cactttttagt gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct 480

ccagagaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca 540

tactatgctg agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt 600

gtctacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta ctgtggggct 660

ctgggcttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcgct gggaggctgc 720

<210> 258
<211> 240
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> hHBCRCVL. P4SN-h8B5VH-LGGC

<400> 258

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
115 120 125

```
Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
    130                 135                 140

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala
145                 150                 155                 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Asn Lys Ala Lys
                165                 170                 175

Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Ile Gly Arg Phe Thr Ile
            180                 185                 190

Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
        195                 200                 205

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Ala Leu Gly Leu Asp
    210                 215                 220

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225                 230                 235                 240
```

<210> 259
<211> 696
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> НВВ5VL-hKBCPCVH М48I-LGGC

<400> 259

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga tagagtcacc        60

atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggctgca gcagaaacca       120

ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccatct       180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct       240

gaagattttg caacctatta ctgtctacaa tatttagtt atccgctcac gttcggaggg       300

gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tcgggaggcg gaggccaggt tcagctggtg       360

cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga aggtctcctg caaggcttct       420

ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt       480

gagtggatcg gaatgattga tccttcagac agtgaaactc actacaatca aatgttcaag       540

gacagagtca ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc       600

ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta ctggggccaa       660

gggaccacgg tcaccgtctc ctcactggga ggctgc                                 696
```

<210> 260
<211> 232
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Н8В5VL-НВСЯСVК М48I-LG5C

<400> 260

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Glu Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
115 120 125

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

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
145 150 155 160

Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn
165 170 175

Gln Met Phe Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser
180 185 190

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
195 200 205

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
210 215 220

Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225 230

<210> 261
<211> 36
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Lgh321F Праймер

<400> 261
cgagctagct ctagatgaga tcacagttct ctctac 36

<210> 262
<211> 45
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Lgh386R Праймер

<400> 262
tttgaattct agcagcctcc cagtgaggag acggtgaccg tggtc 45

<210> 263
<211> 39
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Lgh784F Праймер

<400> 263
ggcggatccg gaggcggagg ccaggttcag ctggtgcag 39

<210> 264
<211> 38
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Lgh785R Праймер

<400> 264
cctccggatc cgcctccttt gatctccagc ttggtccc 38

<210> 265
<211> 42
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Lgh786R Праймер

<400> 265
tttgaattct agcagcctcc caggctggag acggtcacca gg 42

<210> 266
<211> 44
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Lgh787F Праймер

<400> 266
ggaggcggat ccggaggcgg aggcgaagtg cagcttgtgg agtc 44

<210> 267
<211> 8
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Лінкер

<400> 267

Leu Gly Gly Cys Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 268
<211> 4
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Лінкер

<400> 268

Leu Glu Ile Lys
1

<210> 269
<211> 4
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Лінкер

<400> 269

Thr Val Ser Ser
1

<210> 270
<211> 343
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> H8B5VL-hBCRCVH M48I, M82R_LCGCC3S_hKappa

<400> 270

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Glu Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
115 120 125

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

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
145 150 155 160

Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn
165 170 175

Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser
180 185 190

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
195 200 205

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
210 215 220

Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys Gly Gly Gly Ser Arg Thr Val Ala
225 230 235 240

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
245 250 255

```
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
            260                 265                 270

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
        275                 280                 285

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
    290                 295                 300

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
305                 310                 315                 320

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
                325                 330                 335

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
            340
```

<210> 271
<211> 1032
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> H8B5VL-hBCKCVK M48I, M62K_LOCCC3S_hKappa

<400> 271

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctgtgggaga tagagtcacc        60

atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggctgca gcagaaacca       120

ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc gcatccactt tagatttctgg tgtcccatcc       180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagag ttcaccctca ccatcagcag cctgcagcct       240

gaagattttg caacctatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg       300

gggaccaagg tggaaataaa acgaggcgga tccggaggcg gaggccaggt tcagctggtg       360

cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga aggtctcctg caaggcttct       420

ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt       480

gagtggatcg gaatgattga tccttcggac agtgaaacte actacaatca aaagttcaag       540

gacagagtca ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc       600

ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta ctggggccaa       660

gggaccacgg tcaccgtctc ctcactggga ggctgcggcg gagggagccg aactgtggct       720

gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct       780

gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat       840

aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag agtgtcacag agcaggacag caaggacagc       900
```

acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc 960

tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg 1020

ggagagtgtt ag 1032

<210> 272
<211> 574
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> HBCRCVL R45N-h8B5VH_LGKCOGG8-hG1

<400> 272

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
130 135 140

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala
145 150 155 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Asn Lys Ala Lys
165 170 175

Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Ile Gly Arg Phe Thr Ile
180 185 190

```
Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
        195                 200                 205

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Ala Leu Gly Leu Asp
    210                 215                 220

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Cys
225                 230                 235                 240

Gly Gly Gly Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
                245                 250                 255

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
            260                 265                 270

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
        275                 280                 285

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
    290                 295                 300

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
305                 310                 315                 320

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
                325                 330                 335

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
            340                 345                 350

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
        355                 360                 365

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
    370                 375                 380

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
385                 390                 395                 400

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
                405                 410                 415

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
            420                 425                 430

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
        435                 440                 445
```

```
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
    450                 455                 460

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
465                 470                 475                 480

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
                485                 490                 495

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
            500                 505                 510

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
        515                 520                 525

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
    530                 535                 540

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
545                 550                 555                 560

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                565                 570
```

<210> 273
<211> 1722
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> HBCRCVU P48N-h8BSVH_KKEYGGSS-hG1

<400> 273
gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc 60

atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg 120

tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac cgcctaattt atctggtgtc taaactggac 180

tctgggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240

agcagggtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg 300

ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg aggcggaggc 360

gaagtgcagc ttgtggagtc tgggaggagc ttggtgcaac ctggaggatc cctgagactc 420

tctgtgccg cctctggatt cactttagt gacgcctgga tggactgggc ccgtcaggcc 480

ccaggcaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca 540

tactatgctg agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgacgc caaaaacagt 600

ctgtacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg ccgtgtatta ctgtgggggt 660

ctgggcttg actactgggg ccaaggcacc ctggtgaccg tctccagcct gggaggctgc 720

ggcggagggg gcgcctccac caagggccca tcggtcttcc ccctggcacc ctcctccaag 780

agcacctctg gggcacagcc ggccctgggc tgcctggtca aggactactt ccccgaaccg 840

gtgacggtgt cgtggaactc aggcgccctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc 900

ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg 960

ggcacccaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag 1020

agagttgagc ccaaatcttg tgacaaaact cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa 1080

ctcctggggg gaccgtcagt cttcctcttc cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc 1140

tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc 1200

aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 1260

gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg 1320

ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag 1380

aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgcccca 1440

tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtcaa aggcttctat 1500

cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1560

acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct acagcaagct caccgtggac 1620

aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 1680

aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aa 1722

<210> 274
<211> 335
<212> PRT
<213> Oryctolagus cuniculus

<220>
<223> H8B5VL-HBCRCVH M48I, M62K_(-A)LEIK_hKappa

<400> 274

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

```
Ser Glu Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
            100                 105                 110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
        115                 120                 125

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

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
145                 150                 155                 160

Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn
                165                 170                 175

Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser
            180                 185                 190

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
        195                 200                 205

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
    210                 215                 220

Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
225                 230                 235                 240

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
                245                 250                 255

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
            260                 265                 270

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
        275                 280                 285

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
    290                 295                 300

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
305                 310                 315                 320
```

```
Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
                325                 330                 335


<210>  275
<211>  1005
<212>  ДНК
<213>  Штучна послідовність

<220>
<223>  H8B5VL-HBCRCVH M48I, M62K_(-4)LEIK_hKappa

<400>  275
gacatccaga tgacccagtc tccatcctca ttatctgcct ctgtgggaga tagagtcacc        60

atcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctggctgca gcagaaacca       120

ggcaaggccc ctagacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccatcc       180

aggttcagtg gcagtgagtc tgggacagag ttcaccctca ccatcagcag ccttcagcct       240

gaagattttg caacttatta ctgtctacaa tattttagtt atccgctcac gttcggaggg       300

gggaccaagg tggaaataaa aggaggcgga tccggaggcg gaggccaggt tcagctggtg       360

cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggc gcctcagtga aggtctcctg caaggcttct       420

ggttacacct ttaccagcta ctggatgaac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt       480

gagtggatcg gaatgattga tccttcagac agtgaaactc actacaatca aaagttcaag       540

gacagagtca ccatgaccac agacacatcc acgagcacag cctacatgga gctgaggagc       600

ctgagatctg acgacacggc cgtgtattac tgtgcgagag ctatgggcta ctgggggcaa       660

gggaccacgg tcctggagat caagcgaact gtggctgcac catcggtctt catcttccog       720

ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc       780

tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc       840

caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg       900

acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag       960

ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt                      1005


<210>  276
<211>  566
<212>  PRT
<213>  Штучна послідовність

<220>
<223>  HBCRCVL R45N-h8B5VH_(-4)TVSS-hG1  = HBCRCVL R45N-h8B5VH_-hG1

<400>  276

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


Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
            20                  25                  30
```

```
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
        35                  40                  45

Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60

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

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

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
        115                 120                 125

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
    130                 135                 140

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala
145                 150                 155                 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Asn Lys Ala Lys
                165                 170                 175

Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Ile Gly Arg Phe Thr Ile
            180                 185                 190

Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
        195                 200                 205

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Ala Leu Gly Leu Asp
    210                 215                 220

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
225                 230                 235                 240

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
                245                 250                 255

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
            260                 265                 270

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
        275                 280                 285
```

```
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
    290                 295                 300

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
305                 310                 315                 320

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
                325                 330                 335

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
            340                 345                 350

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
        355                 360                 365

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
    370                 375                 380

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
385                 390                 395                 400

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
                405                 410                 415

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
            420                 425                 430

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
        435                 440                 445

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
    450                 455                 460

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
465                 470                 475                 480

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
                485                 490                 495

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
            500                 505                 510

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
        515                 520                 525

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
    530                 535                 540
```

```
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
545                 550                 555                 560

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                565

<210>  377
<211>  1698
<212>  DNA
<213>  Bovine monoclonal

<220>
<223>  HBCRCVL R45N-h8B5VH_(-4)TVSS-hG1

<400>  377
gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc      60

atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaacttgg     120

tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac cgcctaattt atctggtgtc taaactggac     180

tctggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc     240

agcagggtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg     300

ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg aggcggaggc     360

gaagtgcagc ttgtggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc cctgagactc     420

tcttgtgccg cctctggatt cactttagt gacgcctgga tggactgggt ccgtcaggcc     480

ccaggcaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca     540

tactatgctg agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgacgc caaaaacagt     600

ctgtacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg ccgtgtatta ctgtggggct     660

ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc ctggtgaccg tctccagcgc ctccaccaag     720

ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc     780

ctgggctgcc tggtcaagga ctacttcccc gaaccggtga cggtgtcgtg gaactcaggc     840

gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc     900

ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac     960

gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagagag ttgagcccaa atcttgtgac    1020

aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tgggggggac cgtcagtctt    1080

cctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc    1140

gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc    1200

gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt    1260

gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc    1320

aaggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg    1380
```

cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatcccc gggatgagct gaccaagaac 1440

caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatcccа gcgacatcgc cgtggagtgg 1500

gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1560

ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1620

gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1680

tccctgtctc cgggtaaa 1698

<210> 278
<211> 10
<212> PRT
<213> Штучна послiмовнiсть

<220>
<223> Пiнкер

<400> 278

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 279
<211> 13
<212> PRT
<213> Штучна послiмовнiсть

<220>
<223> Пiнкер

<400> 279

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met
1 5 10

<210> 280
<211> 6
<212> PRT
<213> Штучна послiмовнiсть

<220>
<223> Пiнкер

<400> 280

Leu Glu Gly Glu Glu Gly
1 5

<210> 281
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послiмовнiсть

<220>
<223> Пiнкер

<400> 281

Leu Glu Gly Glu Glu Gly Cys
1 5

<210> 282
<211> 4
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Лінкер

<400> 282

Leu Glu Ile Lys
1

<210> 283
<211> 5
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Лінкер

<400> 283

Leu Gly Glu Glu Gly
1 5

<210> 284
<211> 6
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Лінкер

<400> 284

Leu Gly Glu Glu Gly Cys
1 5

<210> 285
<211> 8
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Лінкер

<400> 285

Leu Gly Gly Cys Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 286
<211> 5
<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Лінкер

<400> 286

Leu Gly Lys Lys Gly
1 5

<210> 287
<211> 6
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Лінкер

<400> 287

Leu Gly Lys Lys Gly Cys
1 5

<210> 288
<211> 6
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Лінкер

<400> 288

Leu Lys Gly Lys Lys Gly
1 5

<210> 289
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Лінкер

<400> 289

Leu Lys Gly Lys Lys Gly Cys
1 5

<210> 290
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Лінкер

<400> 290

Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met

1 5

<210> 291
<211> 8
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Лінкер

<400> 291

Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met Cys
1 5

<210> 292
<211> 4
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Лінкер

<400> 292

Thr Val Ser Ser
1

<210> 293
<211> 10
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Лінкер

<400> 293

Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 294
<211> 14
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Лінкер

<400> 294

Val Glu Pro Lys Ser Cys Tyr Leu Tyr Leu Arg Ala Arg Val
1 5 10

<210> 295
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Лінкер

<400> 295

Val Gln Val His Tyr Arg Met
1 5

<210> 296
<211> 8
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Лінкер

<400> 296

Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys
1 5

<210> 297
<211> 8
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Лінкер

<400> 297

Tyr Leu Tyr Leu Arg Ala Arg Val
1 5

<210> 298
<211> 9
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Лінкер

<400> 298

Tyr Leu Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys
1 5

<210> 299
<211> 28
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> D-спіральний лінкер

<400> 299

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
20 25

<210> 300
<211> 28
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> К-спіральний лінкер

<400> 300

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
20 25

<210> 301
<211> 5
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Лінкер

<400> 301

Gly Gly Gly Asn Ser
1 5

<210> 302
<211> 107
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Варіабельна область легкого ланцюга YA2B6

<400> 302

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala

65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 303
<211> 121
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Варіабельна область важкого ланцюга YA286

<400> 303

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 304
<211> 46
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Альбумін-зв'язуючий домен

<400> 304

```
Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1               5                  10                  15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu
            20                  25                  30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
        35                  40                  45


<210>  305
<211>  279
<212>  PRT
<213>  Mycobacteriophage

<220>
<223>  h3G8VL1-G3SG4-h2B6VH4-Kcoil-GGCNS

<400>  305

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
            20                  25                  30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

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

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

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
                85                  90                  95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
            100                 105                 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
        115                 120                 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
    130                 135                 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
145                 150                 155                 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Asp Pro Ser Asp Thr Tyr
                165                 170                 175
```

```
Pro Asn Tyr Asn Lys Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Val
            180                 185                 190

Val Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp
        195                 200                 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Tyr
    210                 215                 220

Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
225                 230                 235                 240

Gly Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala
                245                 250                 255

Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu
            260                 265                 270

Lys Glu Gly Gly Gly Asn Ser
        275
```

<210> 306
<211> 837
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> h3G8VL1-G1SG4-h2B6VH4-Kcoil-GGCGNS

<400> 306

```
gacatcgtga tgacccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc       60

atcaactgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac      120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct      180

ggggtccctg acaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatccac      240

agcctgcagg ctgaggatgt ggcagtttat tactgtcagc aaagtaatga agatccgtac      300

acgttcggac aggggaccaa gcttgagatc aaaggaggcg gatccggcgg cggaggccag      360

gttcagctgg tgcagtctgg agctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc      420

tgcaaggctt ctggttacac ctttaccaac tactggatac actgggtgcg acaggcccct      480

ggacaagggc ttgagtggat tggagtgatt gatccttctg atacttatac caatttaaat      540

aaaaagttca agggcagagt caccatgacc gtagtcgtac ccacgagcac agcctacatg      600

gagctgagga gcctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgcgag aaacggtgat      660

tccgatttct actctggtat ggactactgg gggcaagggg ccacggtcac cgtctcctcc      720

ggaggatgtg gcggtggaaa agtggccgca ctgaaggaga aagttgctgc tttgaaagag      780
```

aaggtcgccg cacttaagga aaaggtcgca gccctgaaag agggcggcgg gaattct 837

<210> 307
<211> 318
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> h2B6VL5-G3S64-h3G8VH5-Ecoil-GGCNS-ABD

<400> 307

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Glu Val Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys
115 120 125

Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
130 135 140

Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
145 150 155 160

Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr
165 170 175

Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
180 185 190

Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala
195 200 205

```
Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
    210                 215                 220

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu
225                 230                 235                 240

Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala
                245                 250                 255

Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Gly Gly Gly Asn Ser
            260                 265                 270

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
        275                 280                 285

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu
    290                 295                 300

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
305                 310                 315
```

<210> 308
<211> 954
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> h2B6VL5-G3SG4-h3G8VH5-Ecoil-GGCNS-ABD

<400> 308

```
gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc       60

ttcacctgca ggaccagtca gagcattggc acaaacatac actggtacca gcagaaacca      120

gatcagtctc caaagctcct catcaaggag gtttctgagt ctatctctgg agtcccatcg      180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaccctca ccatcaatag cctggaagct      240

gaagatgctg caacgtatta ctgtcaacaa agtaatacct ggccgttcac gttcggcgga      300

gggaccaagg tggagatcaa aggaggcgga tccggcggcg gaggccaggt tacacctgaga     360

gagtctggcc ctgcgctggt gaaacccaca cagaccctca cactgactug cacctctgtc      420

gggttttcac tgagcacttc tggtatgggt gtaggctgga ttcgtcagcc tccagggaag      480

gctctagagt ggctggcaca catttggtgg gatgatgaca agcgctataa tccagccctg      540

aagagccgac tgacaatctc caaggatacc tccaaaaacc aggtagtcct cacaatgacc      600

aacatggacc ctgtggatac tgccacatac tactgtgctc aaataaaccc cgcctggttt      660

gcttactggg gccaagggac tctggtcact gtgagctccg gaggatgtgg cggtggagaa      720

gtggccgcac tggagaaaga ggttgctgct ttggagaagg aggtcgctgc acttgaaaag      780
```

gaggtcgcag ccctggagaa aggcggcggg aattctctgg ccgaagcaaa agtgctggcc 840

aacgcgaacc tggataaata tggcgtgagc gattattata agaacctgat taacaacgca 900

aagaccgtgg aaggcgtgaa agcactgatt gatgaaattc tggcgcgcct gcct 954

<210> 309
<211> 5
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Лінкер

<400> 309

Ala Pro Ser Ser Ser
1 5

<210> 310
<211> 8
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Лінкер

<400> 310

Val Pro Ser Met Gly Ser Ser Ser
1 5

<210> 311
<211> 383
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 311

Met Gly Leu Gly Pro Val Phe Leu Leu Leu Ala Gly Ile Phe Pro Phe
1 5 10 15

Ala Pro Pro Gly Ala Ala Ala Glu Pro His Ser Leu Arg Tyr Asn Leu
20 25 30

Thr Val Leu Ser Trp Asp Gly Ser Val Gln Ser Gly Phe Leu Thr Glu
35 40 45

Val His Leu Asp Gly Gln Pro Phe Leu Arg Cys Asp Arg Gln Lys Cys
50 55 60

Arg Ala Lys Pro Gln Gly Gln Trp Ala Glu Asp Val Leu Gly Asn Lys
65 70 75 80

Thr Trp Asp Arg Glu Thr Arg Asp Leu Thr Gly Asn Gly Lys Asp Leu

85 90 95

Arg Met Thr Leu Ala His Ile Lys Asp Gln Lys Glu Gly Leu His Ser
100 105 110

Leu Gln Glu Ile Arg Val Cys Glu Ile His Glu Asp Asn Ser Thr Arg
115 120 125

Ser Ser Gln His Phe Tyr Tyr Asp Gly Glu Leu Phe Leu Ser Gln Asn
130 135 140

Leu Glu Thr Lys Glu Trp Thr Met Pro Gln Ser Ser Arg Ala Gln Thr
145 150 155 160

Leu Ala Met Asn Val Arg Asn Phe Leu Lys Glu Asp Ala Met Lys Thr
165 170 175

Lys Thr His Tyr His Ala Met His Ala Asp Cys Leu Gln Glu Leu Arg
180 185 190

Arg Tyr Leu Lys Ser Gly Val Val Leu Arg Arg Thr Val Pro Pro Met
195 200 205

Val Asn Val Thr Arg Ser Glu Ala Ser Glu Gly Asn Ile Thr Val Thr
210 215 220

Cys Arg Ala Ser Gly Phe Tyr Pro Trp Asn Ile Thr Leu Ser Trp Arg
225 230 235 240

Gln Asp Gly Val Ser Leu Ser His Asp Thr Gln Gln Trp Gly Asp Val
245 250 255

Leu Pro Asp Gly Asn Gly Thr Tyr Gln Thr Trp Val Ala Thr Arg Ile
260 265 270

Cys Gln Gly Glu Glu Gln Arg Phe Thr Cys Tyr Met Glu His Ser Gly
275 280 285

Asn His Ser Thr His Pro Val Pro Ser Gly Lys Val Leu Val Leu Gln
290 295 300

Ser His Trp Gln Thr Phe His Val Ser Ala Val Ala Ala Ala Ala Ile
305 310 315 320

Phe Val Ile Ile Ile Phe Tyr Val Arg Cys Cys Lys Lys Lys Thr Ser
325 330 335

Ala Ala Glu Gly Pro Glu Leu Val Ser Leu Gln Val Leu Asp Gln His

```
            340                 345                 350

Pro Val Gly Thr Ser Asp His Arg Asp Ala Thr Gln Leu Gly Phe Gln
        355                 360                 365

Pro Leu Met Ser Asp Leu Gly Ser Thr Gly Ser Thr Glu Gly Ala
    370                 375                 380
```

<210> 312
<211> 305
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 312

```
Pro His Ser Leu Arg Tyr Asn Leu Met Val Leu Ser Gln Asp Gly Ser
1               5                   10                  15

Val Gln Ser Gly Phe Leu Ala Glu Gly His Leu Asp Gly Gln Pro Phe
            20                  25                  30

Leu Arg Tyr Asp Arg Gln Lys Arg Arg Ala Lys Pro Gln Gly Gln Trp
        35                  40                  45

Ala Glu Asp Val Leu Gly Ala Lys Thr Trp Asp Thr Glu Thr Glu Asp
    50                  55                  60

Leu Thr Glu Asn Gly Gln Asp Leu Arg Arg Thr Leu Thr His Ile Lys
65                  70                  75                  80

Asp Gln Lys Gly Gly Leu His Ser Leu Gln Glu Ile Arg Val Cys Glu
                85                  90                  95

Ile His Glu Asp Ser Ser Thr Arg Gly Ser Arg His Phe Tyr Tyr Asp
            100                 105                 110

Gly Glu Leu Phe Leu Ser Gln Asn Leu Glu Thr Gln Glu Ser Thr Val
        115                 120                 125

Pro Gln Ser Ser Arg Ala Gln Thr Leu Ala Met Asn Val Thr Asn Phe
    130                 135                 140

Trp Lys Glu Asp Ala Met Lys Thr Lys Thr His Tyr Arg Ala Met Gln
145                 150                 155                 160

Ala Asp Cys Leu Gln Lys Leu Gln Leu Pro Pro Met Val Asn Val Ile
                165                 170                 175

Cys Ser Glu Val Ser Glu Gly Asn Ile Thr Val Thr Cys Arg Ala Ser
            180                 185                 190
```

Ser Phe Tyr Pro Arg Asn Ile Thr Leu Thr Trp Arg Gln Asp Gly Val
195 200 205

Ser Leu Ser His Asn Thr Gln Gln Trp Gly Asp Val Leu Pro Asp Gly
210 215 220

Asn Gly Thr Tyr Gln Thr Trp Val Ala Thr Arg Ile Arg Gln Gly Glu
225 230 235 240

Glu Gln Arg Phe Thr Cys Tyr Met Glu His Ser Gly Asn His Gly Thr
245 250 255

His Pro Val Pro Ser Gly Lys Ala Leu Val Leu Gln Ser Gln Arg Thr
260 265 270

Asp Phe Pro Tyr Val Ser Ala Ala Met Pro Cys Phe Val Ile Ile Ile
275 280 285

Ile Leu Cys Val Pro Cys Cys Lys Lys Lys Thr Ser Ala Ala Glu Gly
290 295 300

Pro
305

<210> 313
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Лінкер

<400> 313

Gly Phe Asn Arg Gly Glu Cys
1 5

<210> 314
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Лінкер

<400> 314

Gly Val Glu Pro Lys Ser Cys
1 5

<210> 315
<211> 241

<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> TCRVL-HER2VH

<400> 315

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro
115 120 125

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

Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu
145 150 155 160

Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Asp Pro
165 170 175

Lys Phe Gln Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr
180 185 190

Ala Tyr Leu Gln Val Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
195 200 205

Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
210 215 220

```
Gly Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Phe Asn Arg Gly Glu
225                 230                 235                 240

Cys
```

<210> 316
<211> 723
<212> DNA
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> TCRVL-HER2VH

<400> 316

```
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc       60

ctctcctgca gtgccaactc aagtgtaagt tacatgcact ggtatcagca gaaaccaggg      120

aaagccccta agcgctggat ctatgacaca tccaaactgg cttctggggt cccatcaagg      180

ttcagcggca gtggatctgg gacagaattt actctcacaa tcagcagcct gcagcctgaa      240

gattttgcaa cttattactg tcagcagtgg agtagtaacc cgctcacgtt cggccagggg      300

accaagcttg agatcaaagg aggcggatcc ggcggcggag gctcaggttc agtgcagcag      360

tctgggccag agcttgtgaa gccaggggcc tcactcaagt tgtcctgtac agcttctggc      420

ttcaacatta aagacaccta tatacactgg gtgaaacaga ggcctgaaca gggcctggaa      480

tggattggaa ggatttatcc tacgaatggt tatactagat atgacccgaa gttccaggac      540

aaggccacta taacagcaga cacatcctcc aacacagcct acctgcaggt cagcgccctg      600

acatctgagg acactgccgt ctattattgt tctagatggg gaggggacgg cttctatgct      660

atggactact ggggtcaagg agcctcggtc accgtgagct ccggattcaa caggggagag      720

tgt                                                                    723
```

<210> 317
<211> 242
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> HER2VL-TCRVH

<400> 317

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1               5                  10                  15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
            20                  25                  30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly His Ser Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45
```

```
Tyr Ser Ala Ser Phe Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
    50                  55                  60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65                  70                  75                  80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
            100                 105                 110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
        115                 120                 125

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

Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
145                 150                 155                 160

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn
                165                 170                 175

Glu Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
            180                 185                 190

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
        195                 200                 205

His Tyr Cys Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr
    210                 215                 220

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Val Glu Pro Lys
225                 230                 235                 240

Ser Cys
```

<310> 318
<211> 726
<312> DNA
<213> Enyuma mocnigaseicrs

<220>
<223> HEH2VL-TCRVH

<400> 318
gacatcgtga tgacccagtc ccacaagttc atgtccacct ctgtgggcga tagggtcagc 60

atcacctgca aggccagcca ggatgtgaat actgctgtag cctggtatca gcagaaacca 120

ggacattctc ccaaactgct gatttactcc gcatccttcc ggtacactgg agtccctgat 180

cgcttcactg gcagcggatc tgggacagat ttcactttca ccatcagcag tgtgcaggct 240

gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatacta cacctcccac cttcggaggg 300

ggtaccaagg tggagatcaa aggaggcgga tccggcggcg gaggccaggt tcagctggtg 360

cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggg gcctcagtga aggtctcctg caaggccagc 420

ggttacaagt ttaccagcta cgtgatgcac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt 480

gagtggatcg gatatattaa tccttacaat gatgttacta agtacaatga gaagttcaaa 540

ggcagagtca cgattaccgc ggacaaatcc acgagcacag cctacatgga gctgagcagc 600

ctgagatccg aggacacggc cgtgcactac tgtgcgagag ggagctacta tgattacgac 660

gggtttgttt actggggcca agggactctg gtcactgtga gctccggagt tgagcccaaa 720

tcttgt 726

<210> 319
<211> 373
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> TCRVL-HER2VH-E-спіраль

<400> 319

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro

```
        115                 120                 125

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

Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu
145                 150                 155                 160

Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Asp Pro
                165                 170                 175

Lys Phe Gln Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr
            180                 185                 190

Ala Tyr Leu Gln Val Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
        195                 200                 205

Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
    210                 215                 220

Gly Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly
225                 230                 235                 240

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val
                245                 250                 255

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Gly Gly Gly Asn
            260                 265                 270

Ser
```

<210> 320
<211> 819
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> TCRVL-HER2VH-E-спіраль

<400> 320

```
Gly Ala Ala Ala Thr Thr Gly Thr Gly Thr Thr Gly Ala Cys Ala Cys
1               5                   10                  15

Ala Gly Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Cys Cys Ala Cys Cys Cys Thr
            20                  25                  30

Gly Thr Cys Thr Thr Thr Gly Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Gly Gly
        35                  40                  45
```

```
Gly Ala Ala Ala Gly Ala Gly Cys Cys Ala Cys Cys Cys Thr Cys Thr
     50                  55                  60

Cys Cys Thr Gly Cys Ala Gly Thr Gly Cys Cys Ala Cys Cys Thr Cys
65                  70                  75                  80

Ala Ala Gly Thr Gly Thr Ala Ala Gly Thr Thr Ala Cys Ala Thr Gly
                85                  90                  95

Cys Ala Cys Thr Gly Gly Thr Ala Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly Ala
            100                 105                 110

Ala Ala Cys Cys Ala Gly Gly Gly Ala Ala Ala Gly Cys Cys Cys Cys
        115                 120                 125

Thr Ala Ala Gly Cys Gly Cys Thr Gly Gly Ala Thr Cys Thr Ala Thr
    130                 135                 140

Gly Ala Cys Ala Cys Ala Thr Cys Cys Ala Ala Ala Cys Thr Gly Gly
145                 150                 155                 160

Cys Thr Thr Cys Thr Gly Gly Gly Gly Thr Cys Cys Cys Ala Thr Cys
                165                 170                 175

Ala Ala Gly Gly Thr Thr Cys Ala Gly Cys Gly Gly Cys Ala Gly Thr
            180                 185                 190

Gly Gly Ala Thr Cys Thr Gly Gly Gly Ala Cys Ala Gly Ala Ala Thr
        195                 200                 205

Thr Thr Ala Cys Thr Cys Thr Cys Ala Cys Ala Ala Thr Cys Ala Gly
    210                 215                 220

Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Ala Ala
225                 230                 235                 240

Gly Ala Thr Thr Thr Thr Gly Cys Ala Ala Cys Thr Thr Ala Thr Thr
                245                 250                 255

Ala Cys Thr Gly Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly Thr Gly Gly Ala Gly
            260                 265                 270

Thr Ala Gly Thr Ala Ala Cys Cys Cys Gly Cys Thr Cys Ala Cys Gly
        275                 280                 285

Thr Thr Thr Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly Gly Gly Ala Cys Cys Ala
    290                 295                 300
```

```
Ala Gly Cys Thr Thr Gly Ala Gly Ala Thr Cys Ala Ala Ala Gly Gly
305                 310                 315                 320

Ala Gly Gly Cys Gly Gly Ala Thr Cys Cys Gly Gly Cys Gly Gly Cys
                325                 330                 335

Gly Gly Ala Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly Thr Thr Cys Ala Gly Cys
            340                 345                 350

Thr Gly Cys Ala Gly Cys Ala Gly Thr Cys Thr Gly Gly Gly Cys Cys
        355                 360                 365

Ala Gly Ala Gly Cys Thr Thr Gly Thr Gly Ala Ala Gly Cys Cys Ala
    370                 375                 380

Gly Gly Gly Gly Cys Cys Thr Cys Ala Cys Thr Cys Ala Ala Gly Thr
385                 390                 395                 400

Thr Gly Thr Cys Cys Thr Gly Thr Ala Cys Ala Gly Cys Thr Thr Cys
                405                 410                 415

Thr Gly Gly Cys Thr Thr Cys Ala Ala Cys Ala Thr Thr Ala Ala Ala
            420                 425                 430

Gly Ala Cys Ala Cys Cys Thr Ala Thr Ala Thr Ala Cys Ala Cys Thr
        435                 440                 445

Gly Gly Gly Thr Gly Ala Ala Ala Cys Ala Gly Ala Gly Gly Cys Cys
    450                 455                 460

Thr Gly Ala Ala Cys Ala Gly Gly Gly Cys Cys Thr Gly Gly Ala Ala
465                 470                 475                 480

Thr Gly Gly Ala Thr Thr Gly Gly Ala Ala Gly Gly Ala Thr Thr Thr
                485                 490                 495

Ala Thr Cys Cys Thr Ala Cys Gly Ala Ala Thr Gly Gly Thr Thr Ala
            500                 505                 510

Thr Ala Cys Thr Ala Gly Ala Thr Ala Thr Gly Ala Cys Cys Cys Gly
        515                 520                 525

Ala Ala Gly Thr Thr Cys Cys Ala Gly Gly Ala Cys Ala Ala Gly Gly
    530                 535                 540

Cys Cys Ala Cys Thr Ala Thr Ala Ala Cys Ala Gly Cys Ala Gly Ala
545                 550                 555                 560
```

```
Cys Ala Cys Ala Thr Cys Cys Thr Cys Cys Ala Ala Cys Ala Cys Ala
                565                 570                 575

Gly Cys Cys Thr Ala Cys Cys Thr Gly Cys Ala Gly Gly Thr Cys Ala
            580                 585                 590

Gly Cys Cys Gly Cys Cys Thr Gly Ala Cys Ala Thr Cys Thr Gly Ala
        595                 600                 605

Gly Gly Ala Cys Ala Cys Thr Gly Cys Cys Gly Thr Cys Thr Ala Thr
    610                 615                 620

Thr Ala Thr Thr Gly Thr Thr Cys Thr Ala Gly Ala Thr Gly Gly Gly
625                 630                 635                 640

Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ala Cys Gly Gly Cys Thr Thr Cys Thr Ala
                645                 650                 655

Thr Gly Cys Thr Ala Thr Gly Gly Ala Cys Thr Ala Cys Thr Gly Gly
            660                 665                 670

Gly Gly Thr Cys Ala Ala Gly Gly Ala Gly Cys Cys Thr Cys Gly Gly
        675                 680                 685

Thr Cys Ala Cys Cys Gly Thr Gly Ala Gly Cys Thr Cys Cys Gly Gly
    690                 695                 700

Ala Gly Gly Ala Thr Gly Thr Gly Gly Cys Gly Gly Thr Gly Gly Ala
705                 710                 715                 720

Gly Ala Ala Gly Thr Gly Gly Cys Cys Gly Cys Ala Cys Thr Gly Gly
                725                 730                 735

Ala Gly Ala Ala Ala Gly Ala Gly Gly Thr Thr Gly Cys Thr Gly Cys
            740                 745                 750

Thr Thr Thr Gly Gly Ala Gly Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gly Thr Cys
        755                 760                 765

Gly Cys Thr Gly Cys Ala Cys Thr Thr Gly Ala Ala Ala Ala Gly Gly
    770                 775                 780

Ala Gly Gly Thr Cys Gly Cys Ala Gly Cys Cys Cys Thr Gly Gly Ala
785                 790                 795                 800

Gly Ala Ala Ala Gly Gly Cys Gly Gly Cys Gly Gly Gly Ala Ala Thr
                805                 810                 815
```

Thr Cys Thr

<210> 321
<211> 274
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> MSR2VL-TCRVB-K-спіраль

<400> 321

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly His Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
115 120 125

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

Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
145 150 155 160

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn
165 170 175

Glu Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
180 185 190

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val

195 200 205

His Tyr Cys Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr
210 215 220

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly
225 230 235 240

Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys
245 250 255

Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Gly Gly Gly
260 265 270

Asn Ser

<210> 322
<211> 832
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> HER2VL-TCRVH-K-спіраль

<400> 322
gacatcgtga tgacccagtc cacaagttc atgtccacct ctgtgggcga tagggtcagc 60

atcacctgca aggccagcca ggatgtgaat actgctgtag cctggtatca gcagaaacca 120

ggacatttc ccaaactgct gatttactcc gcatccttcc ggtacactgg agtccctgat 180

cgcttcactg gcagcagatc tgggacagat ttcactttca ccatcagcag tgtgcaggct 240

gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatacta cacctcccac cttcggaggg 300

ggtccaagg tggagatcaa aggaggcgga tccggcggcg gaggccaggt tcagctggtg 360

cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggg gcctcagtga aggtctcctg caaggccagc 420

ggttacaagt ttaccagcta cgtgatgcac tgggtgcgac aggcccctgg acaagggctt 480

gagtggatcg gatatattaa tccttacaat gatgttacta agtacaatga gaagttcaaa 540

ggcagagtca cgattaccgc ggacaaatcc acgagcacag cctacatgga gctgagcagc 600

ctgagatccg aggacacggc cgtgctactac tgtgcgagag ggagctacta tgattacgac 660

gggtttgttt actggggcca agggactctg gtcactgtga gctccggagg atgtggcggt 720

ggaaaagtgg ccgcactgaa ggagaaagtt gctgctttga aagagaaggt cgccgcactt 780

aaggaaaagg tcgcagccct gaaagagggc ggcgggaatt ct 832

<210> 323
<211> 46
<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетична конструкція ABD

<400> 323

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ala Ala Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Ala Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 324
<211> 46
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетична конструкція ABD

<400> 324

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Ser Asn Ala Lys Ser Val Glu
20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Ala Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 325
<211> 21
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Штучна конструкція ABD

<400> 325

Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys
1 5 10 15

Ala Leu Ile Asp Glu
20

<210> 326
<211> 21
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетична конструкція ABD (ABD Y60-E80-варіант N66D/T70S/V71A)

<400> 326

Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asp Asn Ala Lys Ser Ala Glu Gly Val Lys
1 5 10 15

Ala Leu Ile Asp Glu
20

<210> 327
<211> 21
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетична конструкція ABD (ABD Y60-E80-варіант L64A/I65A/V71A)

<400> 327

Tyr Tyr Lys Asn Ala Ala Asn Asn Ala Lys Thr Ala Glu Gly Val Lys
1 5 10 15

Ala Leu Ile Asp Glu
20

<210> 328
<211> 46
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетична конструкція ABD (L64A/I65A/V71A («ABD (AAA)»))

<400> 328

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ala Ala Asn Asn Ala Lys Thr Ala Glu
20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 329
<211> 46
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетична конструкція ABD (N66D/T70S/V71A («ABD (DSA)»))

<400> 329

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asp Asn Ala Lys Ser Ala Glu
20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Поліпептид, що містить частину білка, який зв'язується з деімунізованою сироваткою, здатну зв'язуватися з вказаним сироватковим білком, де вказана частина білка, що зв'язується із деімунізованою сироваткою, являє собою варіант деімунізованого альбумінзв'язувального домену (ABD) дикого типу стрептококового G-білка, де вказаний ABD дикого типу має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 304; де вказаний варіант ABD має амінокислотну послідовність, яка відрізняється від SEQ ID NO: 304 вмістом:
(A) заміни валіну на аланін в положенні 71 ABD, заміни валіну на аланін в положенні 74 ABD або заміни аспартату на аланін в положенні 79 ABD; де вказані положення замін в ABD відповідають положенням 31, 34 і 39 SEQ ID NO: 304;
(B) заміни лейцину на аланін в положенні 64 ABD, заміни ізолейцину на аланін в положенні 65 ABD і заміни валіну на аланін в положенні 71 ABD; де вказані положення замін в ABD відповідають положенням 24, 25 і 31 SEQ ID NO: 304; або
(C) заміни аспарагіну на аспарагінову кислоту в положенні 66 ABD, заміни треоніну на серин в положенні 70 ABD і заміни валіну на аланін в положенні 71 ABD; де вказані положення замін в ABD відповідають положенням 26, 30 і 31 SEQ ID NO: 304;
де вказана деімунізована частина білка, що зв'язується з сироваткою, збільшує час напівжиття вказаного поліпептиду в сироватці в порівнянні з часом напівжиття вказаного поліпептиду в сироватці, у якому відсутня вказана частина вказаного білка, який зв'язується з деімунізованою сироваткою.

2. Поліпептид за п. 1, де вказаний поліпептид містить додаткову частину білка, який зв'язується з деімунізованою сироваткою, і де вказані частини вказаного білка, який зв'язується з деімунізованою сироваткою, мають здатність зв'язуватися з вказаним сироватковим білком.

3. Поліпептид за будь-яким з пп. 1-2, де вказаний варіант ABD містить вказану заміну валіну на аланін в положенні 71 ABD, вказану заміну валіну на аланін в положенні 74 ABD або вказану заміну аспартату на аланін в положенні 79 ABD; де вказані положення замін в ABD відповідають положенням 31, 34 і 39 SEQ ID NO: 304.

4. Поліпептид за будь-яким з пп. 1-2, де вказаний варіант ABD містить вказану заміну лейцину на аланін в положенні 64 ABD, вказану заміну ізолейцину на аланін в положенні 65 ABD і вказану заміну валіну на аланін в положенні 71 ABD; де вказані положення замін в ABD відповідають положенням 24, 25 і 31 SEQ ID NO: 304.

5. Поліпептид за будь-яким з пп. 1-2, де вказаний варіант ABD містить вказану заміну аспарагіну на аспарагінову кислоту в положенні 66 ABD, вказану заміну треоніну на серин в положенні 70 ABD і вказану заміну валіну на аланін в положенні 71 ABD; де вказані положення замін в ABD відповідають положенням 26, 30 і 31 SEQ ID NO: 304.

6. Поліпептид за п. 1 або 2, де вказаний варіант ABD має послідовність SEQ ID NO: 323, SEQ ID NO: 324, SEQ ID NO: 325, SEQ ID NO: 326, SEQ ID NO: 327, SEQ ID NO: 328 або SEQ ID NO: 329.

7. Поліпептид за будь-яким з пп. 1-6, де вказаний поліпептид містить антигензв'язувальну молекулу.

8. Поліпептид за п. 7, де вказана антигензв'язувальна молекула являє собою діатіло, що складається щонайменше з першого і другого поліпептидних ланцюгів, що взаємодіють один з одним з утворенням двох антигензв'язувальних сайтів, де щонайменше один із вказаних поліпептидних ланцюгів містить вказану другу поліпептидну частину, що включає вказану частину білка, який зв'язується з деімунізованою сироваткою, здатну зв'язуватися з вказаним сироватковим білком.

9. Поліпептид за п. 8, де обидва вказані перший і другий поліпептидні ланцюги включають другу поліпептидну частину, яка містить вказану частину вказаного білка, який зв'язується з деімунізованою сироваткою, здатну зв'язуватися із сироватковим білком.

10. Поліпептид за будь-яким з пп. 8-9, де вказані перший і другий поліпептидні ланцюги ковалентно зв'язані один з одним.

11. Поліпептид за будь-яким з пп. 8-10, де вказане діатіло зв'язується:
(A) з рецептором групи 2D (NKG2D) природних кілерів або з Т-клітинним рецептором (TCR); і
(B) з пухлиноасоційованим антигеном.

12. Поліпептид за п. 7, де вказаним антигеном є антиген раку молочної залози, антиген раку яєчника, антиген раку передміхурової залози, антиген раку шийки матки, антиген карциноми підшлункової залози, антиген раку легень, антиген раку сечового міхура, антиген раку товстої кишки, антиген раку яєчок, антиген гліобластоми, антиген, асоційований зі злоякісною пухлиною

В-клітин, антиген, асоційований із множинною мієломою, антиген, асоційований з неходжкінською лімфомою, або антиген, асоційований із хронічним лімфоцитарним лейкозом.

13. Поліпептид за будь-яким з пп. 8-11, де вказане діатіло має антигензв'язувальний сайт, який зв'язується з антигеном раку молочної залози, антигеном раку яєчника, антигеном раку передміхурової залози, антигеном раку шийки матки, антигеном карциноми підшлункової залози, антигеном раку легень, антигеном раку сечового міхура, антигеном раку товстої кишки, антигеном раку яєчок, антигеном гліобластоми, антигеном, асоційованим із злоякісною пухлиною В-клітин, антигеном, асоційованим з множинною мієломою, антигеном, асоційованим з неходжкінською лімфомою, або антигеном, асоційованим з хронічним лімфоцитарним лейкозом.

14. Застосування частини білка, який зв'язується з деімунізованною сироваткою, здатного зв'язуватися з вказаною сироваткою білка, з метою збільшення часу напівжиття ковалентно зв'язаного поліпептиду в сироватці, де вказана частина білка, яка зв'язується з деімунізованою сироваткою, являє собою варіант деімунізованого альбумінзв'язувального домену (ABD) дикого типу стрептококового G-білка, де вказаний ABD дикого типу має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 304; де вказаний варіант ABD має амінокислотну послідовність, яка відрізняється від SEQ ID NO: 304 вмістом:

(A) заміни валіну на аланін в положенні 71 ABD, заміни валіну на аланін в положенні 74 ABD або заміни аспартату на аланін в положенні 79 ABD; де вказані положення замін в ABD відповідають положенням 31, 34 і 39 SEQ ID NO: 304;

(B) заміни лейцину на аланін в положенні 64 ABD, заміни ізолейцину на аланін в положенні 65 ABD і заміни валіну на аланін в положенні 71 ABD; де вказані положення замін в ABD відповідають положенням 24, 25 і 31 SEQ ID NO: 304; або

(C) заміни аспарагіну на аспарагінову кислоту в положенні 66 ABD, заміни треоніну на серин в положенні 70 ABD і заміни валіну на аланін в положенні 71 ABD; де вказані положення замін в ABD відповідають положенням 26, 30 і 31 SEQ ID NO: 304;

де відбувається вказане збільшення часу напівжиття в сироватці в порівнянні з часом напівжиття в сироватці вказаної антигензв'язувальної молекули, в якій відсутня вказана частина білка, який зв'язується з деімунізованою сироваткою.

15. Застосування за п. 14, де вказаний поліпептид містить додаткову частину білка, який зв'язується з деімунізованою сироваткою, і де вказані частини вказаного білка, який зв'язується з деімунізованою сироваткою, мають здатність зв'язуватися з вказаним сироватковим білком.

16. Застосування за будь-яким з пп. 14-15, де вказаний варіант ABD містить вказану заміну валіну на аланін в положенні 71 ABD, вказану заміну валіну на аланін в положенні 74 ABD або вказану заміну аспартату на аланін в положенні 79 ABD; де вказані положення замін в ABD відповідають положенням 31, 34 і 39 SEQ ID NO: 304.

17. Застосування за будь-яким з пп. 14-15, де вказаний варіант ABD містить вказану заміну лейцину на аланін в положенні 64 ABD, вказану заміну ізолейцину на аланін в положенні 65 ABD і вказану заміну валіну на аланін в положенні 71 ABD; де вказані положення замін в ABD відповідають положенням 24, 25 і 31 SEQ ID NO: 304.

18. Застосування за будь-яким з пп. 14-15, де вказаний варіант ABD містить вказану заміну аспарагіну на аспарагінову кислоту в положенні 66 ABD, вказану заміну треоніну на серин в положенні 70 ABD і вказану заміну валіну на аланін в положенні 71 ABD; де вказані положення замін в ABD відповідають положенням 26, 30 і 31 SEQ ID NO: 304.

19. Застосування за п. 14, де вказаний варіант ABD має послідовність SEQ ID NO: 304, SEQ ID NO: 323, SEQ ID NO: 324, SEQ ID NO: 325, SEQ ID NO: 326, SEQ ID NO: 327, SEQ ID NO: 328 або SEQ ID NO: 329.

20. Застосування за будь-яким з пп. 14-19, де вказаний поліпептид містить антигензв'язувальну молекулу.

21. Застосування за п. 20, де вказана антигензв'язувальна молекула являє собою діатіло, що складається щонайменше з першого і другого поліпептидних ланцюгів, які взаємодіють один з одним з утворенням двох антигензв'язувальних сайтів, де щонайменше один з поліпептидних ланцюгів містить вказану другу поліпептидну частину, що включає вказану частину білка, який зв'язується з деімунізованою сироваткою, здатну зв'язуватися з вказаним сироватковим білком.

22. Застосування за п. 21, де обидва вказані перший і другий поліпептидні ланцюги включають другі поліпептидні частини, що містять вказану частину вказаного білка, який зв'язується з деімунізованою сироваткою, здатну зв'язуватися із сироватковим білком.

23. Застосування за будь-яким з пп. 21-22, де вказані перший і другий поліпептидні ланцюги ковалентно зв'язані один з одним.

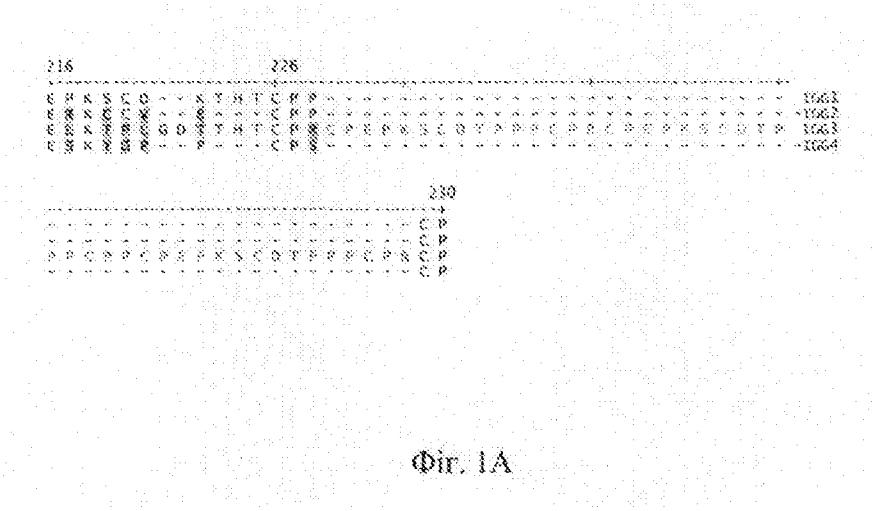
24. Застосування за будь-яким з пп. 21-23, де вказане діатіло зв'язується:

(A) з рецептором групи 2D (NKG2D) природних кілерів або з Т-клітинним рецептором (TCR); і
(B) з пухлиноасоційованим антигеном;
для одержання лікарського засобу для лікування раку, експресуючого вказаний пухлиноасоційований антиген.

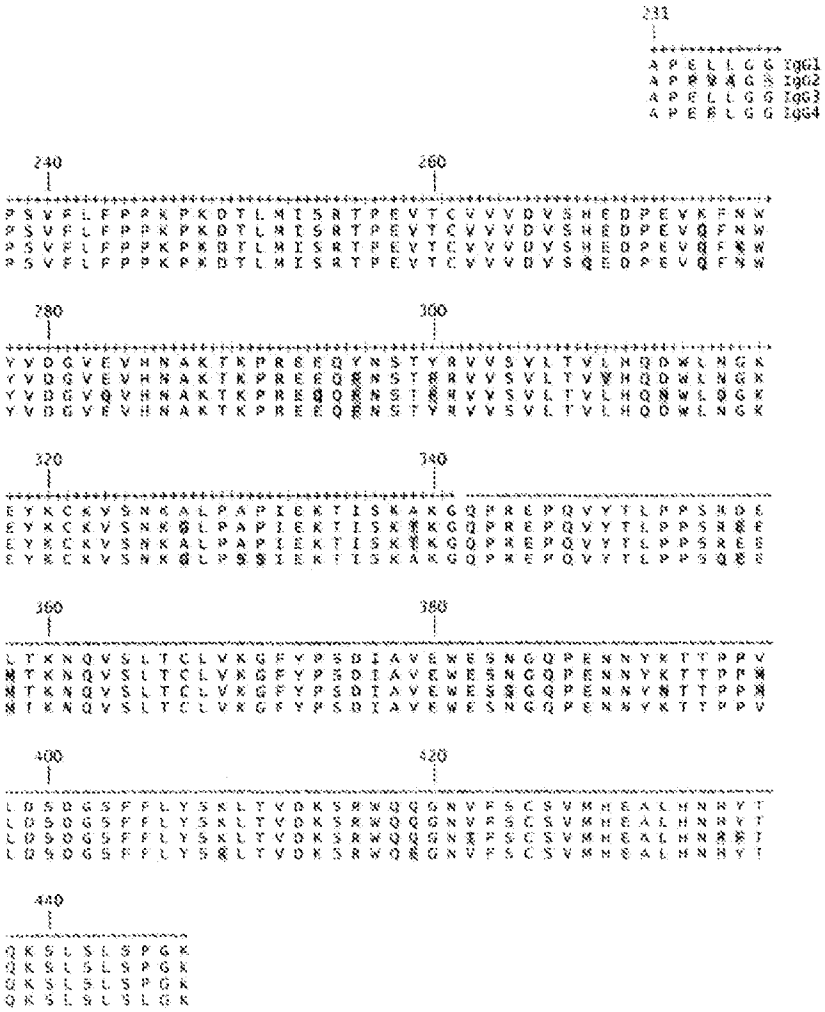
25. Застосування за п. 20, де вказаним антигеном є антиген раку молочної залози, антиген раку яєчника, антиген раку передміхурової залози, антиген раку шийки матки, антиген карциноми підшлункової залози, антиген раку легень, антиген раку сечового міхура, антиген раку товстої кишки, антиген раку яєчок, антиген гліобластоми, антиген, асоційований зі злоякісною пухлиною В-клітин, антиген, асоційований із множинною мієломою, антиген, асоційований з неходжкінською лімфомою, або антиген, асоційований із хронічним лімфоцитарним лейкозом.

26. Застосування за п. 21-24, де вказане діатіло має антигензв'язувальний сайт, який зв'язується з антигеном раку молочної залози, антигеном раку яєчника, антигеном раку передміхурової залози, антигеном раку шийки матки, антигеном карциноми підшлункової залози, антигеном раку легень, антигеном раку сечового міхура, антигеном раку товстої кишки, антигеном раку яєчок, антигеном гліобластоми, антигеном, асоційованим із злоякісною пухлиною В-клітин, антигеном, асоційованим з множинною мієломою, антигеном, асоційованим з неходжкінською лімфомою, або антигеном, асоційованим з хронічним лімфоцитарним лейкозом.

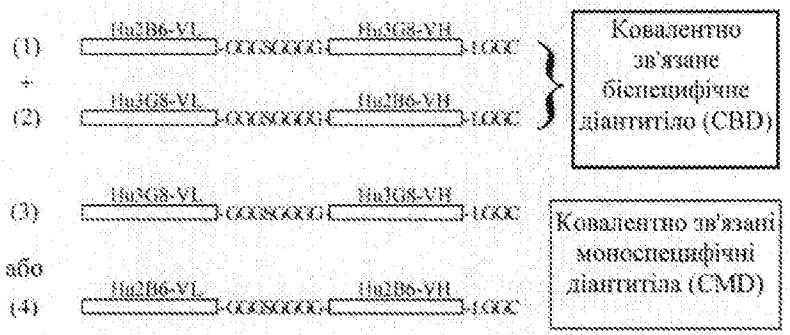
27. Композиція, яка містить поліпептид за будь-яким з пп. 1-13 і фармацевтично прийнятний носій.



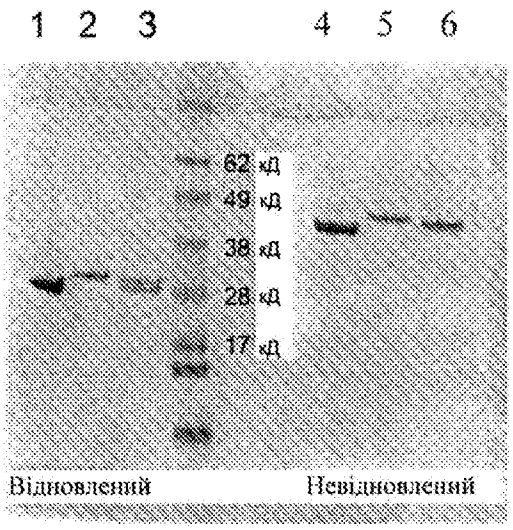
Фіг. 1А



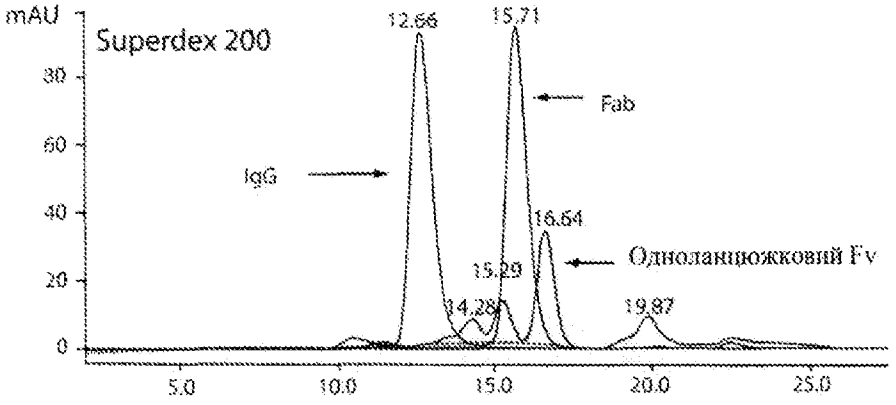
Фіг. 1B


(1)
Hu2B6-VL
Hu3G8-VH
+
(2)
Hu3G8-VL
Hu2B6-VH
Ковалентно зв'язане біспецифічне діантитіло (CBD)
(3)
Hu3G8-VL
Hu3G8-VH
або
(4)
Hu2B6-VL
Hu2B6-VH
Ковалентно зв'язані моноспецифічні діантитіла (CMD)

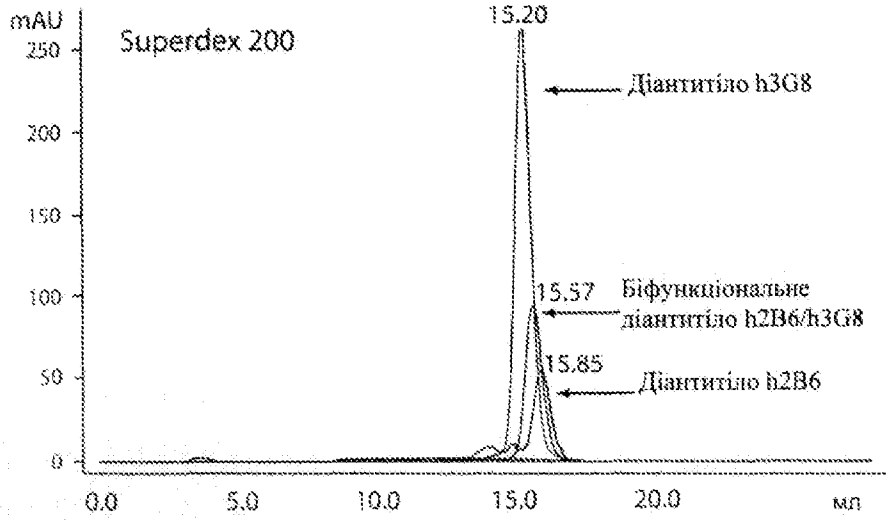
Фіг. 2


1 2 3 4 5 6
62 кД
49 кД
38 кД
28 кД
17 кД
Відновлений
Невідновлений

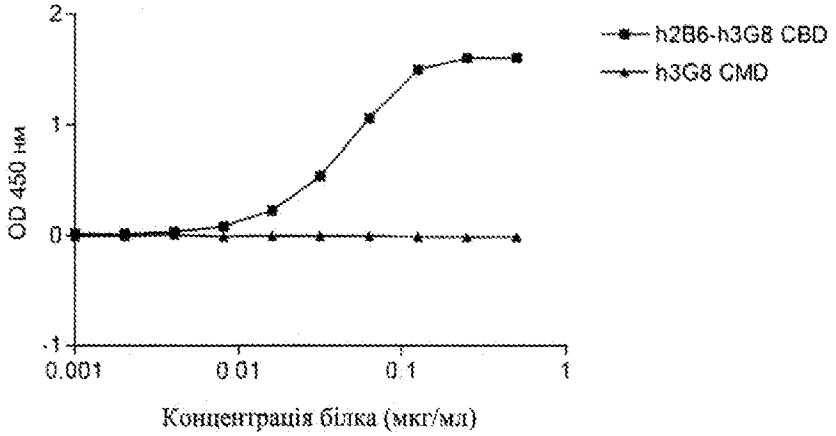
Фіг. 3


mAU
Superdex 200
12.66
15.71
Fab
IgG
16.64
Одноланцюжковий Fv
15.29
14.28
19.87
80
60
40
20
0
5.0
10.0
15.0
20.0
25.0

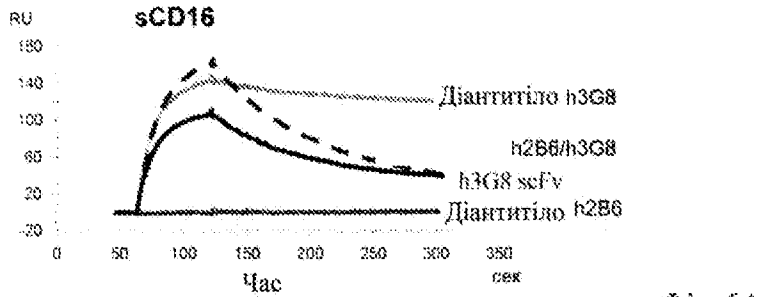
Фіг. 4A


mAU
Superdex 200
15.20
Діантитіло h3G8
15.57
Біфункціональне
діантитіло h2B6/h3G8
15.85
Діантитіло h2B6
250
200
150
100
50
0
0.0
5.0
10.0
15.0
20.0
мл

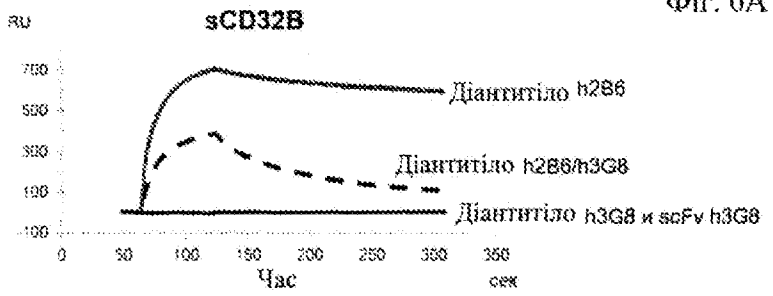
Фіг. 4B

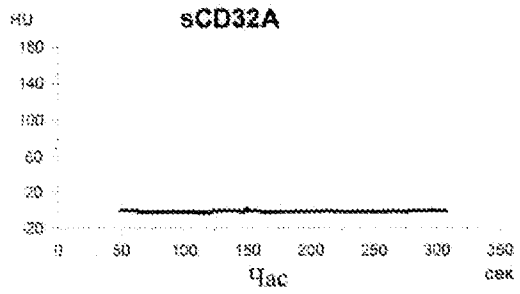


Фіг. 5



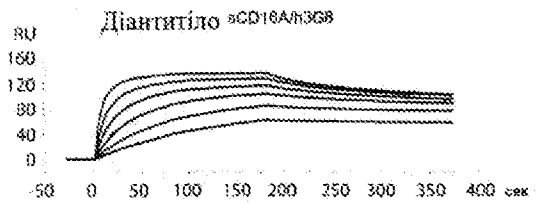
Фіг. 6A



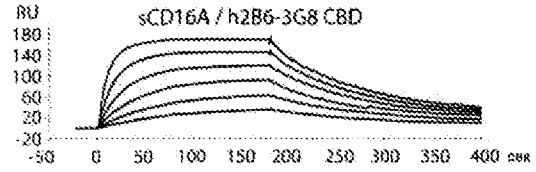


Фіг. 6B

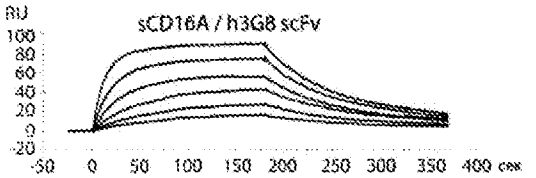
Фіг. 6C



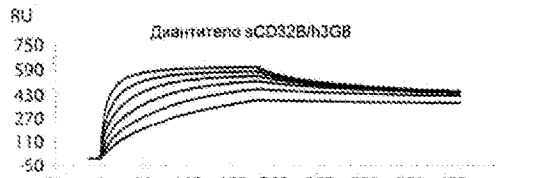
Фіг. 7A



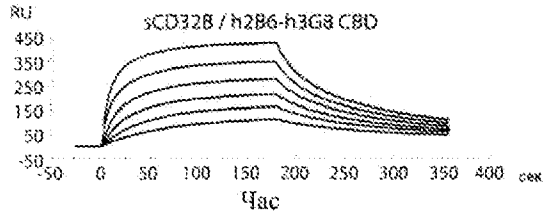
Фіг. 7B



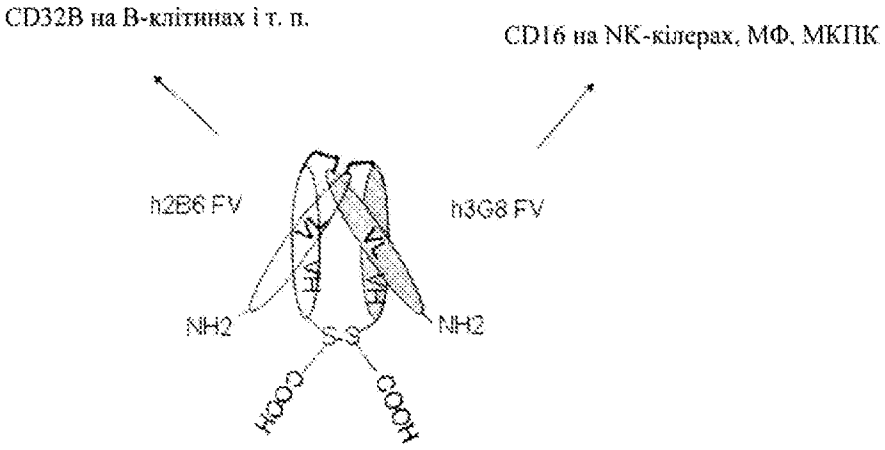
Фіг. 7C



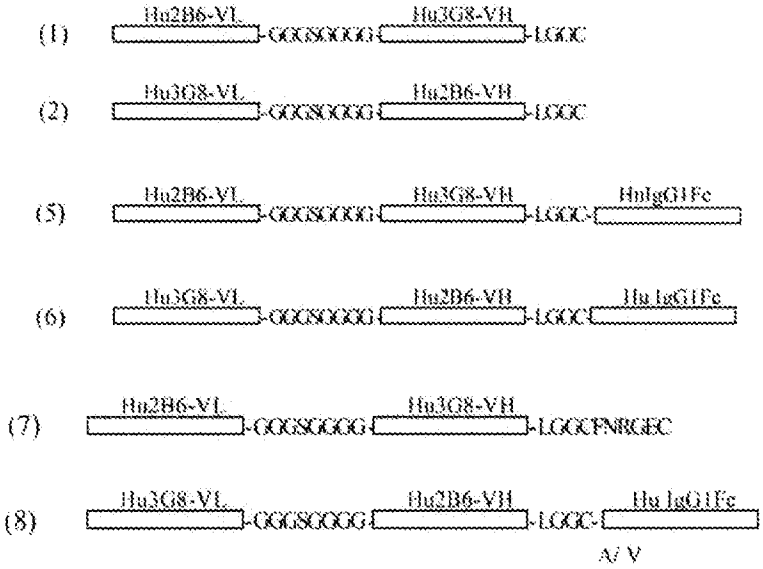
Фіг. 7D



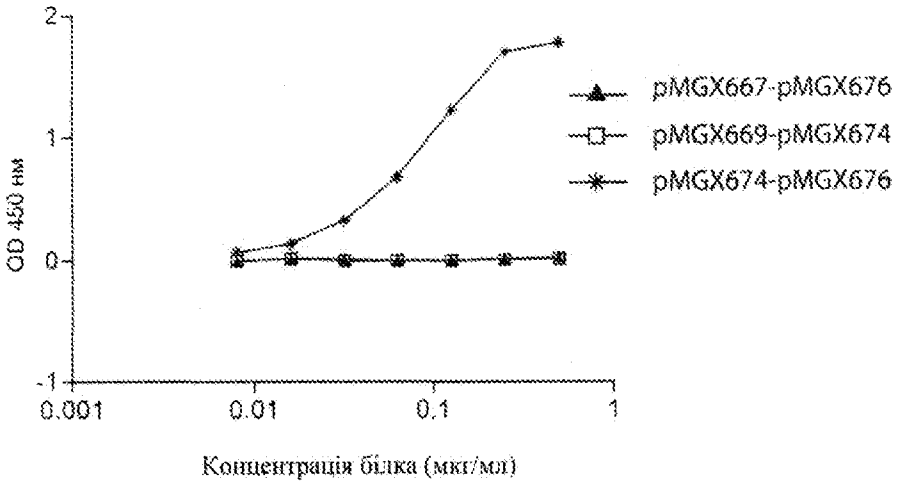
Фіг. 7E


CD32B на В-клітинах і т. п.
CD16 на NK-кілерах, МФ, МКПК
h2B6 FV
h3G8 FV
VL
VH
VH
VL
NH2
NH2
S-S
HOOC
COOH

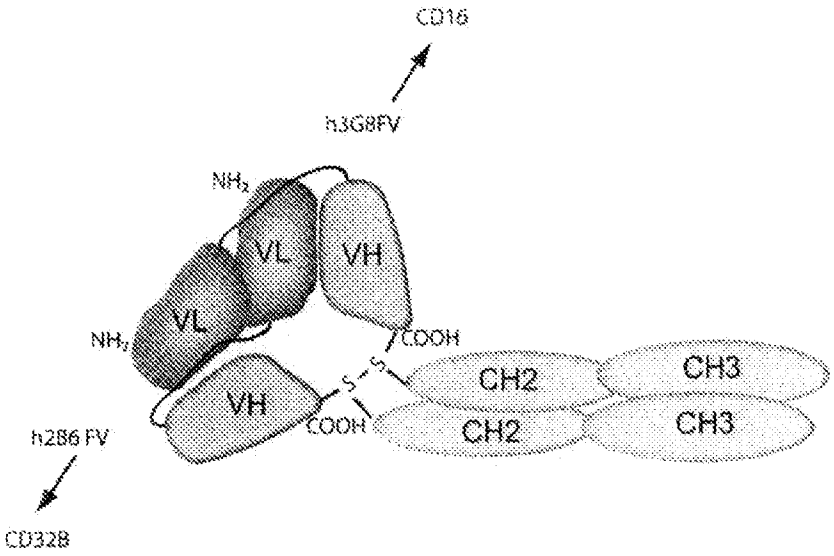
Фіг. 8


(1) Hu2B6-VL GGGSGGGG Hu3G8-VH LGGC
(2) Hu3G8-VL GGGSGGGG Hu2B6-VH LGGC
(5) Hu2B6-VL GGGSGGGG Hu3G8-VH LGGC HuIgG1Fc
(6) Hu3G8-VL GGGSGGGG Hu2B6-VH LGGC Hu IgG1Fc
(7) Hu2B6-VL GGGSGGGG Hu3G8-VH LGGCPNRGEC
(8) Hu3G8-VL GGGSGGGG Hu2B6-VH LGGC Hu IgG1Fc
A/ V

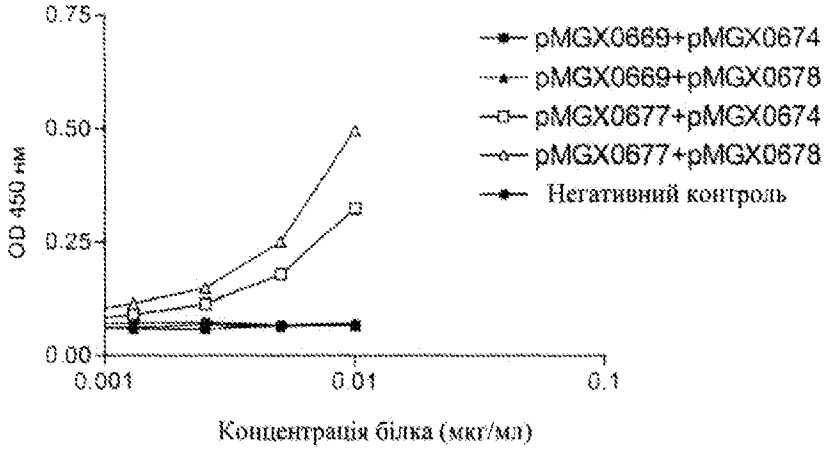
Фіг. 9


2
1
0
-1
OD 450 нм
0.001
0.01
0.1
1
Концентрація білка (мкг/мл)
pMGX667-pMGX676
pMGX669-pMGX674
pMGX674-pMGX676

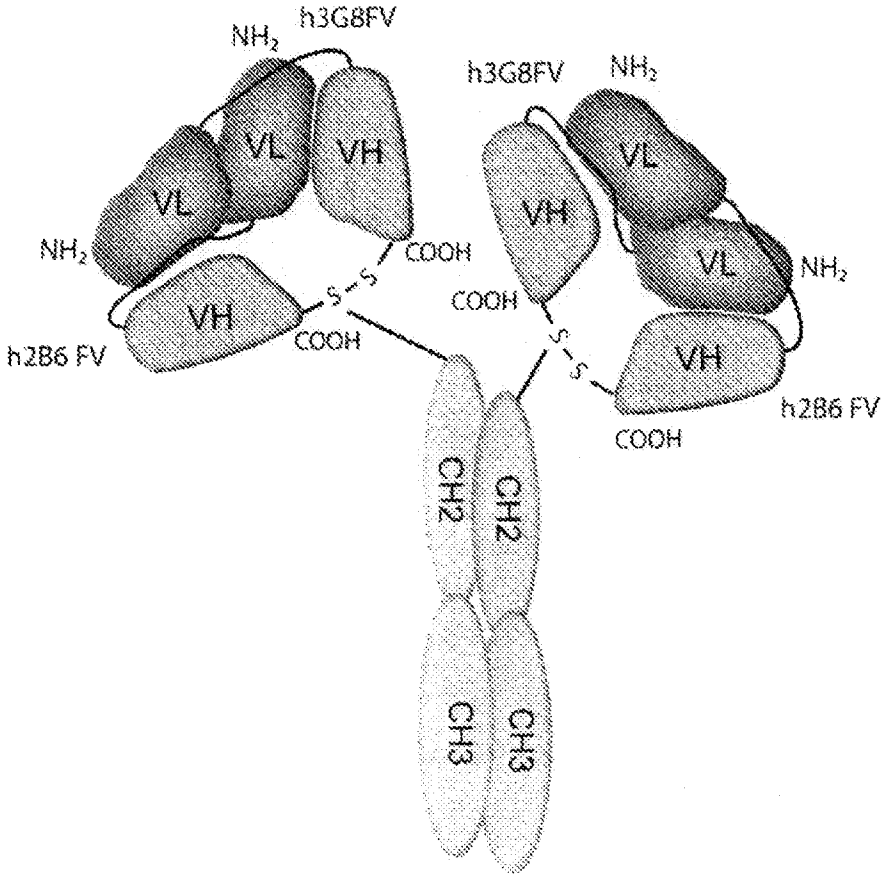
Фіг. 10


CD16
h3G8FV
NH2
VL
VH
VL
NH2
COOH
S-S
VH
COOH
CH2
CH3
CH2
CH3
h286 FV
CD32B

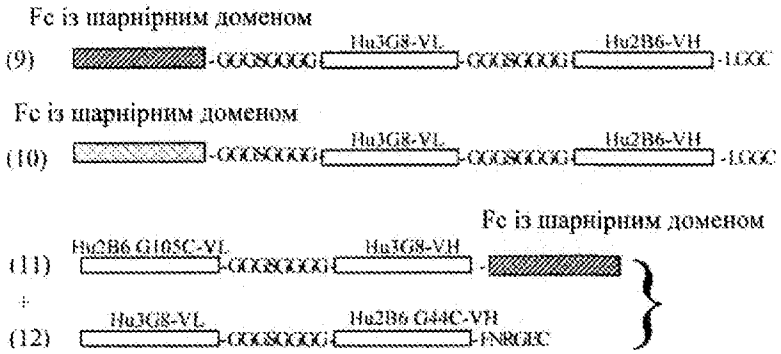
Фіг. 11


0.75
0.50
0.25
0.00
OD 450 нм
0.001
0.01
0.1
Концентрація білка (мкг/мл)
pMGX0669+pMGX0674
pMGX0669+pMGX0678
pMGX0677+pMGX0674
pMGX0677+pMGX0678
Негативний контроль

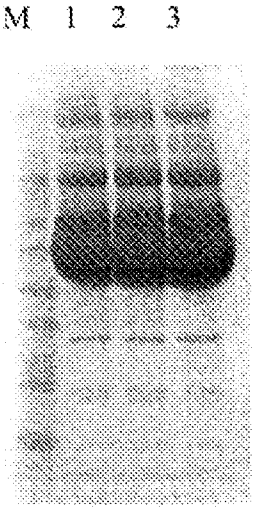
Фіг. 12


h3G8FV
NH2
VL
VH
COOH
S–S
h2B6 FV
CH2
CH3

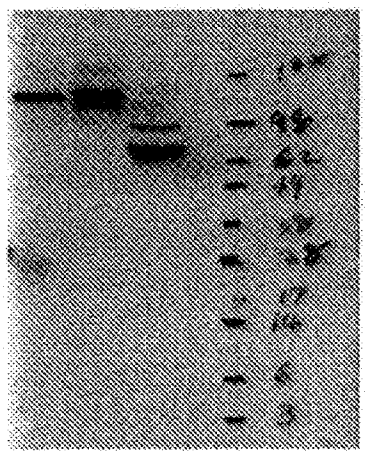
Фіг. 13



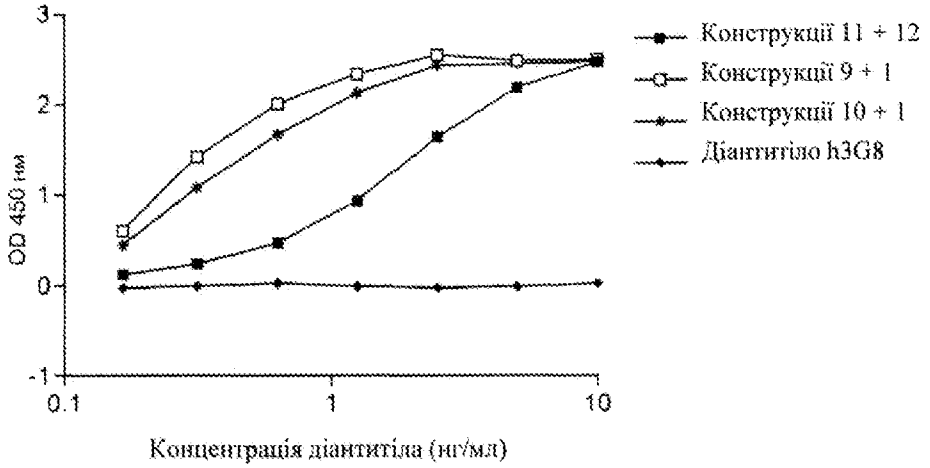
Фіг. 14



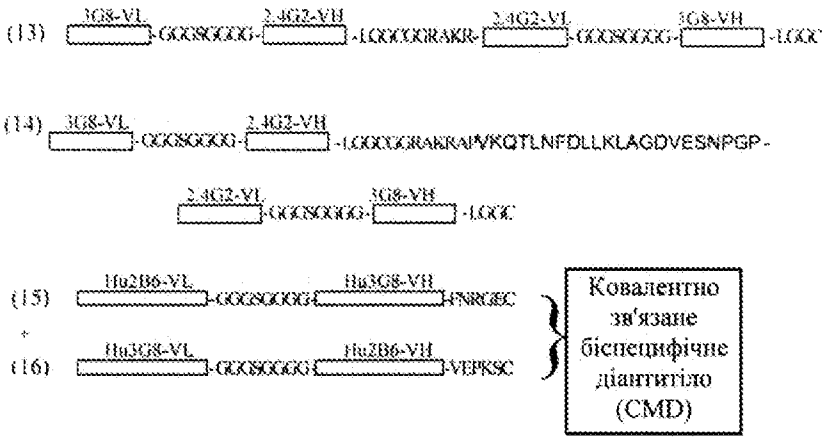
Фіг. 15A



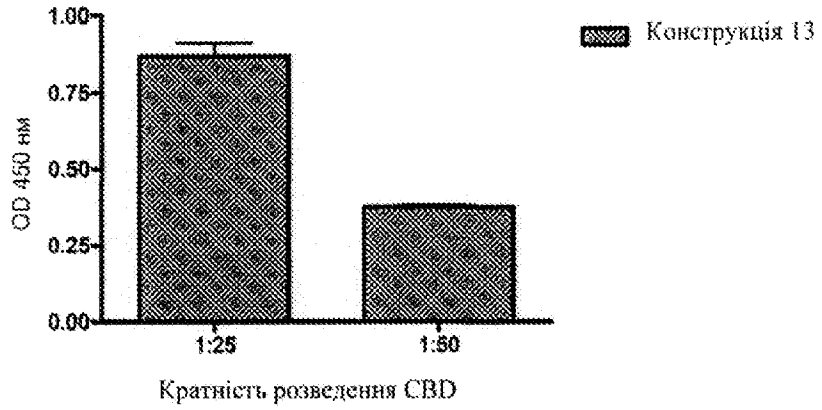
Фіг. 15B


3
2
1
0
-1
OD 450 нм
0.1
1
10
Концентрація діантитіла (нг/мл)
Конструкції 11 + 12
Конструкції 9 + 1
Конструкції 10 + 1
Діантитіло h3G8

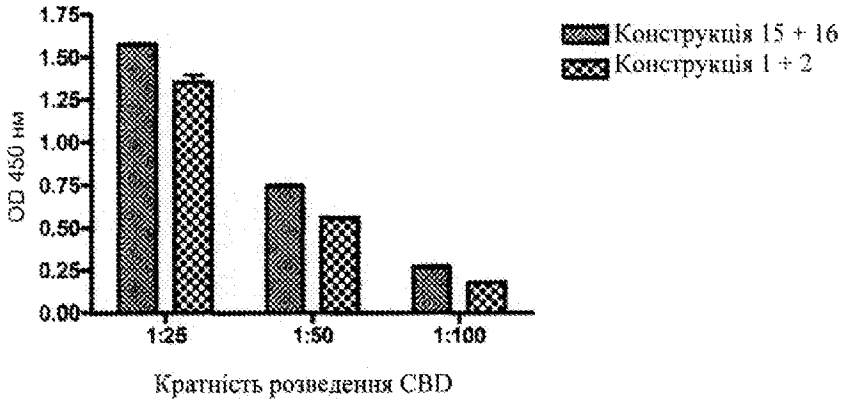
Фіг. 16


(13)
3G8-VL
GGGSGGGG
2.4G2-VH
LQKGGGRAKR
2.4G2-VL
GGGSGGGG
3G8-VH
LGGC
(14)
3G8-VL
GGGSGGGG
2.4G2-VH
LGGGGRAKRAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
2.4G2-VL
GGGSGGGG
3G8-VH
LGGC
(15)
Hu2B6-VL
GGGSGGGG
Hu3G8-VH
VNRGEC
+
(16)
Hu3G8-VL
GGGSGGGG
Hu2B6-VH
VEPKSC
Ковалентно зв'язане біспецифічне діантитіло (CMD)

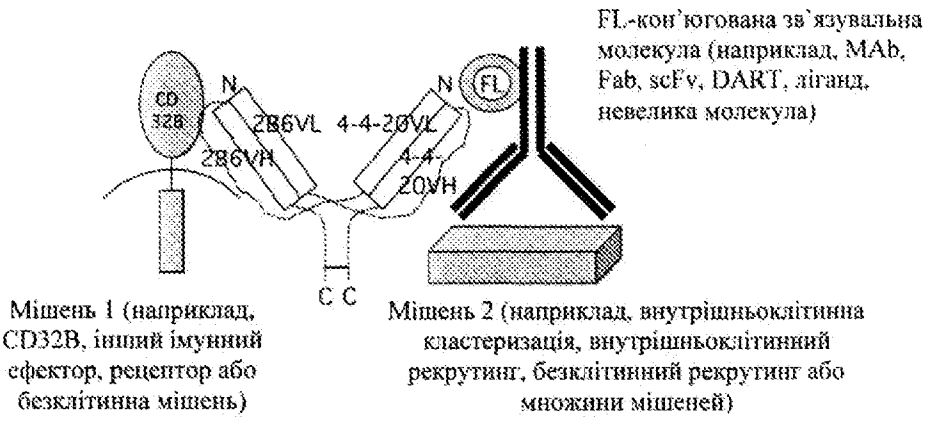
Фіг. 17


1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
OD 450 нм
1:25
1:50
Конструкція 13
Кратність розведення CBD

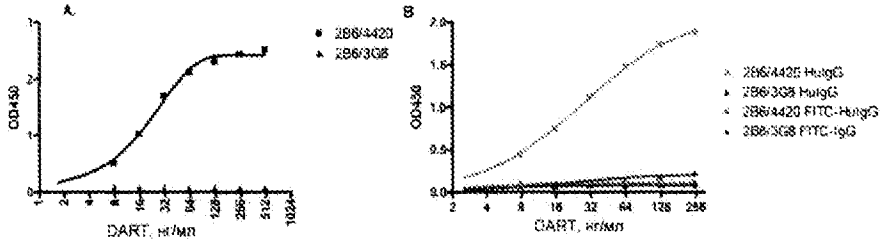
Фіг. 18


1.75
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
OD 450 нм
1:25
1:50
1:100
Конструкція 15 + 16
Конструкція 1 + 2
Кратність розведення CBD

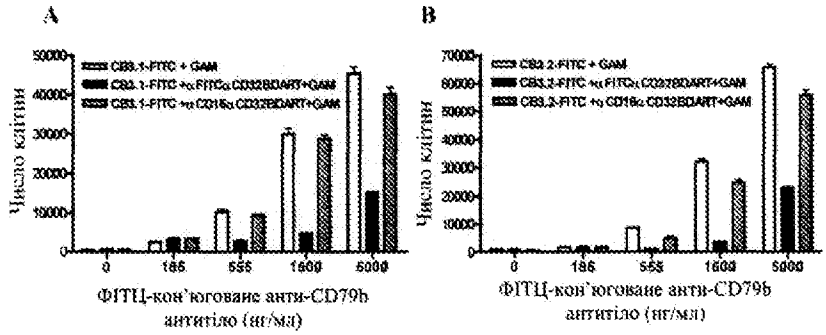
Фіг. 19


FL-кон'югована зв'язувальна молекула (наприклад, MAb, Fab, scFv, DART, ліганд, невелика молекула)
CD 32B
N
2B6VL
2B6VH
4-4-20VL
4-4-20VH
N
FL
C C
Мішень 1 (наприклад, CD32B, інший імунний ефектор, рецептор або безклітинна мішень)
Мішень 2 (наприклад, внутрішньоклітинна кластеризація, внутрішньоклітинний рекрутинг, безклітинний рекрутинг або множини мішеней)

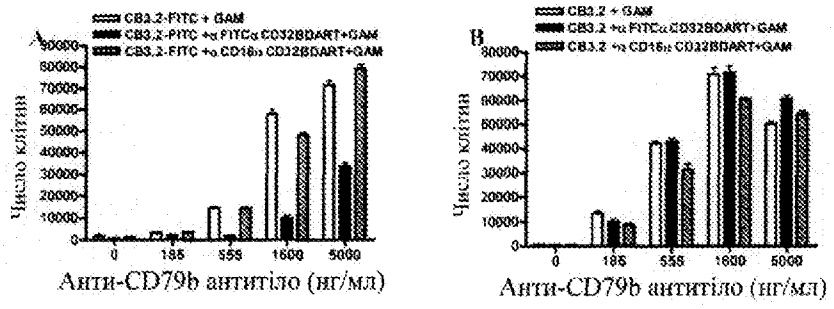
Фіг. 20



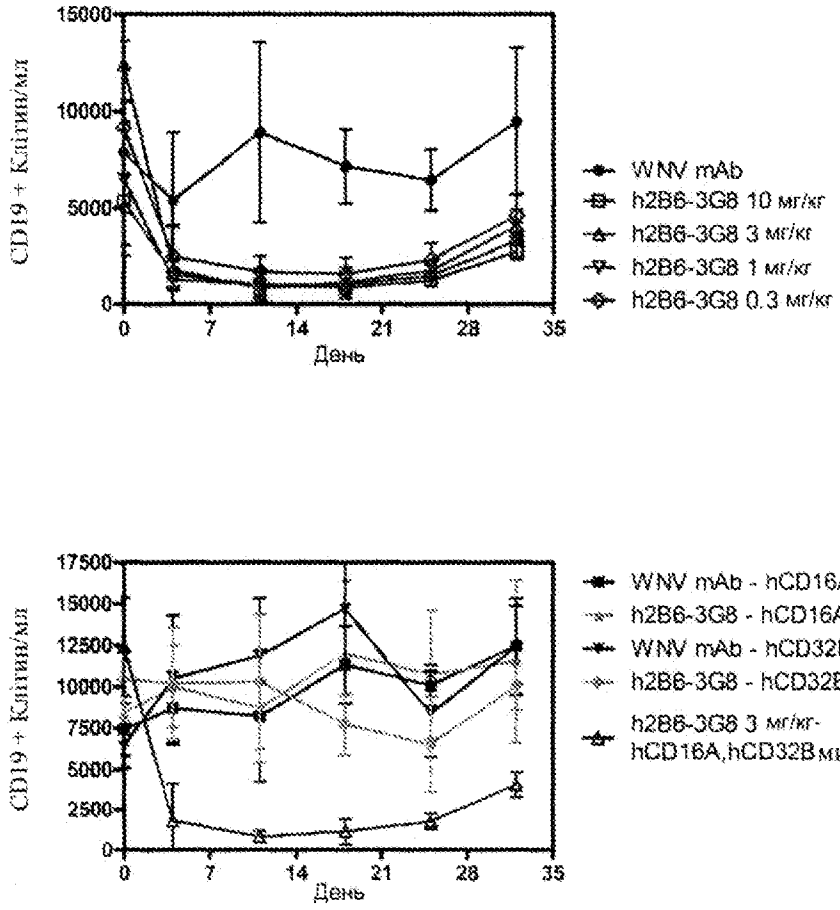
Фіг. 21



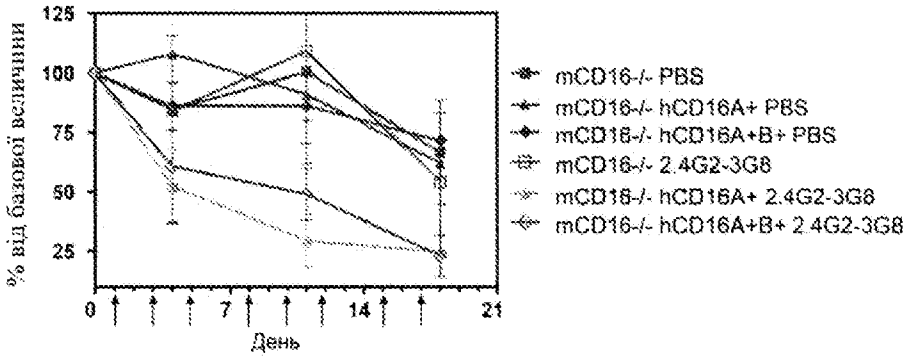
Фіг. 22



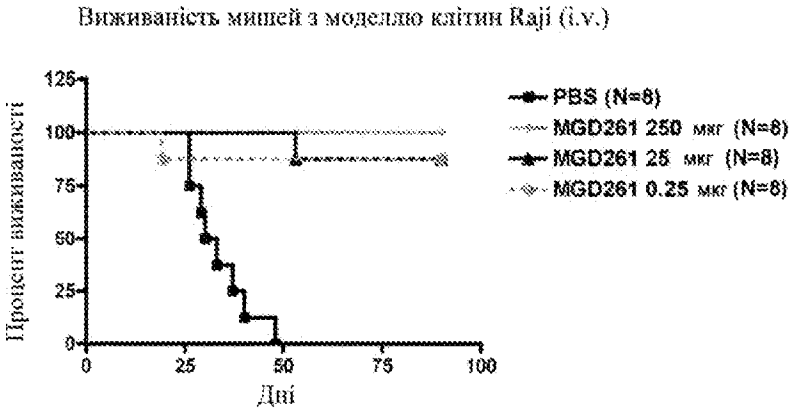
Фіг. 23


CD19 + Клітин/мл
15000
10000
5000
0
0
7
14
21
28
35
День
WNV mAb
h2B6-3G8 10 мг/кг
h2B6-3G8 3 мг/кг
h2B6-3G8 1 мг/кг
h2B6-3G8 0.3 мг/кг
CD19 + Клітин/мл
17500
15000
12500
10000
7500
5000
2500
0
0
7
14
21
28
35
День
WNV mAb - hCD16A миша
h2B6-3G8 - hCD16A миша
WNV mAb - hCD32B миша
h2B6-3G8 - hCD32B миша
h2B6-3G8 3 мг/кг-
hCD16A,hCD32B миша

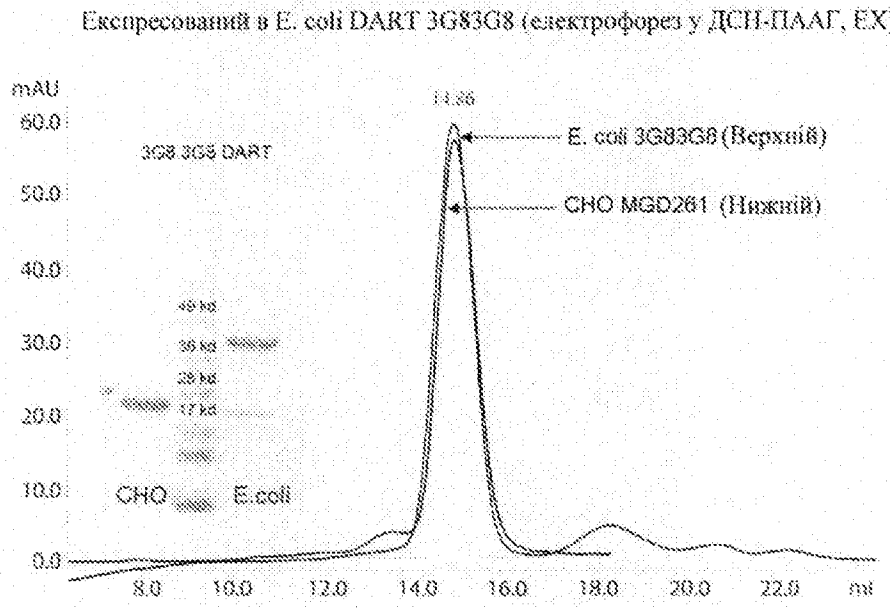
Фіг. 24


% від базової величини
125
100
75
50
25
0
7
14
21
День
mCD16-/- PBS
mCD16-/- hCD16A+ PBS
mCD16-/- hCD16A+B+ PBS
mCD16-/- 2.4G2-3G8
mCD16-/- hCD16A+ 2.4G2-3G8
mCD16-/- hCD16A+B+ 2.4G2-3G8

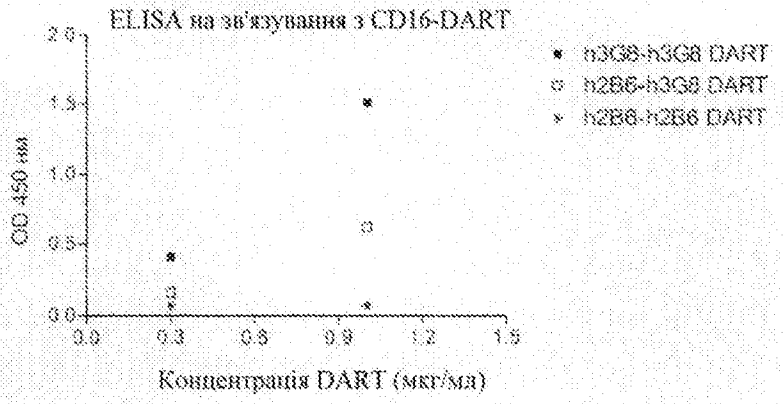
Фіг. 25


Виживаність мишей з моделлю клітин Raji (i.v.)
Процент виживаності
125
100
75
50
25
0
0
25
50
75
100
Дні
PBS (N=8)
MGD261 250 мкг (N=8)
MGD261 25 мкг (N=8)
MGD261 0.25 мкг (N=8)

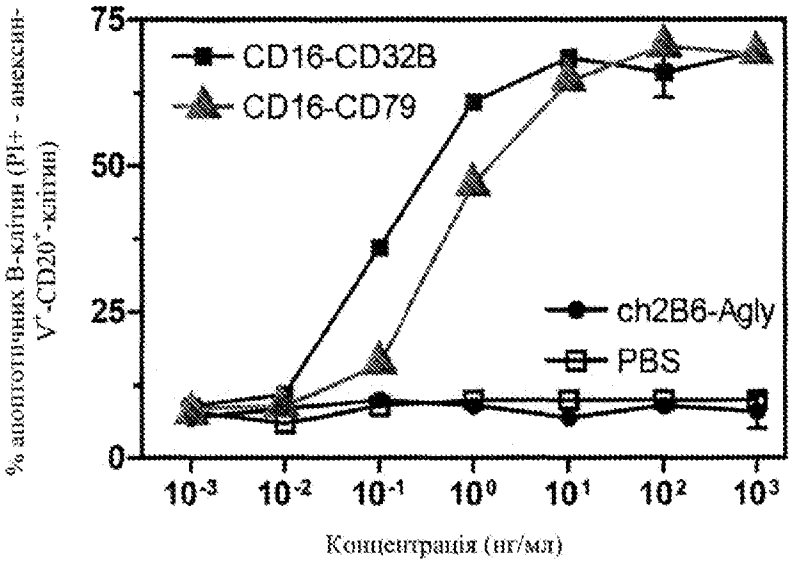
Фіг. 26


Експресований в E. coli DART 3G83G8 (електрофорез у ДСН-ПААГ, ЕХ)
mAU
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
3G8 3G8 DART
CHO
E.coli
E. coli 3G83G8 (Верхній)
CHO MGD261 (Нижній)
8.0
10.0
12.0
14.0
16.0
18.0
20.0
22.0
ml

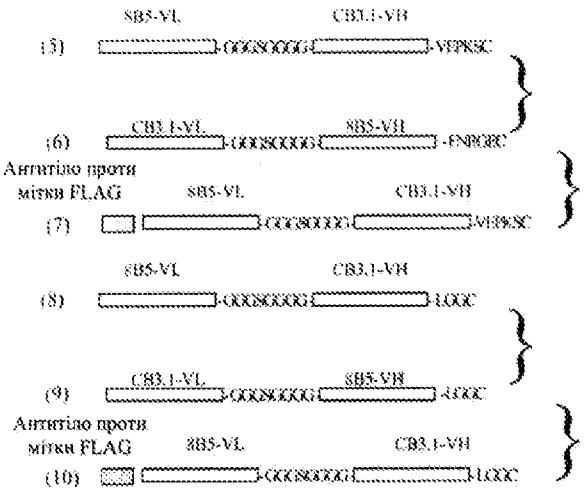
Фіг. 27


ELISA на зв'язування з CD16-DART
OD 450 нм
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.0
0.3
0.6
0.9
1.2
1.5
Концентрація DART (мкг/мл)
h3G8-h3G8 DART
h2B6-h3G8 DART
h2B6-h2B6 DART

Фіг. 28

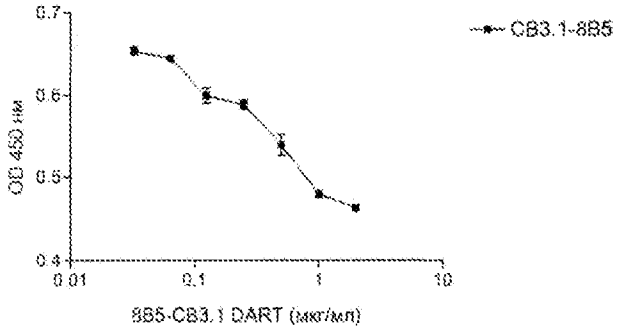

% апоптотичних В-клітин (PI+ - анексин-V+-CD20+-клітин)
75
50
25
0
CD16-CD32B
CD16-CD79
ch2B6-Agly
PBS
10-3
10-2
10-1
100
101
102
103
Концентрація (нг/мл)

Фіг. 29

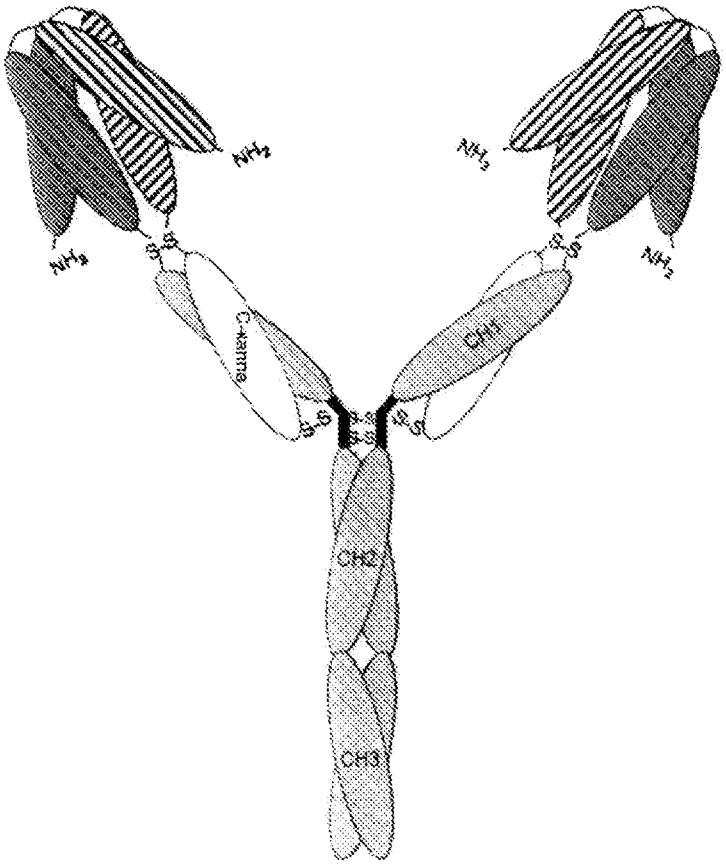


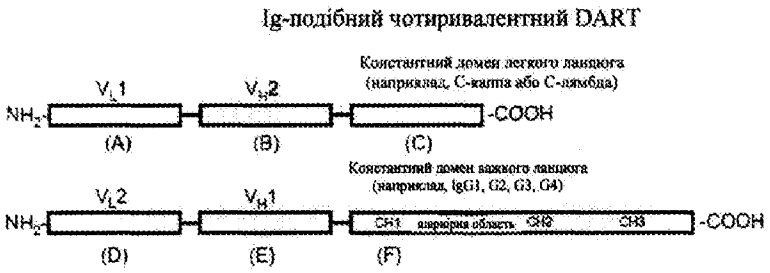
Фіг. 30

Аналіз на конкурентне зв'язування
8B5-CB3.1 DART/ch8B5



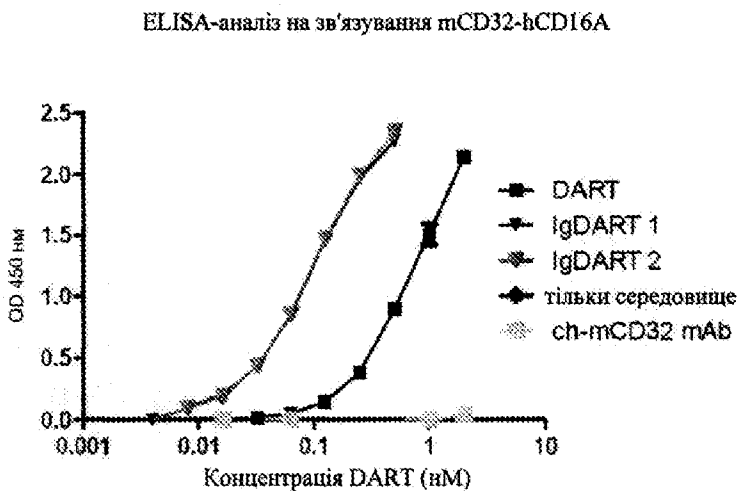
Фіг. 31


NH2
NH2
NH2
NH2
S
S
S

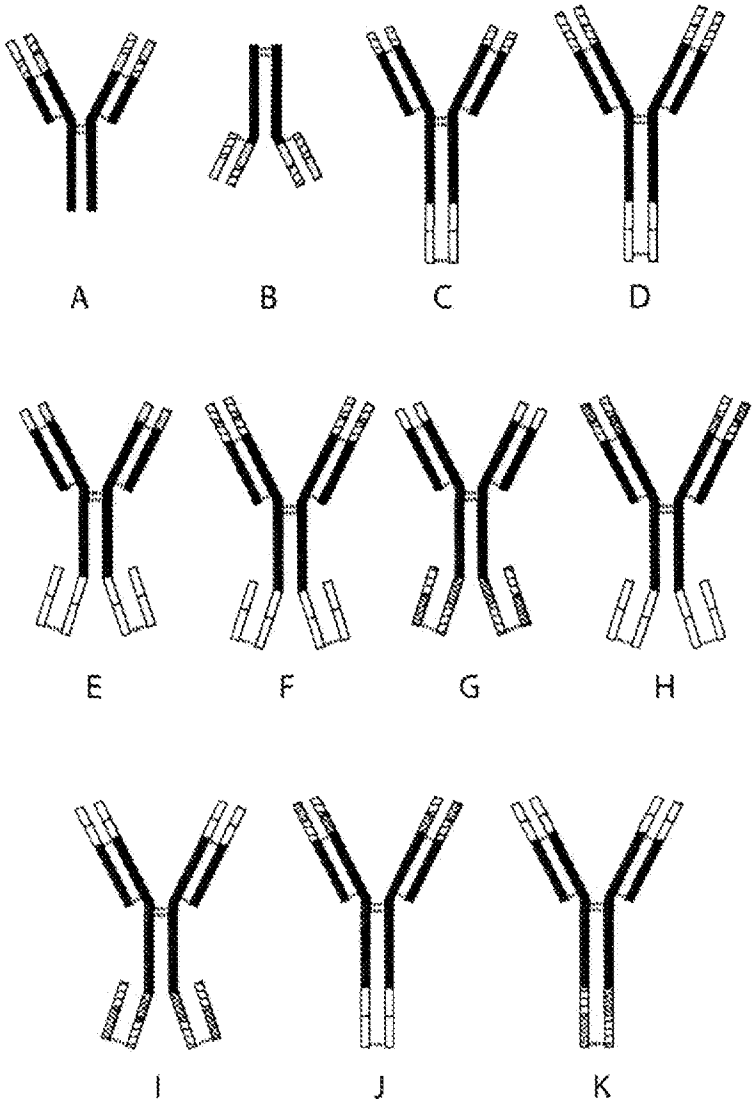


(A)+(E) = Сайт зв'язування з епітопом 1
(D)+(B) = Сайт зв'язування з епітопом 2
(C)+(F) = С-каппа/лямбда + CH1 (зв'язування, аналогічне зв'язуванню традиційного Ig) Шарнірна область - CH2-CH3 зв'язуються з утворенням Fc

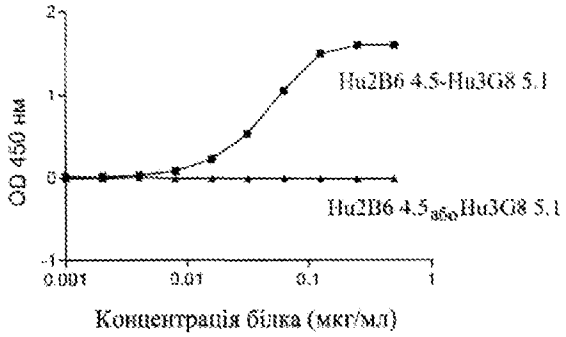
Фіг. 33



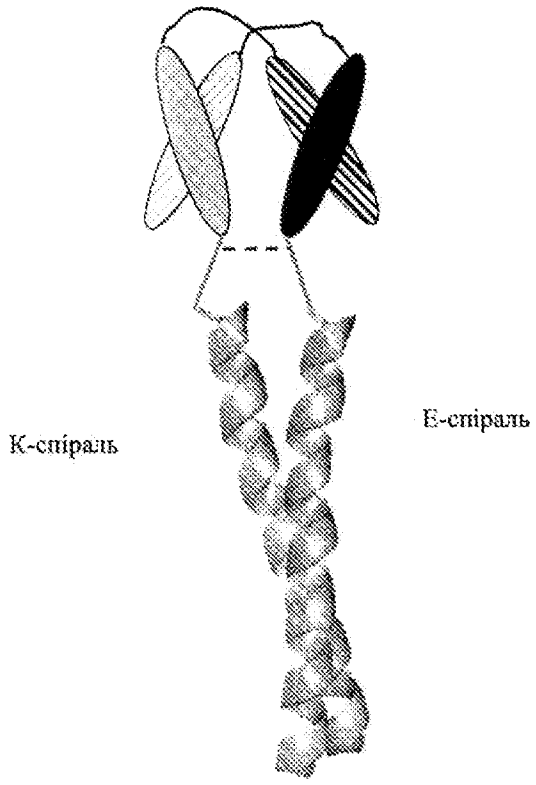
Фіг. 34


A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K

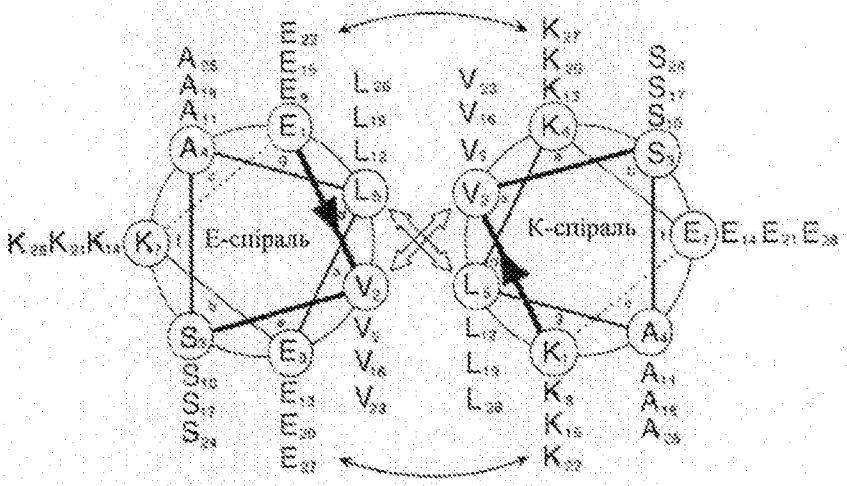
Фіг. 35


OD 450 нм
2
1
0
-1
0.001
0.01
0.1
1
Hu2B6 4.5-Hu3G8 5.1
Hu2B6 4.5$_{a50}$Hu3G8 5.1
Концентрація білка (мкг/мл)

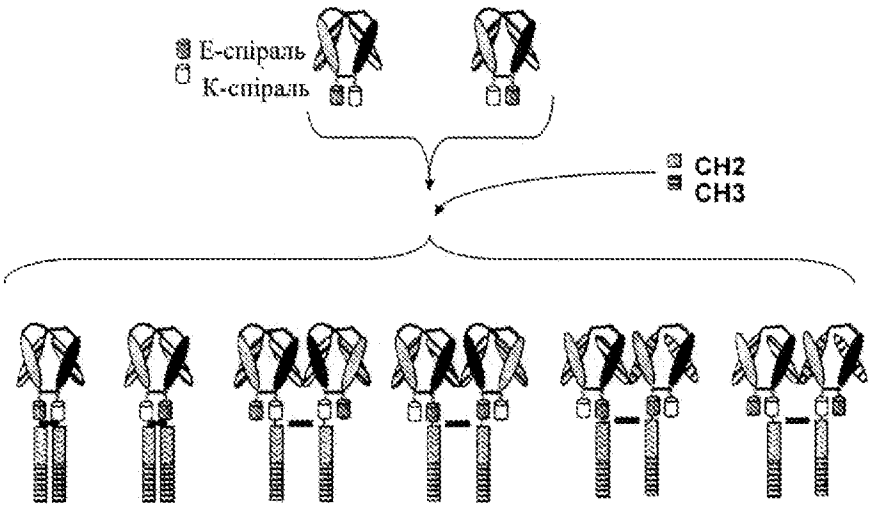
Фіг. 36



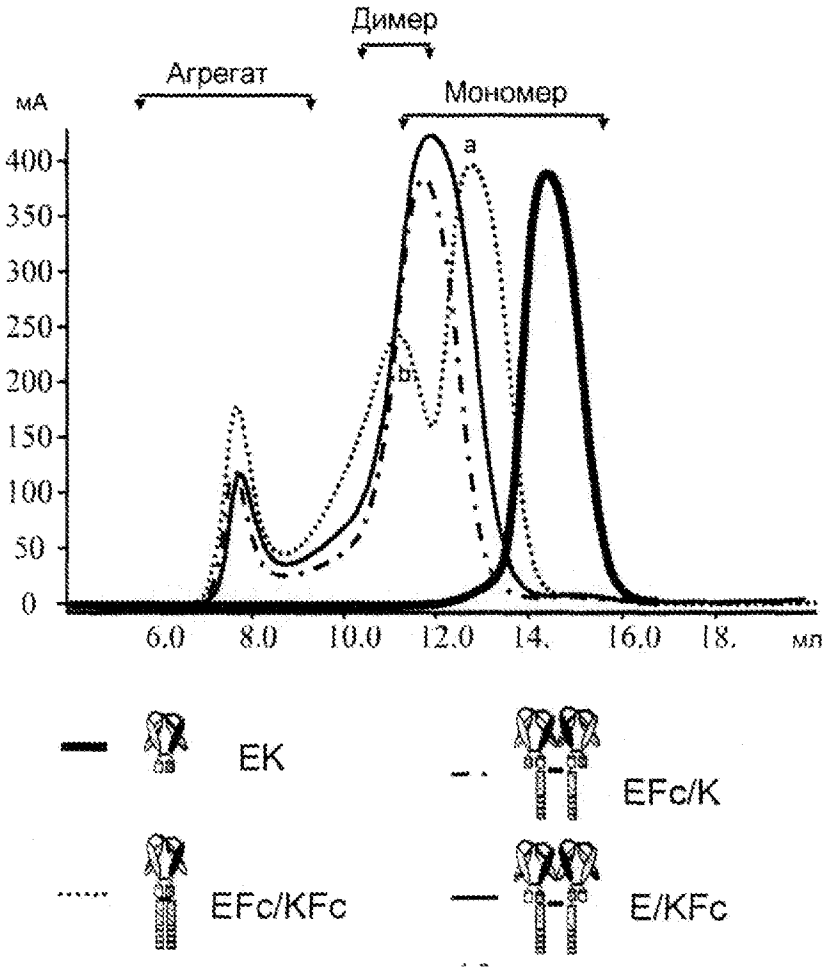
Фіг. 37



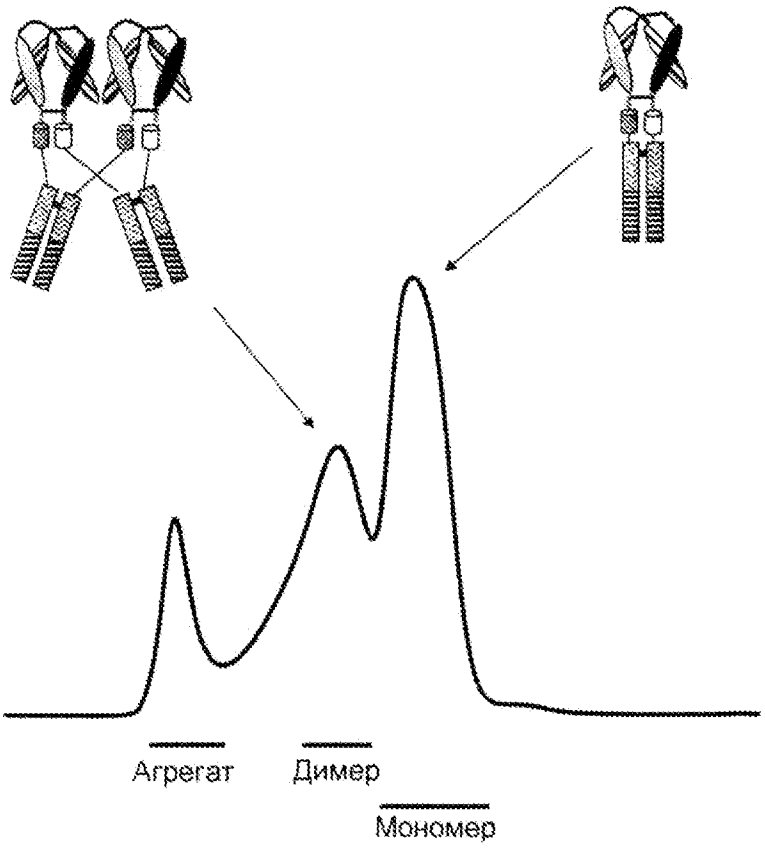
Фіг. 38



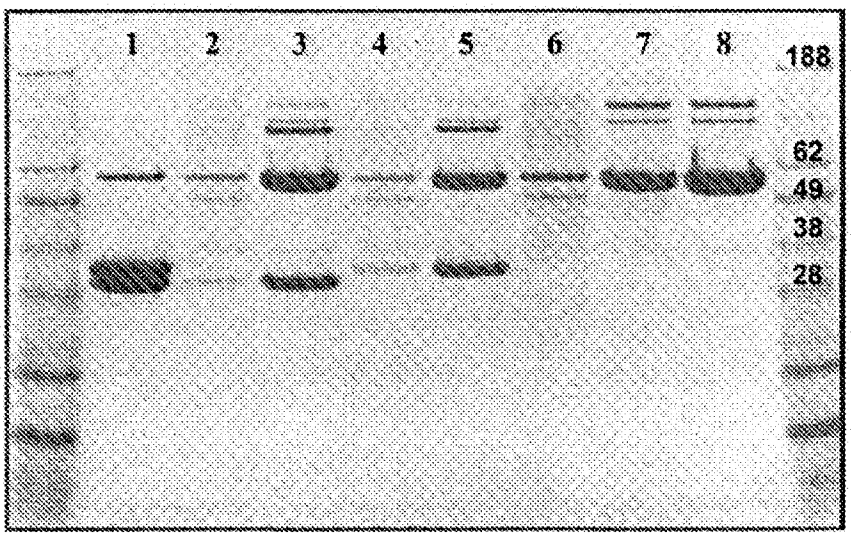
Фіг. 39


Димер
Агрегат
Мономер
мА
400
350
300
250
200
150
100
50
0
a
b
6.0
8.0
10.0
12.0
14.
16.0
18.
мл
EK
EFc/K
EFc/KFc
E/KFc

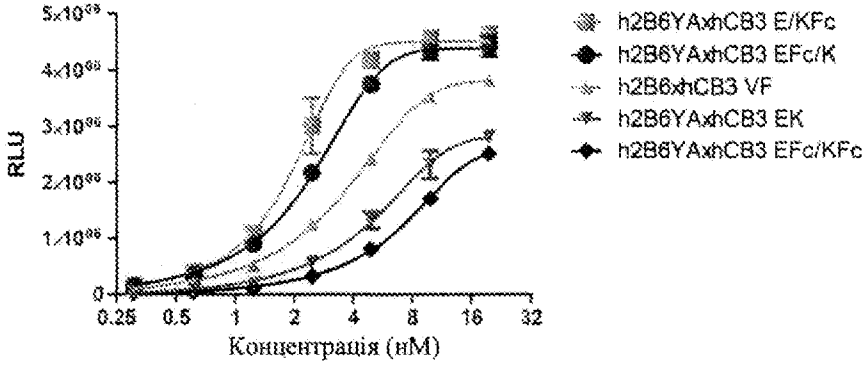
Фіг. 40



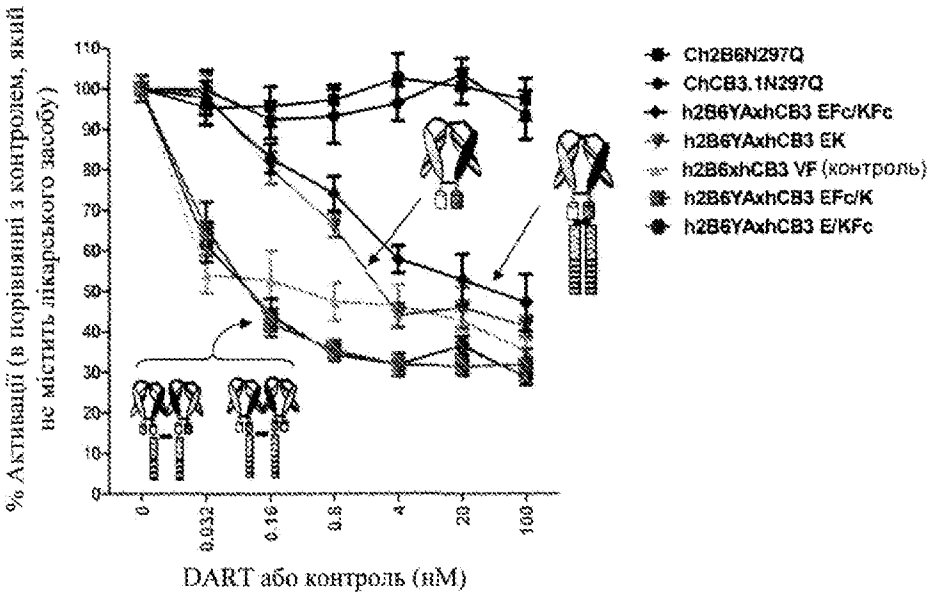
Фіг. 41


1
2
3
4
5
6
7
8
188
62
49
38
28

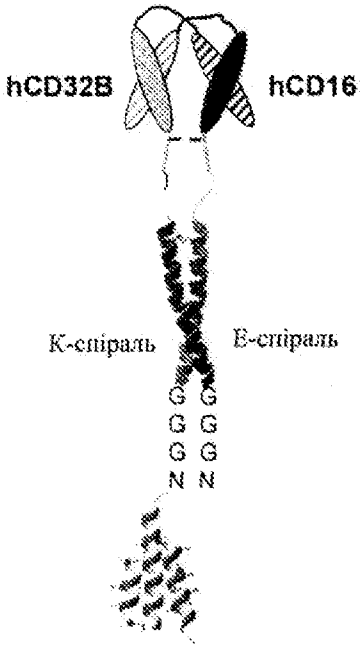
Фіг. 42


RLU
Концентрація (нМ)
0.25
0.5
1
2
4
8
16
32
h2B6YAxhCB3 E/KFc
h2B6YAxhCB3 EFc/K
h2B6xhCB3 VF
h2B6YAxhCB3 EK
h2B6YAxhCB3 EFc/KFc

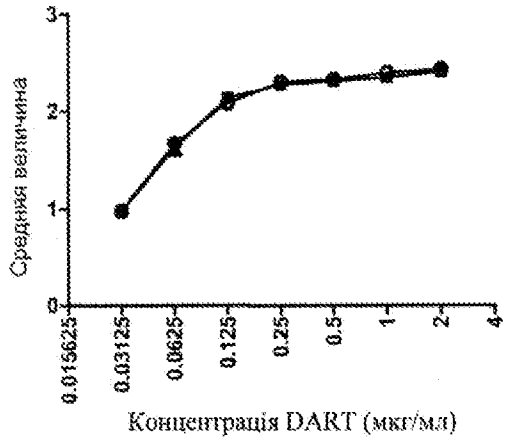
Фіг. 43


% Активації (в порівнянні з контролем, який не містить лікарського засобу)
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
0.032
0.16
0.8
4
20
100
DART або контроль (нМ)
Ch2B6N297Q
ChCB3.1N297Q
h2B6YAxhCB3 EFc/KFc
h2B6YAxhCB3 EK
h2B6xhCB3 VF (контроль)
h2B6YAxhCB3 EFc/K
h2B6YAxhCB3 E/KFc

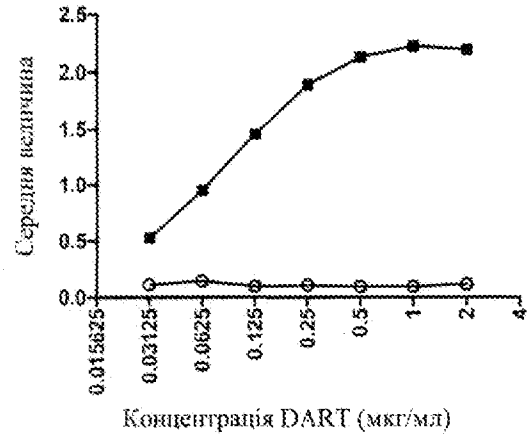
Фіг. 44


hCD32B
hCD16
K-спіраль
E-спіраль
G G
G G
G G
N N

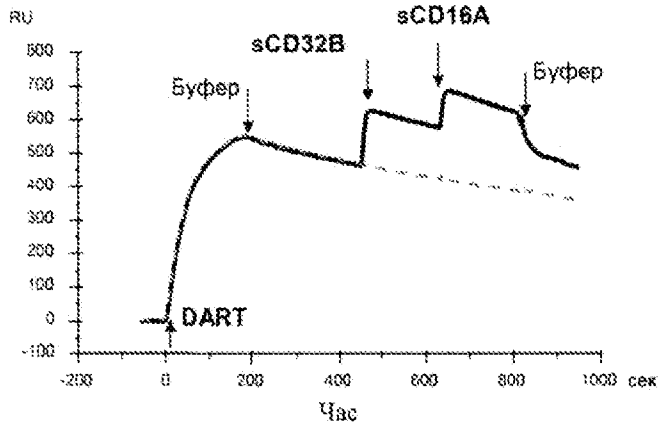
Фіг. 45



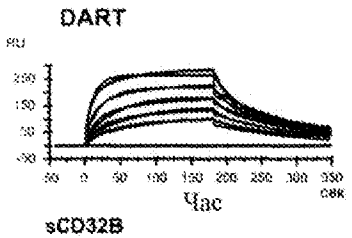
Фіг. 46A



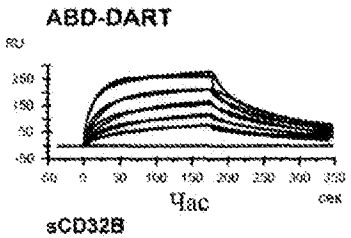
Фіг. 46B



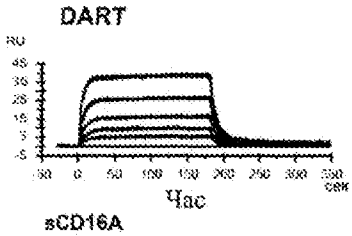
Фіг. 46C



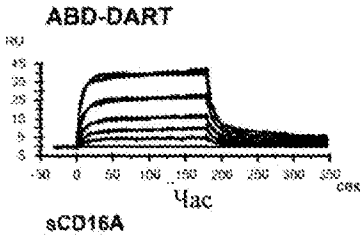
Фіг. 46D



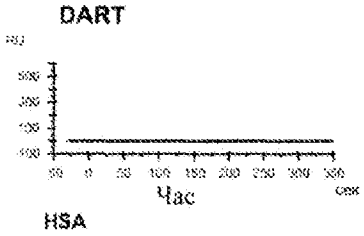
Фіг. 46E



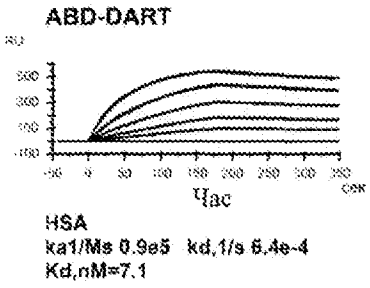
Фіг. 46F



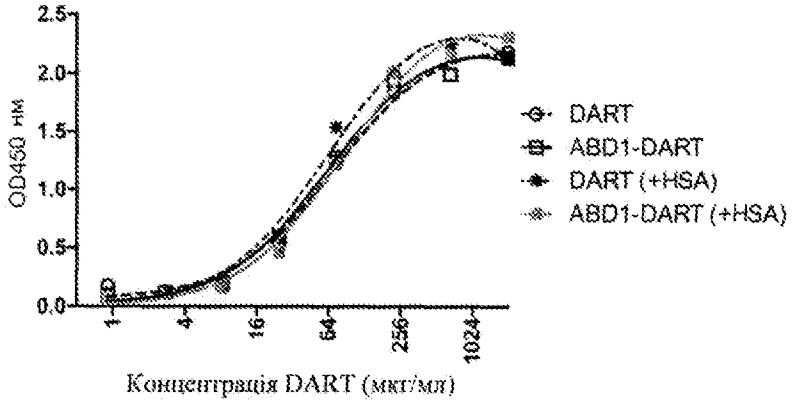
Фіг. 46G



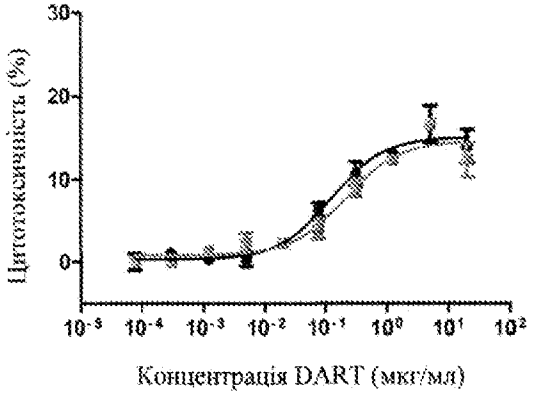
Фіг. 46H



Фіг. 46I



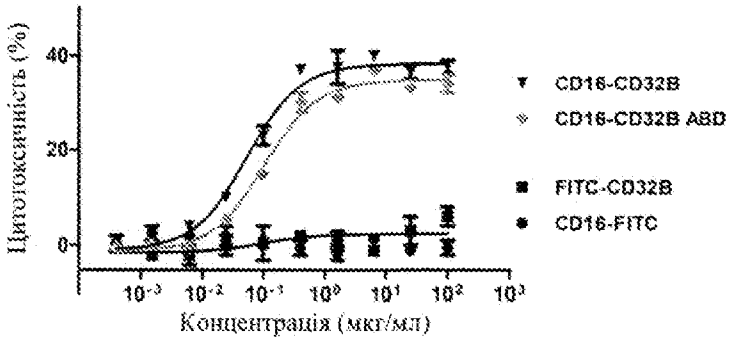
Фіг. 46J



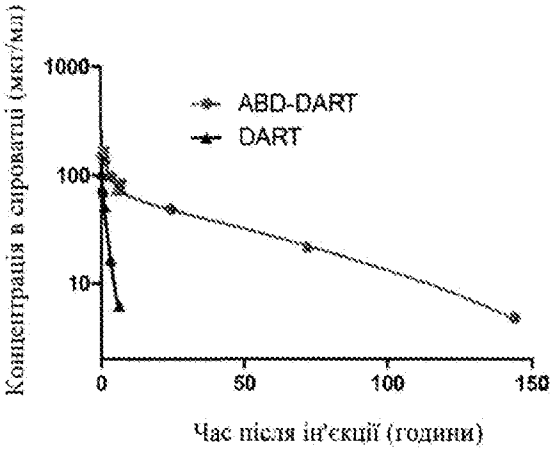
Фіг. 47A

Аналіз на перенацілений кілінг клітин Raji

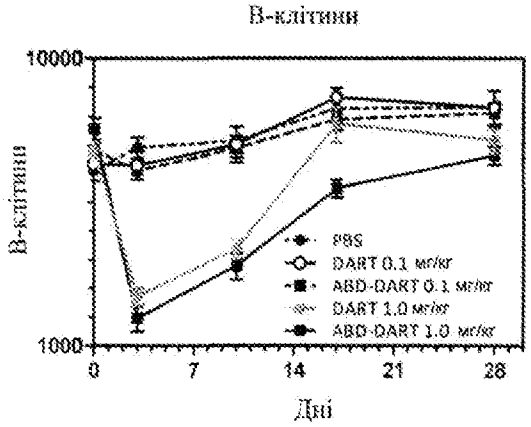
E:T= 20:1



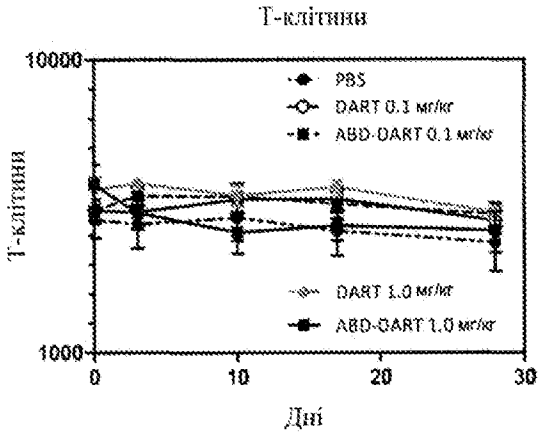
Фіг. 47B



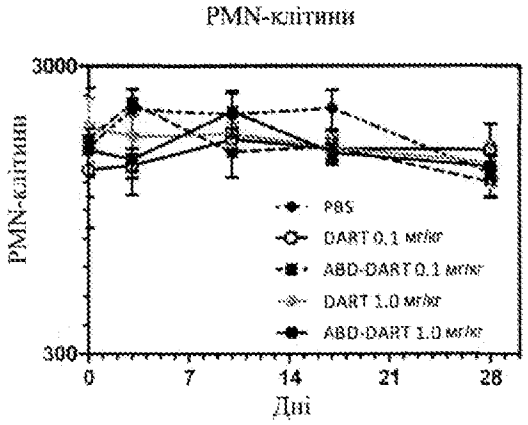
Фіг. 48



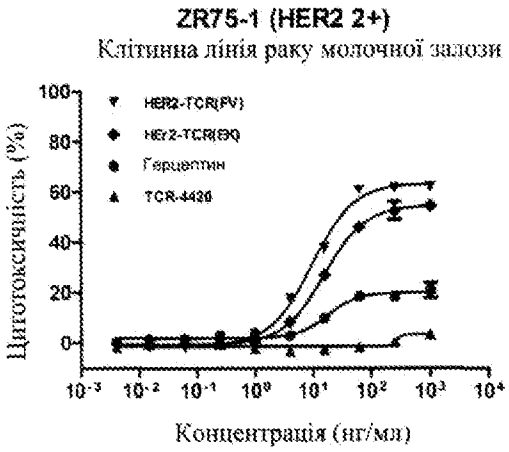
Фіг. 49А



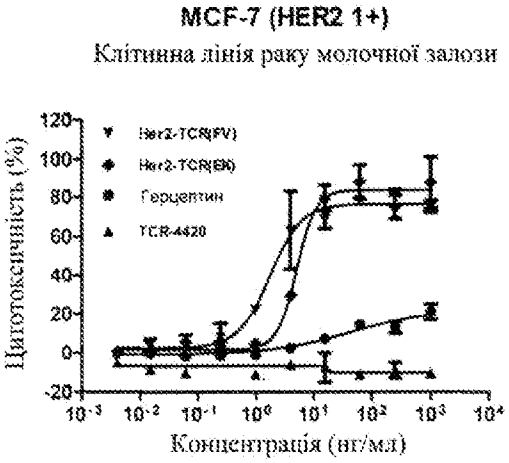
Фіг. 49B



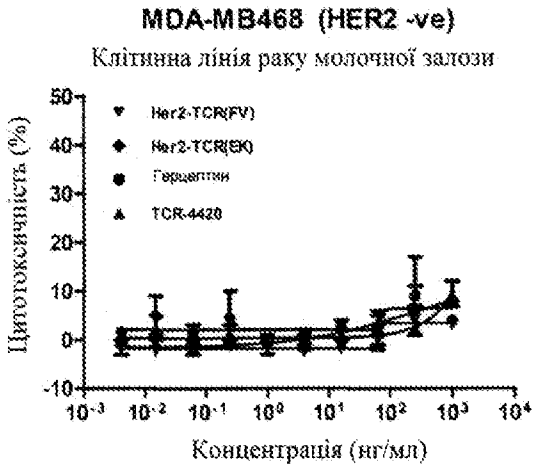
Фіг. 49C



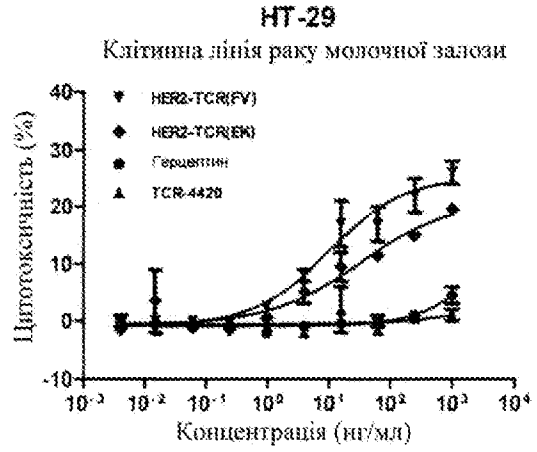
Фіг. 50A



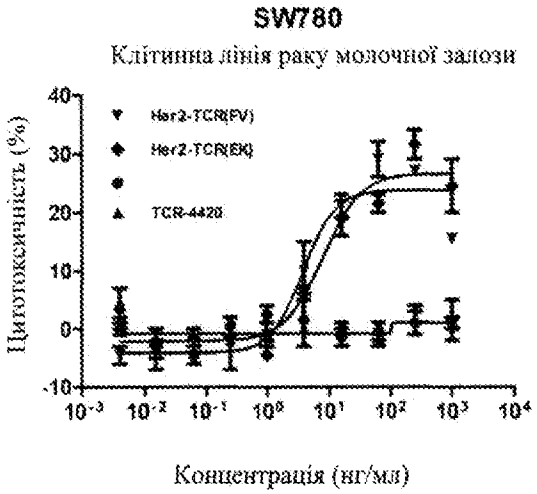
Фіг. 50B



Фіг. 50C

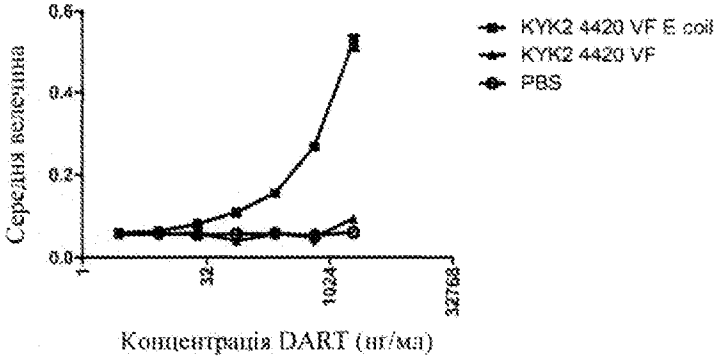


Фіг. 50D



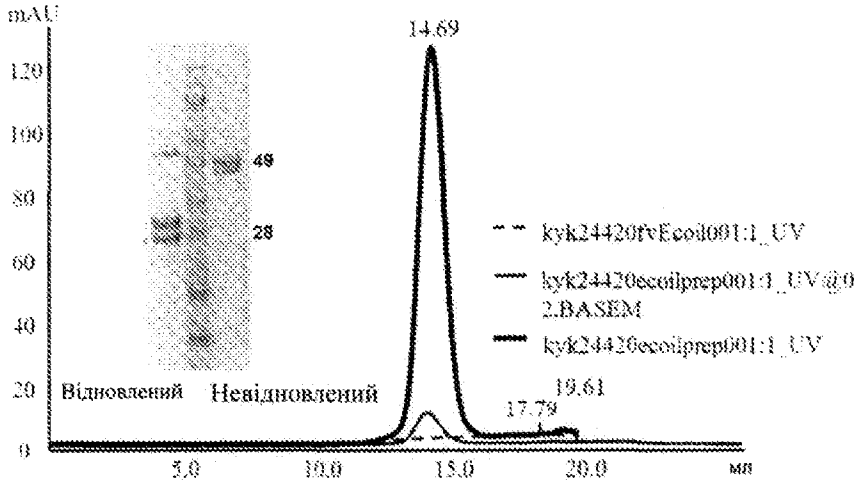
Фіг. 50E

Афінність очищеного KYK2-4420, захопленого sFITC і детектування з використанням поліклонального анти-ЕК антитіла 030210



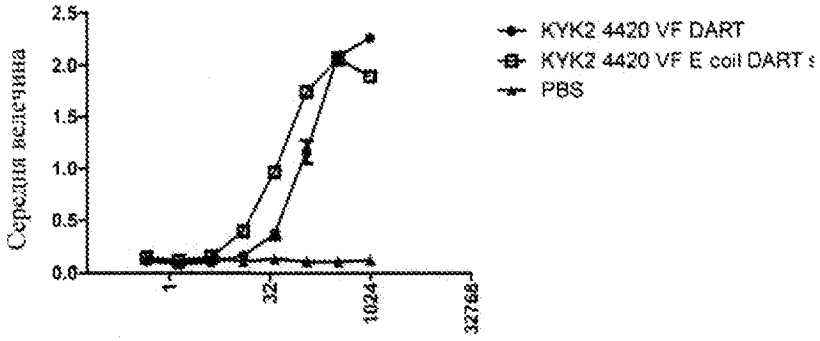
Фіг. 51A

KYK2-4420 VF-E-спіраль P312-009, перенесення у CHO, 0,45 мг/л очищеного MSA (альбуміну миші сироватки)



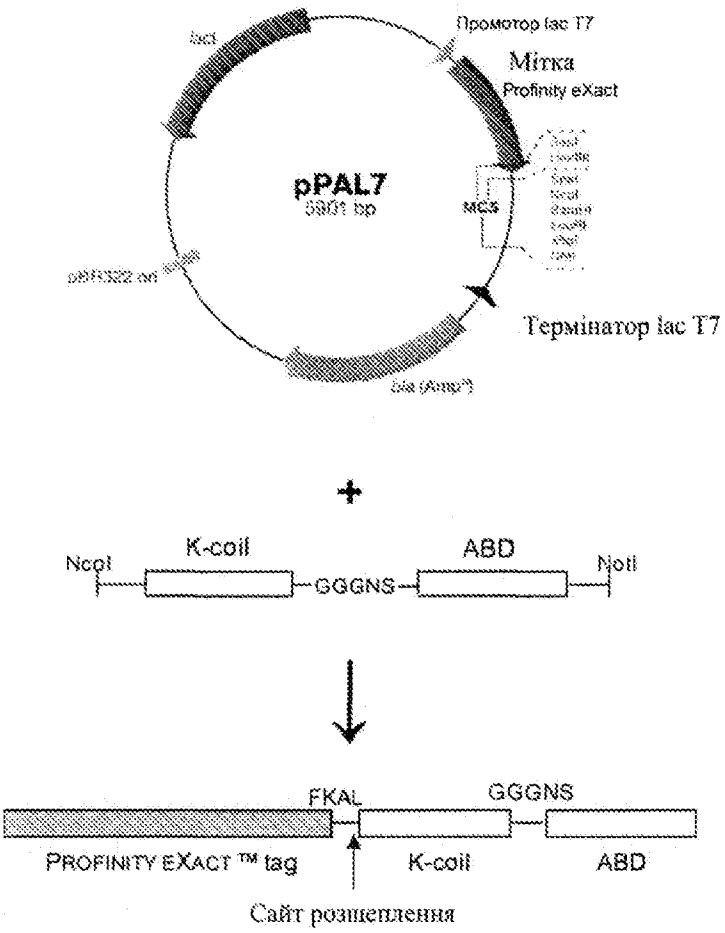
Фіг. 51B

KYK2-4420 VF-E-спіраль-DART, захопленого антигеном FITC і детектування з використанням анти-NKG2D Fc 012210

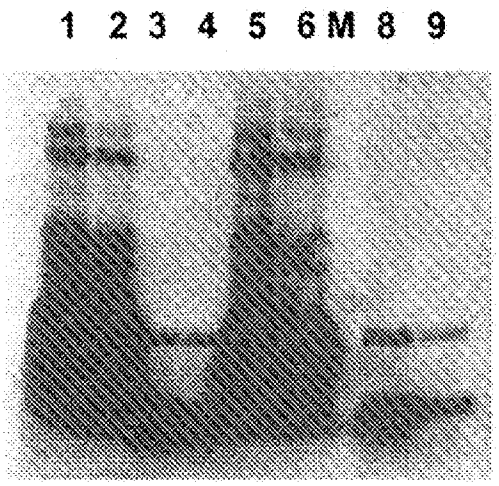


Концентрація DART (нг/мл)

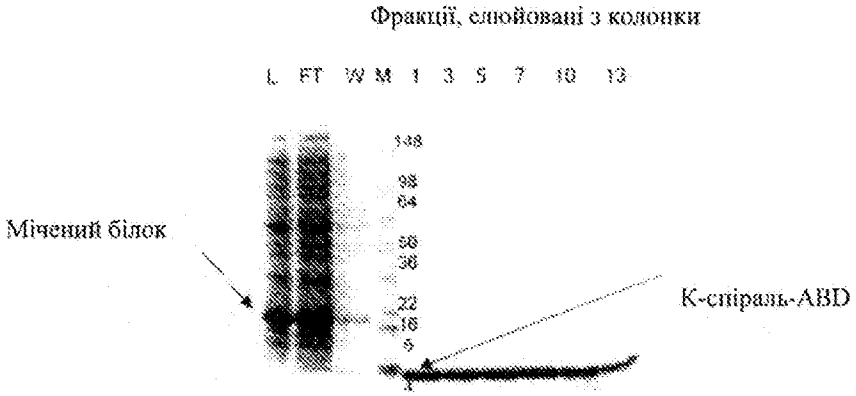
Фіг. 52


Промотор lac T7
Мітка
Profinity eXact
pPAL7
5801 bp
MCS
Термінатор lac T7
NcoI
K-coil
GGGNS
ABD
NotI
FKAL
GGGNS
PROFINITY EXACT ™ tag
K-coil
ABD
Сайт розщеплення
pPAL7 Kcoil-ABD

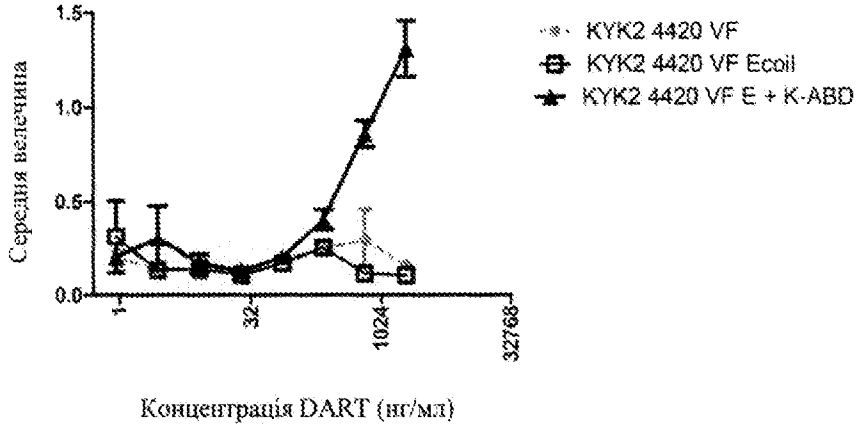
Фіг. 53


1 2 3 4 5 6 M 8 9

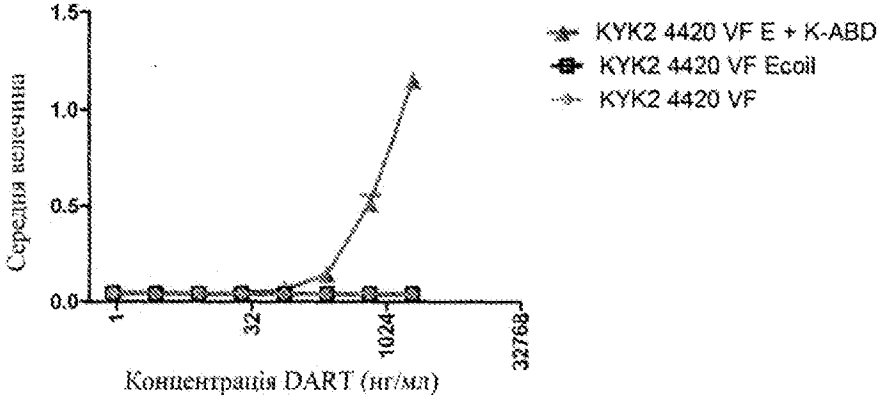
Фіг. 54


Фракції, елюйовані з колонки
L FT W M 1 3 5 7 10 13
148
98
64
50
36
22
16
6
Міченний білок
К-спіраль-ABD

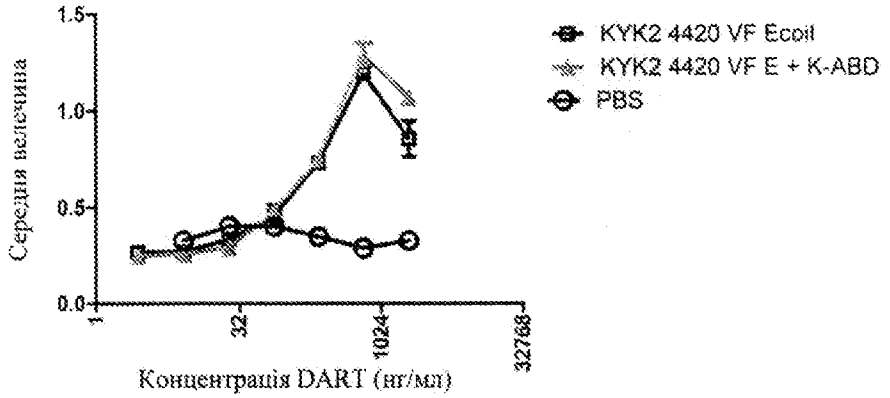
Фіг. 55



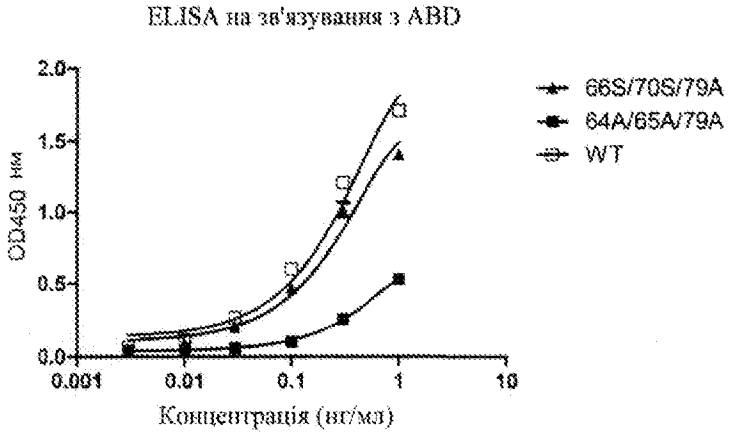
Фіг. 56A



Фіг. 56B



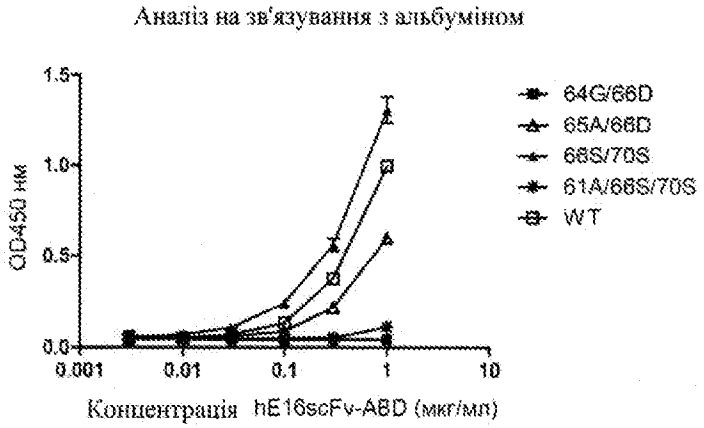
Фіг. 56C



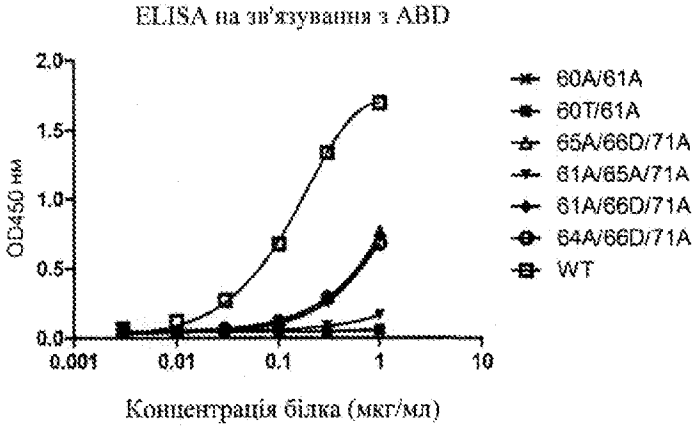
Фіг. 57

Аналіз на зв'язування з альбуміном
1.5
1.0
0.5
0.0
OD450 нм
0.001
0.01
0.1
1
10
61A/65A
61A/66D
64A/65A
64A/66D
WT
Концентрація hE16scFv-ABD (мкг/мл)

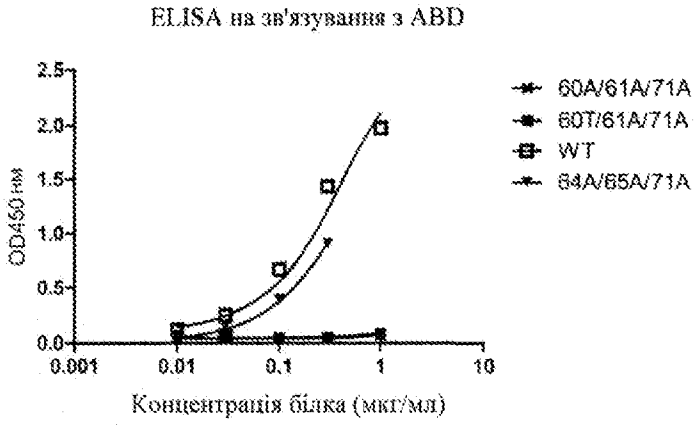
Фіг. 58


Аналіз на зв'язування з альбуміном
1.5
1.0
0.5
0.0
OD450 нм
0.001
0.01
0.1
1
10
64G/66D
65A/66D
68S/70S
61A/68S/70S
WT
Концентрація hE16scFv-ABD (мкг/мл)

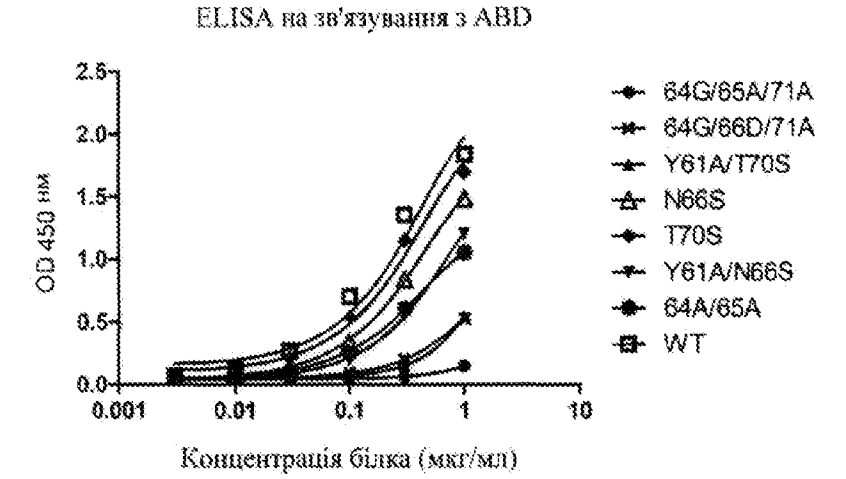
Фіг. 59


ELISA на зв'язування з ABD
OD450 нм
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.001
0.01
0.1
1
10
Концентрація білка (мкг/мл)
60A/61A
60T/61A
65A/66D/71A
61A/65A/71A
61A/66D/71A
64A/66D/71A
WT

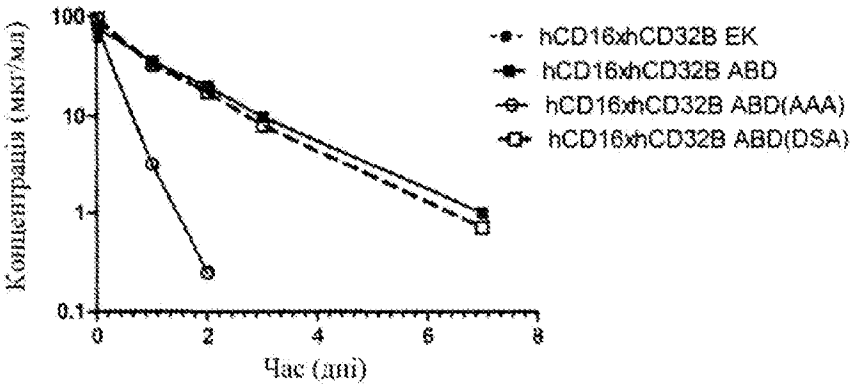
Фіг. 60


ELISA на зв'язування з ABD
OD450 нм
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.001
0.01
0.1
1
10
Концентрація білка (мкг/мл)
60A/61A/71A
60T/61A/71A
WT
64A/65A/71A

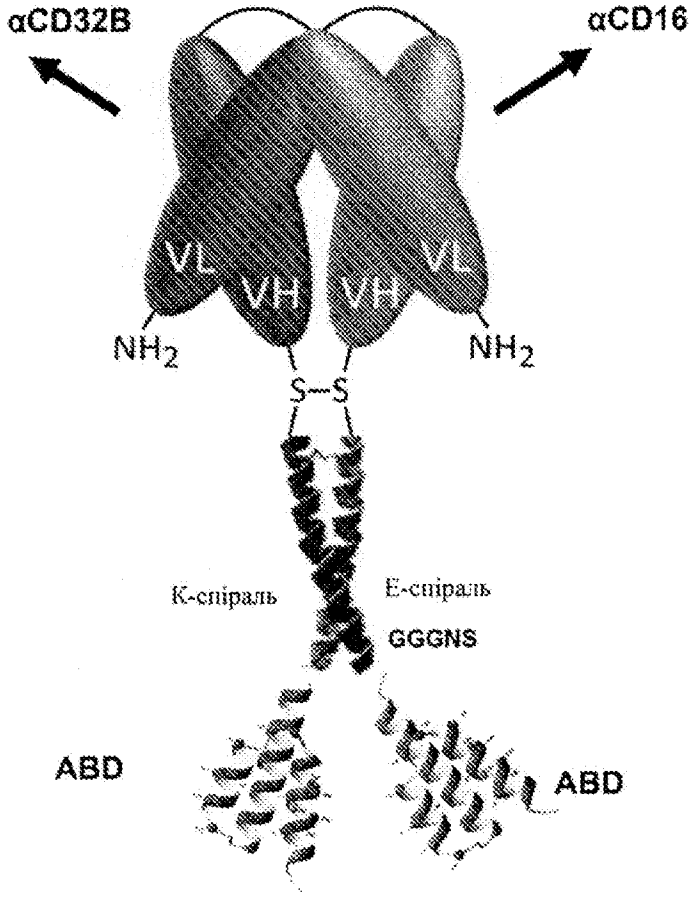
Фіг. 61


ELISA на зв'язування з ABD
OD 450 нм
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.001
0.01
0.1
1
10
Концентрація білка (мкг/мл)
64G/65A/71A
64G/66D/71A
Y61A/T70S
N66S
T70S
Y61A/N66S
64A/65A
WT

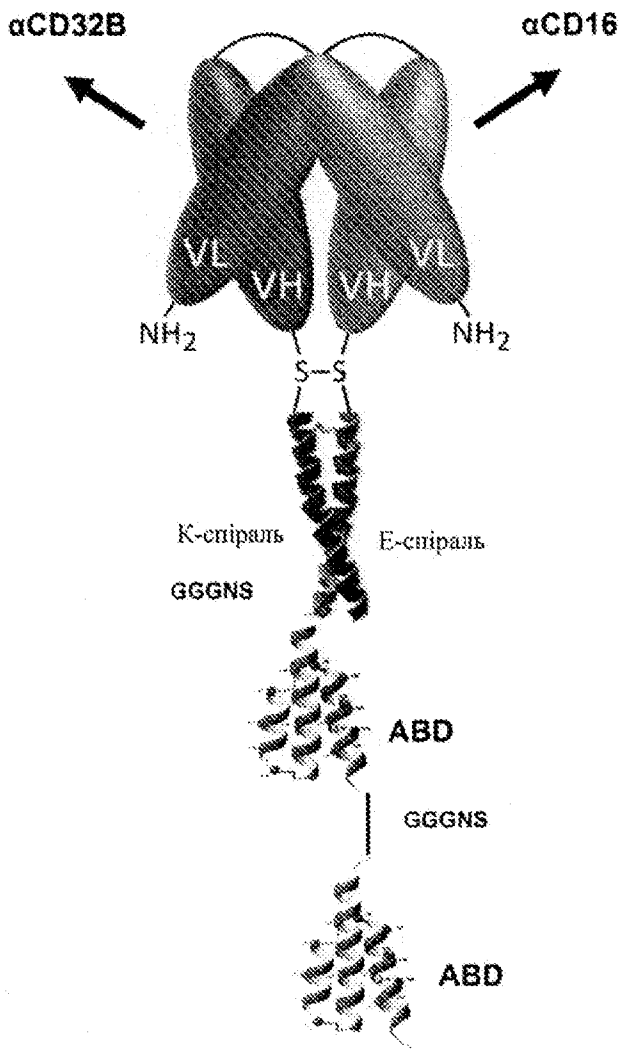
Фіг. 62


Концентрація (мкг/мл)
100
10
1
0.1
0
2
4
6
8
Час (дні)
hCD16xhCD32B EK
hCD16xhCD32B ABD
hCD16xhCD32B ABD(AAA)
hCD16xhCD32B ABD(DSA)

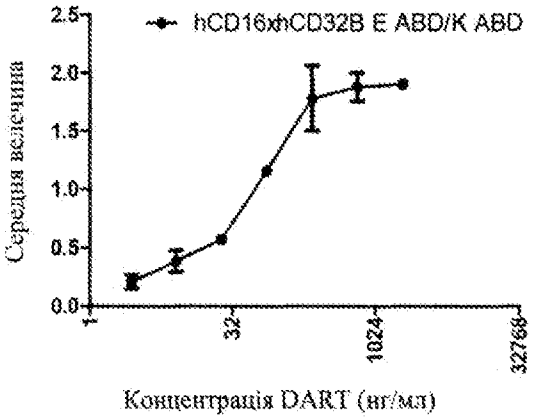
Фіг. 63


αCD32B
αCD16
VL
VH
VH
VL
NH2
NH2
S—S
K-спіраль
E-спіраль
GGGNS
ABD
ABD

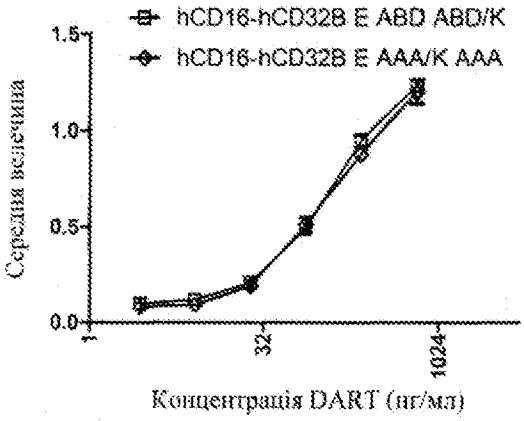
Фіг. 64A


αCD32B
αCD16
VL
VH
VH
VL
NH2
NH2
S—S
K-спіраль
E-спіраль
GGGNS
ABD
GGGNS
ABD

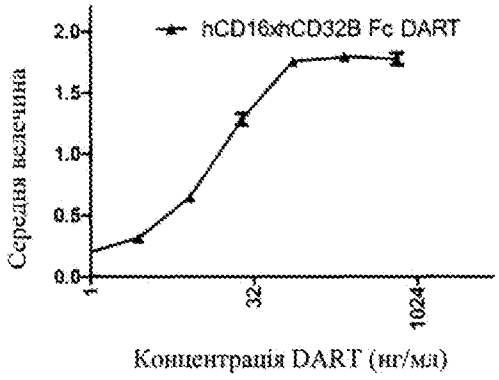
Фіг. 64B



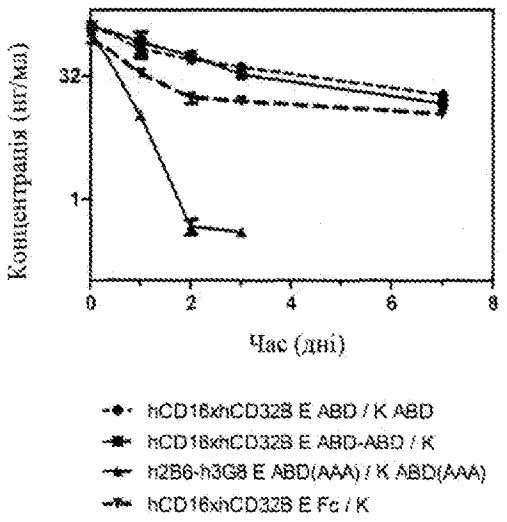
Фіг. 65A



Фіг. 65B



Фіг. 65C



Фіг. 66

Комп'ютерна верстка М. Мацело

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601