



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК

C07K 16/34 (2006.01)

C07K 16/36 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 16/005 (2021.08); C07K 16/36 (2021.08); C07K 2317/21 (2021.08); C07K 2317/33 (2021.08); C07K 2317/34 (2021.08); C07K 2317/35 (2021.08); C07K 2317/55 (2021.08); C07K 2317/76 (2021.08); C07K 2317/92 (2021.08); C07K 2319/21 (2021.08); C07K 2319/43 (2021.08); G01N 2333/9645 (2021.08); G01N 33/573 (2021.08); G01N 33/86 (2021.08)

(21)(22) Заявка: 2018138782, 16.05.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
16.05.2017

Дата регистрации:
14.04.2022

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
16.05.2016 US 62/337,118;
24.05.2016 US 62/340,834

(43) Дата публикации заявки: 17.06.2020 Бюл. № 17

(45) Опубликовано: 14.04.2022 Бюл. № 11

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 17.12.2018

(86) Заявка РСТ:
US 2017/032808 (16.05.2017)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2017/200981 (23.11.2017)

Адрес для переписки:
119019, Москва, б-р Гоголевский, 11, Гоулинг
ВЛГ (Интернэшнл) Инк.

(72) Автор(ы):

ФЁЛЬКЕЛЬ Дирк (АТ),
ПАХЛИНГЕР Роберт (АТ),
РОТТЕНШТАЙНЕР Ханспетер (АТ),
ВЕБЕР Альфред (АТ),
ЭНГЕЛЬМАЙЕР Андреа (АТ)

(73) Патентообладатель(и):

ТАКЕДА ФАРМАСЬЮТИКАЛ
КОМПАНИ ЛИМИТЕД (JP)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2015/086406 A2, 18.06.2015. WO
2016/004113 A1, 07.01.2016. SIMIONI P et al. "X-
linked thrombophilia with a mutant factor IX
(factor IX Padua)", N Engl J Med, 2009, Vol. 361,
No. 17, pp. 1671-1675. FINN JD et al. "The
efficacy and the risk of immunogenicity of FIX
Padua (R338L) in hemophilia B dogs treated by
AAV muscle gene therapy", BLOOD, (см.
прод.)

(54) АНТИТЕЛА К ФАКТОРУ IX PADUA

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Описана группа изобретений, включающая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывает фактор IX Padua, полипептид, который связывает фактор IX Padua, конъюгат, который связывает фактор IX Padua, содержащий вышеуказанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент или полипептид,

нуклеиновая кислота, вектор экспрессии, клетку-хозяин, набор для детекции фактора IX Padua, композиция для детекции фактора IX Padua (варианты), применение антител, или антигенсвязывающего фрагмента, полипептида, конъюгата, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки-хозяина и набора для детекции фактора IX Padua в образце и способ детекции фактора IX Padua в полученном от субъекта образце. В одном

из вариантов реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность SSY AIS (SEQ ID NO: 6); GIVPAFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO: 7); SWGVISFAY (SEQ ID NO: 8);

RASQDISSYLN (SEQ ID NO: 9); AASNLS (SEQ ID NO: 10); и MQYDSLPTF (SEQ ID NO: 11). Изобретение расширяет арсенал средств для связывания фактора IX Padua. 11 н. и 38 з.п. ф-лы, 32 ил., 1 табл., 5 пр.

(56) (продолжение):

2012, Vol. 120, No. 23, pp. 4521-4523. CRUDELE JM et al. "AAV liver expression of FIX-Padua prevents and eradicates FIX inhibitor without increasing thrombogenicity in hemophilia B dogs and mice", Blood, 2015, Vol. 125, No. 10, pp. 1553-1561. RU 2002/109586 A 10.03.2004.

RU 2770006 C2

RU 2770006 C2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C07K 16/34 (2006.01)*C07K 16/36* (2006.01)*C12N 5/10* (2006.01)*C12N 15/13* (2006.01)*C12N 15/63* (2006.01)*G01N 33/50* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C07K 16/005 (2021.08); *C07K 16/36* (2021.08); *C07K 2317/21* (2021.08); *C07K 2317/33* (2021.08); *C07K 2317/34* (2021.08); *C07K 2317/35* (2021.08); *C07K 2317/55* (2021.08); *C07K 2317/76* (2021.08); *C07K 2317/92* (2021.08); *C07K 2319/21* (2021.08); *C07K 2319/43* (2021.08); *G01N 2333/9645* (2021.08); *G01N 33/573* (2021.08); *G01N 33/86* (2021.08)

(21)(22) Application: **2018138782, 16.05.2017**

(24) Effective date for property rights:
16.05.2017

Registration date:
14.04.2022

Priority:

(30) Convention priority:
16.05.2016 US 62/337,118;
24.05.2016 US 62/340,834

(43) Application published: **17.06.2020** Bull. № 17(45) Date of publication: **14.04.2022** Bull. № 11(85) Commencement of national phase: **17.12.2018**

(86) PCT application:
US 2017/032808 (16.05.2017)

(87) PCT publication:
WO 2017/200981 (23.11.2017)

Mail address:
119019, Moskva, b-r Gogolevskij, 11, Gouling VLG
(Interneshnl) Ink.

(72) Inventor(s):

VOELKEL, Dirk (AT),
PACHLINGER, Robert (AT),
ROTTENSTEINER, Hanspeter (AT),
WEBER, Alfred (AT),
ENGELMAIER, Andrea (AT)

(73) Proprietor(s):

TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY
LIMITED (JP)

(54) **IX PADUA FACTOR ANTIBODIES**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: group of inventions is described, including an antibody or its antigen-binding fragment that binds IX Padua factor, polypeptide that binds IX Padua factor, a conjugate that binds IX Padua factor, containing the above-mentioned antibody or antigen-binding fragment, or polypeptide, nucleic acid, an expression vector, a host cell, a kit for the detection of IX Padua factor, a composition for the detection of IX Padua factor (options), use of antibodies or an antigen-

binding fragment, polypeptide, a conjugate, nucleic acid, a vector, a host cell and a kit for the detection of IX Padua factor in a sample, and a method for the detection of IX Padua factor in a sample obtained from a subject. In one of embodiments, the antibody or its antigen-binding fragment contains an amino acid sequence SSYAIS (SEQ ID NO: 6); GIVPAFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO: 7); SWGVISFAY (SEQ ID NO: 8); RASQDISSYLN (SEQ ID NO: 9); AASNLS (SEQ ID NO: 10); and

MQYDSLPTF (SEQ ID NO: 11).
EFFECT: invention expands the arsenal of means

for binding IX Padua factor.
49 cl, 32 dwg, 1 tbl, 5 ex

R U 2 7 7 0 0 0 6 C 2

R U 2 7 7 0 0 0 6 C 2

Ссылка на родственные заявки

Согласно настоящей заявке на выдачу патента испрашивается преимущество приоритета в соответствии с 35 USC § 119 (e) по предварительным заявкам на выдачу патента США № 62/337118, поданной 16 мая 2016 года, и 62/340834, поданной 24 мая 2016 года, при этом обе они включены в настоящее описание посредством ссылки во всей их полноте.

Включение посредством ссылки материала, представленного в электронном виде

Посредством ссылки во всей его полноте включен машиночитаемый перечень нуклеотидных/аминокислотных последовательностей, представленный одновременно с настоящим документом и имеющий следующие характеристики: файл в формате ASCII (текстовый), размером 28804 байт, под названием «50573_SeqListing.txt», созданный 16 мая 2016 года.

Уровень техники

Генная терапия остается весьма перспективным направлением в качестве будущего варианта лечения гемофилии. В одном клиническом исследовании субъектов с тяжелой формой гемофилии В лечат вектором на основе аденоассоциированного вируса (AAV), который кодирует фактор IX (FIX) Padua - гиперфункциональный вариант FIX с единственной аминокислотной заменой Leu на Arg в положении 338 последовательности зрелого пептида (или в положении 384 последовательности препробелка). Для оценки успеха замены фактора было бы полезным специфическое детектирование трансгенного продукта (FIX Padua). Тем не менее, специфическое детектирование FIX Padua у проходящих лечение пациентов остается проблематичным, поскольку некоторые пациенты имеют материал, который является перекрестно-реактивным с фактором IX (CRM). У некоторых CRM-положительных (CRM+) пациентов экспрессируется, например, фактор IX дикого типа (WT), который перекрестно реагирует с имеющимися в настоящее время средствами, которые связывают FIX Padua, что затрудняет определение того, экспрессируется ли FIX Padua у таких CRM+ пациентов.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к связывающимся конструкциям, которые специфически распознают FIX Padua (FIXr) без перекрестной реактивности с FIX дикого типа. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, связывающаяся конструкция представляет собой антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывает FIX Padua, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и не связывается с фактором IX WT, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, связывающаяся конструкция представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, в каждой из которой содержится SEQ ID NO: 6-11, необязательно причем (i) между каждой из SEQ ID NO: 6-11 присутствует одна или несколько аминокислот, и/или (ii) полипептид необязательно дополнительно содержит метку FLAG, содержащую DYKDDDDK (SEQ ID NO: 12), и/или гекса-His метку, содержащую НННННН (SEQ ID NO: 13), необязательно причем метка FLAG и/или гекса-His метка расположена на С-конце полипептида. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, связывающаяся конструкция представляет собой конъюгат, содержащий описываемый в настоящем документе антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированный с (i) константным участком тяжелой цепи иммуноглобулина, (ii) с константным участком легкой цепи иммуноглобулина или (iii) как с константным участком тяжелой цепи иммуноглобулина, так и с константным участком легкой цепи иммуноглобулина. В соответствии с

иллюстративными вариантами осуществления, связывающаяся конструкция представляет собой конъюгат, содержащий описываемое в настоящем документе антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, связанное или конъюгированное с гетерологичным фрагментом. Согласно иллюстративным аспектам, конъюгат содержит описываемое в настоящем документе антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированное с полимером, углеводом, липидом, нуклеиновой кислотой, олигонуклеотидом, аминокислотой, пептидом, полипептидом, белком или индикаторным средством.

Кроме того, настоящее изобретение относится к нуклеиновым кислотам, содержащим нуклеотидную последовательность, кодирующую описываемое в настоящем документе антитело, антигенсвязывающий фрагмент, полипептид, конъюгат или его фрагмент. Дополнительно настоящее изобретение относится к векторам, содержащим такую нуклеиновую кислоту, и к клеткам-хозяевам, содержащим такую нуклеиновую кислоту или вектор.

Также настоящее изобретение относится к соответствующим наборам. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, набор содержит описываемое в настоящем документе антитело, антигенсвязывающий фрагмент, полипептид, конъюгат, нуклеиновую кислоту, вектор, клетку-хозяина или их комбинацию и, необязательно, инструкции по применению. Согласно иллюстративным аспектам, набор также содержит твердую подложку, и, необязательно, на эту твердую подложку предварительно нанесено антитело, антигенсвязывающий фрагмент, полипептид или конъюгат. Согласно иллюстративным аспектам, набор также содержит вторичное антитело, которое связывается с представленным в наборе антителом, антигенсвязывающим фрагментом, полипептидом или конъюгатом.

Настоящее изобретение дополнительно относится к композициям, содержащим описываемые в настоящем документе антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, или полипептид, или конъюгат, смешиваемые с биологическим образцом, например биологическим образцом, полученным от человека. Согласно иллюстративным аспектам, биологический образец содержит плазму крови человека или ее разведенную фракцию и/или ткань человека или ее клетки. Согласно иллюстративным аспектам, биологический образец содержит белки плазмы крови человека, причем по меньшей мере один из белков плазмы крови человека выбран из группы, состоящей из фактора IX, фактора II и фактора X и их вариантов. Необязательно, композиция содержит индикаторное средство.

Такие связывающиеся конструкции, которые представлены в настоящем документе, пригодны, например, в способах детекции, которые позволяют производить однозначную или специфическую детекцию FIX Padua в образцах, например, клинических или доклинических образцах, содержащих, например, FIX дикого типа. Соответственно, настоящее изобретение относится к способам детекции фактора IX Padua, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, в образце, полученном от субъекта. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, способ предусматривает (i) приведение в контакт образца со связывающейся конструкцией (например, описываемым в настоящем документе антителом, антигенсвязывающим фрагментом, полипептидом или конъюгатом) для формирования комплекса, например, иммунокомплекса, содержащего FIXp и связывающуюся конструкцию, и (ii) детекцию комплекса в образце.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлена схема аминокислотных последовательностей фактора IX WT

и FIX Padua.

На фиг. 2 представлен график сигналов связывания FIX Padua (левая секция) или фактора IX WT (правая секция) с Ni^{2+} планшетами, покрытыми 5 мкг/мл BC1 (синие столбцы, наиболее близкие к Z-оси (т.е. расположенные слева)), 1 мкг/мл BC1 (красные столбцы, справа от синих столбцов), 0,2 мкг/мл BC1 (зеленые столбцы, расположенные рядом с красными столбцами) или 0,04 мкг/мл BC1.

На фиг. 3 представлен график сигналов связывания BC1 (треугольники), BC2 (ромбы) или BC3 (квадраты), которые нанесены на планшеты MaxiSorp, с FIX Padua в указанной концентрации.

На фиг. 4 представлен график сигналов связывания BC1 с FIX Padua в указанной концентрации в 5% растворе плазмы крови человека, содержащем 5 мкг/мл фактора IX WT без бензамидина.

На фиг. 5 представлен график сигналов связывания BC1 с FIX Padua в указанной концентрации в 2% BSA/PBS (ромбы), 5% растворе плазмы крови, содержащем 50 мМ бензамидина (квадраты), 10% растворе плазмы крови, содержащем 50 мМ бензамидина (треугольники), или 20% растворе плазмы крови, содержащем 50 мМ бензамидина (кресты).

На фиг. 6 представлен график сигналов связывания BC1 (квадраты), BC2 (треугольники), BC4 (ромбы) или отрицательного контроля (кресты) с FIX Padua в указанной концентрации в 20% (об./об.) растворе плазмы крови, содержащем фактор IX WT и 50 мМ бензамидина.

На фиг. 7 представлены два графика сигналов связывания BC1 (левая секция) и BC4 (правая секция) с факторами свертывания в указанной концентрации: FIX Padua (ромбы); фактором II (квадраты) и фактором X (треугольники).

На фиг. 8 представлены два графика сигналов связывания BC5 (левая секция) и BC6 (правая секция) с фактором IX WT (ромбы) или FIX Padua (квадраты) в указанных концентрациях (мкг/мл).

На фиг. 9 представлена схема компонентов ИФА, описанного в примере 2.

На фиг. 10 представлена схема компонентов ИФА, описанного в примере 1.

На фиг. 11 представлен график кривых зависимости концентрации от ответа в ИФА на FIX Padua с применением образца, содержащего FIX Padua (круги) или эталонного образца плазмы крови человека (ромбы).

На фиг. 12 представлен график калибровочной кривой в ИФА на FIX Padua с применением шести стандартов указанных количеств FIX Padua (стандарты D1-D6).

На фиг. 13 представлен график кривых зависимости разведения от ответа в ИФА на FIX Padua с применением FIX Padua в буфере, или в нормальной плазме крови, или в FIX-дефицитной плазме крови.

На фиг. 14 представлен график кривых зависимости разведения от ответа в ИФА на FIX Padua с применением образцов цитратной плазмы крови обезьян.

На фиг. 15 представлен график свертывающей активности и результатов измерения белков образцов одного субъекта с материалом, который является перекрестно-реактивным с FIX (CRM+), после обработки вирусным вектором AAV2/8, экспрессирующим FIX Padua.

На фиг. 16 представлен график свертывающей активности и результатов измерения белков образцов второго субъекта с материалом, который является перекрестно-реактивным с FIX (CRM+), после обработки вирусным вектором AAV2/8, экспрессирующим FIX Padua.

На фиг. 17 представлен график свертывающей активности и результатов измерения

белков образцов субъекта без материала, который является перекрестно-реактивным с FIX (CRM+), после обработки вирусным вектором AAV2/8, экспрессирующим FIX Padua.

На фиг. 18 представлен график сигнала в зависимости от концентрации FIX, где сигнал получают с помощью анализа FIX Padua-специфической хромогенной активности.

На фиг. 19 изображено схематическое представление стратегий получения FIX Padua-специфических Fab и последовательностей применяемых пептидов для пэннинга и блокировки (L338 в FIX Padua обозначен красным цветом и выделен рамкой, R338 в FIX wt обозначен зеленым цветом и выделен рамкой).

На фиг. 20 представлена схематичная структура очищенных миниантител (бивалентных Fab).

На фиг. 21 представлена (фиг. 21A) рентгеновская структура свиного FIXа и показано, что Arg338 расположен на поверхности тяжелой цепи свиного FIXа, и (фиг. 21B) схема человеческого FIX Padua и показан Leu338.

На фиг. 22 представлен график, из которого видно, что очищенные Fab специфически связываются с антигенами FIX Padua, но не с FIX wt. На фиг. 22 представлен график результатов ИФА, полученных от очищенных бивалентных Fab к антигенам wt и Padua. Бивалентные Fab, полученные в результате различных стратегий пэннинга, тестировали в отношении специфичности к пептиду и белку wt и Padua. Результаты представлены как кратное увеличение относительно фонового значения (фиг. 22A), а на (фиг. 22B) показана схема проведения ИФА. Порядок столбцов такой же, как в легенде (т.е. столбец Ab42 находится слева). Подробнее см. описание способов в примере 5.

На фиг. 23 представлен график, из которого видно, что очищенные бивалентные Fab не проявляют перекрестной реактивности к FIX wt в матрице 20% плазмы крови человека. На фиг. 23 представлен график результатов ИФА очищенных бивалентных Fab в присутствии 20% плазмы крови. (Фиг. 23A). Очищенные бивалентные Fab наносили покрытием и инкубировали с 20% плазмой крови человека, содержащей 5 мкг/мл FIX wt и обозначенные концентрации FIX Padua. Детекцию осуществляли с помощью HRP-меченого поликлонального антитела козы к FIX (100 нг/мл). (Фиг. 23B) Схема проведения ИФА. Линии имеют тот же порядок, что и в легенде.

На фиг. 24 представлен график, посредством которого продемонстрированы результаты анализа с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) отобранного кандидата Ab42. (Фиг. 24A) His-меченное миниантитело Ab42 связывается с FIX Padua с $KD = 59$ нМ ($k_a: 4,3 \times 10^4$ 1/Мс; $k_d: 0,002531$ 1/с), (фиг. 24B), но не с FIX wt на сенсорном биочипе NTA-BIAcore. Пунктирные линии представляют необработанные данные, в то время как сплошными линиями указаны аппроксимированные данные. Линии имеют тот же порядок, что и в легенде.

На фиг. 25 представлена иллюстрация иммуноанализа.

На фиг. 26 представлен график, демонстрирующий селективность анализа, которая представлена кривыми зависимости концентрации от ответа, полученными для очищенного образца FIXp и свежемороженого эталонного препарата плазмы крови с нормальной концентрацией FIX 5 мкг/мл, что демонстрирует селективность данного анализа. В случае плазмы крови человека практически не наблюдали ответа.

На фиг. 27 представлен график в виде 6-точечных калибровочных кривых для диапазона от 0,85 до 27,1 нг FIXp/мл, которые имели достаточную линейность. Их точность была продемонстрирована коэффициентами корреляции r , низкими относительными общими ошибками (RTE) и результатами подхода с использованием метода замещений.

На фиг. 28 представлен набор графиков, с помощью которых продемонстрированы результаты исследования параллельности в нормальной и FIX-дефицитной плазме крови. Угловые коэффициенты кривых зависимости разведения от ответа плазмы крови с повышенным FIXr отличались на <5% от значений угловых коэффициентов, полученных для серии разведений буфером, что свидетельствует о том, что матрица плазмы крови не влияла на результаты анализа.

На фиг. 29 представлен график, демонстрирующий влияние Ca^{2+} на чувствительность ИФА. Показано явное увеличение чувствительности, вызванное Ca^{2+} , которое очень вероятно обусловлено поликлональным детектирующим антителом и Ca-зависимым EGF-доменом в FIX.

На фиг. 30 представлен набор графиков, с помощью которых продемонстрированы результаты анализа образцов цитратной плазмы крови от первого пациента, обработанного вирусным вектором AAV2/8, в ходе 1-й/2-й фаз испытания. Образец плазмы крови, полученный от первого пациента, был положительным по материалу, который является перекрестно-реактивным с FIX (CRM+).

На фиг. 31 представлен набор графиков, с помощью которых продемонстрированы результаты анализа образцов цитратной плазмы крови от второго пациента, обработанного вирусным вектором AAV2/8, в ходе 1-й/2-й фаз испытания. Образец плазмы крови, полученный от второго пациента, был положительным по материалу, который является перекрестно-реактивным с FIX (CRM+).

На фиг. 32 представлен набор графиков, с помощью которых продемонстрированы результаты анализа образцов цитратной плазмы крови от третьего пациента, обработанного вирусным вектором AAV2/8, в ходе 1-й/2-й фаз испытания. Образец плазмы крови, полученный от третьего пациента, не был положительным по материалу, который является перекрестно-реактивным с FIX (CRM+).

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к связывающимся конструкциям, которые специфически распознают FIX Padua с минимальной перекрестной реактивностью с FIX дикого типа или вовсе без нее. Согласно иллюстративным аспектам, связывающиеся конструкции связываются с FIX Padua и не связываются с фактором IX дикого типа (WT). Согласно иллюстративным аспектам, связывающиеся конструкции связываются с FIX Padua (и не связываются с фактором IX WT) в присутствии фактора IX WT. Согласно иллюстративным аспектам, связывающиеся конструкции связываются с FIX Padua и не связываются с фактором IX WT и с одним из фактора II и фактора X или обоими из них, или с любыми другими мутантными или модифицированными их формами (за исключением FIX Padua) при схожих или таких же условиях. Согласно иллюстративным аспектам, связывающиеся конструкции связываются с FIX Padua и не связываются ни с фактором II, ни с фактором X. Согласно иллюстративным аспектам, связывающиеся конструкции связываются с FIX Padua и не связываются ни с одним из фактора IX WT, фактора II и фактора X. Согласно иллюстративным аспектам, связывающиеся конструкции связываются с FIX Padua и (не связываются с фактором IX WT, фактором II и фактором IX) в присутствии фактора IX WT, фактора II и фактора IX. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, связывающиеся конструкции связываются с эпитопом FIX Padua (SEQ ID NO: 1) даже в растворе, содержащем уровни фактора IX WT, фактора II и фактора X, которые присутствуют в плазме крови человека.

Эпитопы

Под «эпитопом» в настоящем контексте понимают участок из или в пределах FIX

Padua, который связывается связывающейся конструкцией. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, эпитоп представляет собой линейный эпитоп. В контексте настоящего документа термин «линейный эпитоп» обозначает участок из или в пределах FIX Padua, который связывается связывающейся конструкцией, и такой участок состоит из смежных аминокислот аминокислотной последовательности FIX Padua. Аминокислоты линейного эпитопа являются смежными друг относительно друга в первичной структуре фактора IX Padua. Соответственно, линейный эпитоп представляет собой фрагмент или часть аминокислотной последовательности антигена, т.е. FIX Padua.

В соответствии с другими иллюстративными вариантами осуществления, эпитоп представляет собой конформационный или структурный эпитоп. Под «конформационным эпитопом» или «структурным эпитопом» понимают эпитоп, который состоит из аминокислот, которые расположены в непосредственной близости друг от друга, когда фактор IX Padua находится в правильно сложенном состоянии. В отличие от линейных эпитопов, аминокислоты конформационного или структурного эпитопа не должны быть смежными друг относительно друга в первичной структуре (т.е. в аминокислотной последовательности) FIX Padua. Конформационный или структурный эпитоп необязательно состоит из смежных аминокислот аминокислотной последовательности антигена (FIXp).

В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, связывающаяся конструкция связывается с эпитопом FIX Padua, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, причем такой эпитоп является линейным эпитопом в пределах аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1. Согласно иллюстративным аспектам, линейный эпитоп находится в пределах аминокислотной последовательности DRATCLLSTKFT (SEQ ID NO: 3). Согласно иллюстративным аспектам, линейный эпитоп содержит по меньшей мере L-L из SEQ ID NO: 3. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, связывающаяся конструкция связывается с линейным эпитопом FIX Padua даже в присутствии фактора IX WT, фактора II и/или фактора X. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, связывающаяся конструкция связывается с эпитопом FIX Padua даже в присутствии 5 мкг/мл фактора IX WT. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, связывающаяся конструкция связывается с эпитопом FIX Padua даже в присутствии 5 мкг/мл фактора IX WT и в матрице 20% плазмы крови человека.

Согласно иллюстративным аспектам, связывающаяся конструкция не связывается с эпитопом FIX WT. Согласно иллюстративным аспектам, связывающаяся конструкция не связывается с эпитопом в пределах SEQ ID NO: 2, или в пределах DRATCLRSTKFT (SEQ ID NO: 14), или в пределах LVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFH (SEQ ID NO: 15). Согласно иллюстративным аспектам, связывающаяся конструкция не связывается с эпитопом FIX WT в схожих или таких же условиях, при которых связывающаяся конструкция связывается с FIX Padua. Согласно иллюстративным аспектам, связывающаяся конструкция не связывается с эпитопом FIX WT в растворе, содержащем нормальные для плазмы крови уровни FIX WT. Согласно иллюстративным аспектам, связывающаяся конструкция не связывается с эпитопом FIX WT в растворе (например, в буфере), содержащем 5 мкг/мл FIX WT (например, в матрице плазмы крови человека, содержащей приблизительно 5 мкг/мл FIX WT).

В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, связывающаяся конструкция связывается с эпитопом FIX Padua (SEQ ID NO: 1), причем такой эпитоп является конформационным эпитопом сложной структуры аминокислотной последовательности LVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFH (SEQ ID NO: 5). В соответствии

с иллюстративными вариантами осуществления, связывающаяся конструкция связывается с эпитопом FIX Padua (SEQ ID NO: 1), причем такой эпитоп является конформационным эпитопом сложной структуры аминокислотной последовательности LVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFH (SEQ ID NO: 5), при этом

5 такая сложная структура содержит дисульфидный мостик. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, связывающаяся конструкция связывается с конформационным эпитопом FIX Padua даже в присутствии фактора IX WT, фактора II и/или фактора X. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, связывающаяся конструкция связывается с эпитопом FIX Padua даже в присутствии 5

10 мкг/мл фактора IX WT.

Аффинность и авидность

Представленные в настоящем документе связывающиеся конструкции связываются с FIX Padua нековалентным и обратимым образом. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, силу связывания связывающейся конструкции к FIX Padua

15 можно описать через призму ее аффинности, т.е. показателя силы взаимодействия между сайтом связывания связывающейся конструкции и эпитопом. Согласно иллюстративным аспектам, представленные в настоящем документе связывающиеся конструкции обладают высокой аффинностью к FIX Padua и, следовательно, будут связывать большее количество FIX Padua за более короткий период времени, чем низкоаффинные

20 связывающиеся конструкции. Согласно иллюстративным аспектам, связывающаяся конструкция характеризуется равновесной константой ассоциации, K_A , которая составляет по меньшей мере 10^5 моль⁻¹, по меньшей мере 10^6 моль⁻¹, по меньшей мере 10^7 моль⁻¹, по меньшей мере 10^8 моль⁻¹, по меньшей мере 10^9 моль⁻¹ или по меньшей

25 мере 10^{10} моль⁻¹. Согласно иллюстративным аспектам, представленные в настоящем документе связывающиеся конструкции характеризуются высокой аффинностью к FIX Padua в плазме крови человека. Согласно иллюстративным аспектам, связывающаяся конструкция связывается с фактором IX Padua и не связывается с фактором IX WT в образце, содержащем плазму крови человека. Согласно иллюстративным аспектам,

30 связывающаяся конструкция связывается с фактором IX Padua и не связывается с фактором IX WT в образце, содержащем по меньшей мере или приблизительно 5% плазмы крови человека (например, матрицу 5% плазмы крови человека). Согласно иллюстративным аспектам, связывающаяся конструкция связывается с фактором IX Padua и не связывается с фактором IX WT в образце, содержащем по меньшей мере или

35 приблизительно 10% плазмы крови человека (например, матрицу 10% плазмы крови человека). Согласно иллюстративным аспектам, связывающаяся конструкция связывается с фактором IX Padua и не связывается с фактором IX WT в образце, содержащем по меньшей мере или приблизительно 20% плазмы крови человека (например, матрицу 20% плазмы крови человека). Согласно иллюстративным аспектам,

40 связывающаяся конструкция связывается с фактором IX Padua и не связывается с фактором IX WT в образце, содержащем по меньшей мере или от приблизительно 5% до приблизительно 40%, от приблизительно 10% до приблизительно 30% или от приблизительно 15% до приблизительно 20% плазмы крови человека. Согласно иллюстративным аспектам, связывающаяся конструкция связывается с фактором IX Padua даже при наличии в образце существенного количества фактора IX WT. Согласно

45 иллюстративным аспектам, связывающаяся конструкция связывается с фактором IX Padua и не связывается с фактором IX WT в образце, содержащем некоторое количество плазмы крови человека (например, по меньшей мере или приблизительно 5% плазмы

крови человека, по меньшей мере или приблизительно 10% плазмы крови человека, по меньшей мере или приблизительно 20% плазмы крови человека) и по меньшей мере или приблизительно 1 мкг/мл фактора IX WT, или по меньшей мере или приблизительно 2,5 мкг/мл фактора IX WT, или по меньшей мере или приблизительно 5 мкг/мл фактора IX WT, или по меньшей мере или приблизительно 10 мкг/мл фактора IX WT. Согласно иллюстративным аспектам, связывающаяся конструкция связывается с фактором IX Padua и не связывается с фактором IX WT в образце, содержащем другие факторы свертывания, в том числе без ограничения фактор II, фактор V, фактор VI, фактор VII, фактор VIII, фактор X, фактор XI, фактор XII и фактор XIII. Согласно иллюстративным аспектам, связывающаяся конструкция связывается с фактором IX Padua и не связывается с фактором IX WT и дополнительно не связывается с фактором II или фактором X. Согласно иллюстративным аспектам, связывающаяся конструкция связывается с фактором IX Padua и не связывается с фактором IX WT и дополнительно не связывается ни с фактором II, ни с фактором X.

В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, связывающую способность связывающейся конструкции к FIX Padua можно описать с точки зрения ее чувствительности. KD является равновесной константой диссоциации, т.е. соотношением $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$, между связывающейся конструкцией и FIX Padua. KD и КА имеют обратно пропорциональную зависимость. Значение KD относится к концентрации связывающейся конструкции (количеству связывающейся конструкции, необходимому для конкретного эксперимента), и поэтому чем ниже значение KD (чем ниже концентрация), тем выше аффинность связывающейся конструкции. Согласно иллюстративным аспектам, связывающую способность связывающейся конструкции к FIX Padua можно описать с точки зрения KD. Согласно иллюстративным аспектам, KD представленных в настоящем документе связывающихся конструкций к FIXr составляет приблизительно $1,0 \times 10^{-6}$ или менее, приблизительно $1,0 \times 10^{-7}$ или менее, приблизительно $1,0 \times 10^{-8}$ или менее, приблизительно $1,0 \times 10^{-9}$ или менее, приблизительно $1,0 \times 10^{-10}$ или менее. Согласно иллюстративным аспектам, KD представленных в настоящем документе связывающихся конструкций является микромолярным, наномолярным, пикомолярным или фемтомолярным. Согласно иллюстративным аспектам, KD представленных в настоящем документе связывающихся конструкций находится в пределах диапазона, составляющего от приблизительно 10^{-4} до 10^{-6} , или от 10^{-7} до 10^{-9} , или от 10^{-10} до 10^{-12} , или от 10^{-13} до 10^{-15} . Согласно иллюстративным аспектам, KD представленных в настоящем документе связывающихся конструкций составляет приблизительно 100 нМ или менее. Согласно некоторым аспектам, KD представленных в настоящем документе связывающихся конструкций составляет от приблизительно 20 нМ до приблизительно 100 нМ, от приблизительно 25 нМ до приблизительно 95 нМ, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 90 нМ, от приблизительно 35 нМ до приблизительно 85 нМ, от приблизительно 40 нМ до приблизительно 80 нМ, от приблизительно 45 нМ до приблизительно 75 нМ, от приблизительно 50 нМ до приблизительно 70 нМ или от приблизительно 55 нМ до приблизительно 65 нМ. Согласно иллюстративным аспектам, KD связывающихся конструкций находится в пределах диапазона, составляющего от приблизительно 25 нМ до приблизительно 75 нМ. Согласно иллюстративным аспектам, KD связывающихся конструкций находится в пределах диапазона, составляющего от приблизительно 50 нМ до приблизительно 60 нМ. Согласно иллюстративным аспектам, KD связывающихся

конструкций составляет приблизительно 56 нМ.

Авидность представляет собой показатель общей прочности комплекса антитела и антигена. Он зависит от трех основных параметров: аффинности связывающейся конструкции к эпитопу, валентности как связывающейся конструкции, так и FIX Padua, и структурной схемы взаимодействующих частей. Чем больше валентность связывающейся конструкции (количество антигенсвязывающих сайтов), тем большее количество антигена (FIX Padua) она может связать. Согласно иллюстративным аспектам, связывающиеся конструкции обладают сильной авидностью к FIXp. Согласно иллюстративным аспектам, связывающиеся конструкции являются мультивалентными. Согласно иллюстративным аспектам, связывающиеся конструкции являются бивалентными.

Структура

Описываемые в настоящем документе связывающиеся конструкции можно сконструировать такими, чтобы они имели одну из множества структур. Согласно иллюстративным аспектам, представленные в настоящем документе связывающиеся конструкции имеют структуру антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Согласно иллюстративным аспектам, представленные в настоящем документе связывающиеся конструкции имеют структуру, основанную на антителе или производную от антитела. Согласно иллюстративным аспектам, представленные в настоящем документе связывающиеся конструкции имеют структуру синтетического миметика антитела, сконструированного белка или аптамера, такого как те, что описаны в настоящем документе и в работах McEnaney et al., "Chemically Synthesized Molecules with the Targeting and Effector Functions of Antibodies" J. Am. Chem. Soc., 136 (52): 18034-18043 (2014); Binz and Plückthun, "Engineered proteins as specific binding reagents" Curr Opin Biotechnol. 16(4):459-69 (2005); и в Roque et al., "Antibodies and genetically engineered related molecules: production and purification" Biotechnol Prog. 20(3):639-54 (2004).

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты

В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, связывающаяся конструкция является антителом. Антитело может быть антителом любого типа, т.е. иммуноглобулином, известным в настоящей области техники. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, антитело представляет собой антитело класса или изотипа IgA, IgD, IgE, IgG или IgM. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, описываемое в настоящем документе антитело содержит одну или несколько тяжелых цепей альфа, дельта, эпсилон, гамма и/или мю. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, описываемое в настоящем документе антитело содержит одну или несколько каппа или легких цепей. Согласно иллюстративным аспектам, антитело представляет собой антитело IgG и необязательно относится к одному из четырех человеческих подклассов: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

Также, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело представляет собой моноклональное антитело. В соответствии с другими вариантами осуществления, антитело является поликлональным антителом.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело является структурно схожим с естественным антителом или производным от него, например, антитела, выделенного и/или очищенного у млекопитающего, например, мыши, кролика, козы, лошади, курицы, хомяка, человека и др. В этом отношении антитело можно рассматривать как антитело млекопитающего, например, антитело мыши, антитело кролика, антитело козы, антитело лошади, антитело курицы, антитело хомяка, человеческое антитело и др. Согласно иллюстративным аспектам, антитело содержит

последовательность только антител млекопитающих. Способы получения таких антител известны в настоящей области техники, некоторые из которых дополнительно описаны в настоящем документе в разделе «Способы получения антител». Согласно иллюстративным аспектам, связывающаяся конструкция является полностью

5 человеческим антителом или не содержит последовательности нечеловеческих антител.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело является антителом, созданным методами генной инженерии, и не встречается в природе. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, антитело является одноцепочечным антителом, гуманизированным антителом, химерным антителом,

10 CDR-привитым антителом, гуманизованным (humanized) антителом, биспецифическим антителом, триспецифическим антителом и др. Методики генной инженерии также обеспечивают возможность создания полностью человеческих антител из нечеловеческого источника.

Согласно некоторым аспектам, созданное методом генной инженерии антитело

15 является одноцепочечным антителом (SCA), специфическим к FIX Padua. Способы получения молекул SCA известны из уровня техники. См., например, Davis et al., Nature Biotechnology 9: 165-169 (1991).

Согласно некоторым аспектам, антитело является химерным антителом. Термин «химерное антитело» применяют в настоящем документе для обозначения антитела,

20 содержащего константные домены от одного вида и переменные домены от второго или, если в более общем смысле, содержащего интервалы аминокислотной последовательности по меньшей мере от двух видов. Согласно конкретным аспектам, химерное антитело связывается с FIX Padua.

Согласно некоторым аспектам, антитело является гуманизированным антителом.

25 Термин «гуманизированный» при его применении в отношении антител обозначает антитела, имеющие по меньшей мере CDR-участки из отличного от человека источника, которые сконструированы так, чтобы они имели структуру и иммунологическую функцию, более схожую с настоящими человеческими антителами, чем с антителами первоначально источника. Например, гуманизация может предусматривать прививание

30 CDR из отличного от человеческого антитела, такого как антитело мыши, на человеческое антитело. Гуманизация также может предусматривать избирательные аминокислотные замены, чтобы сделать отличную от человеческой последовательность более схожей на человеческую последовательность.

Применение терминов «химерный или гуманизированный» в настоящем документе

35 не означает, что они являются взаимоисключающими, а скорее они понимаются как охватывающие химерные антитела, гуманизированные антитела и химерные антитела, которые были дополнительно гуманизированы. За исключением случаев, когда контекст явно указывает иное, утверждения о (свойствах, применениях, тестировании и т.д.) химерных антител применимы к гуманизированным антителам, а утверждения о

40 гуманизированных антителах также относятся и к химерным антителам. Аналогично, за исключением случаев, когда контекст указывает на иное, такие утверждения также следует понимать применимыми к антителам и антигенсвязывающим фрагментам таких антител.

Согласно некоторым аспектам, антитело является гуманизованнымTM антителом.

45 Технология гуманизации (humanizing) является патентованным способом компании KaloBios Pharmaceuticals, Inc. (Южный Сан-Франциско, Калифорния) по преобразованию отличных от человеческих антител в сконструированные человеческие антитела. ГуманизованныеTM антитела обладают высокой аффинностью и очень схожи с

последовательностями человеческих антител зародышевой линии. См., например, Tomasevic et al., *Growth Factors* 32: 223-235 (2014).

Согласно некоторым аспектам, антитело является антителом с привитыми CDR, которое специфично к FIX Padua. Способы получения антител с привитыми CDR известны из уровня техники. См., например, работы Lo, Benny, *Antibody Engineering: Methods and Protocols*, Volume 248 (2004), которая включена посредством ссылки во всей своей полноте.

В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, антитело сконструировано так, чтобы оно было биспецифическим, триспецифическим или мультиспецифическим, и такое антитело содержит два или более различных антигенсвязывающих участков. Согласно некоторым аспектам, антитело является биспецифическим или триспецифическим антителом, которое специфично к FIX Padua. Способы получения биспецифических или триспецифических антител известны из уровня техники. См., например, работы Marvin and Zhu, *Acta Pharmacologica Sinica* 26: 649-658 (2005) и патент США № 6551592. Согласно иллюстративным аспектам, связывающаяся конструкция является биспецифической антигенсвязывающей конструкцией, специфической к первому эпитопу FIX Padua и ко второму эпитопу FIX Padua. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, антитело является квадромой, гетеродимерным биспецифическим антителом, биспецифическим гибридом антитела, биспецифическим фрагментом антитела, биспецифическим активатором Т-клеток (BiTE) или мультиспецифическим антителом. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, антитело сконструировано так, чтобы оно было бивалентным, тривалентным или мультивалентным. См., например, работы Cuesta et al., “Multivalent antibodies: when design surpasses evolution” *Trends in Biotechnology* 28, 355-362 (2010); Holliger et al., “Engineered antibody fragments and the rise of single domains” *Nat. Biotechnol.* 23, 1126-1136 (2005); Chan et al., “Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation” *Nat Rev Immunol* 10, 301-316 (2010); Byrne et al., “A tale of two specificities: bispecific antibodies for therapeutic and diagnostic applications” *Trends Biotechnol.* 31, 621-632 (2013). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело имеет мономерную форму, тогда как в соответствии с другими вариантами осуществления, антитело конъюгировано с одним или несколькими антителами (например, каждое из которых распознает тот же эпитоп первого антитела). Следовательно, согласно некоторым аспектам, антитело имеет димерную, полимерную, олигомерную или мультимерную форму.

Согласно иллюстративным аспектам, связывающаяся конструкция является антигенсвязывающим фрагментом антитела или содержит антигенсвязывающий фрагмент антитела. Антигенсвязывающий фрагмент (также называемый в настоящем документе «антигенсвязывающей частью») может быть антигенсвязывающим фрагментом любого из описанных в настоящем документе антител. Антигенсвязывающий фрагмент может быть любой частью антитела, которая имеет по меньшей мере один антигенсвязывающий сайт, включая без ограничения Fab, F(ab')₂, моноспецифический или биспецифический Fab₂, триспецифический Fab₃, моновалентный IgG, scFv, dsFv, scFv-Fc, биспецифические диатела, триспецифические триатела, миниантитела, или фрагмент IgNAR (например, V-NAR), или фрагмент hIgG (например, VHh), или бис-scFv, фрагменты, экспрессируемые библиотекой экспрессии Fab, и т.п. Согласно иллюстративным аспектам, антигенсвязывающий фрагмент представляет собой доменное антитело, домен VHh, домен V-NAR, домен VH, домен VL или т.п. Тем не менее, фрагменты антител по настоящему раскрытию не ограничиваются этими иллюстративными типами

фрагментов антител. Согласно иллюстративным аспектам, связывающаяся конструкция содержит Fab-фрагмент. Согласно иллюстративным аспектам, связывающаяся конструкция содержит два Fab-фрагмента. Согласно иллюстративным аспектам, связывающаяся конструкция содержит два Fab-фрагмента, соединенных посредством линкера. Согласно иллюстративным аспектам, связывающаяся конструкция содержит или представляет собой миниантитело, содержащее два Fab-фрагмента. Согласно иллюстративным аспектам, связывающаяся конструкция содержит или представляет собой миниантитело, содержащее два Fab-фрагмента, соединенных посредством линкера. Миниантитела известны из уровня техники. См., например, работу Hu et al., Cancer Res 56: 3055-3061 (1996). Согласно иллюстративным аспектам, связывающаяся конструкция содержит или представляет собой миниантитело, содержащее два Fab-фрагмента, соединенных посредством линкера, необязательно содержащего домен щелочной фосфатазы.

Доменное антитело содержит функциональную связывающую единицу антитела и может соответствовать вариабельным участкам либо тяжелых (V_H), либо легких (V_L) цепей антител. Доменное антитело может иметь молекулярную массу примерно 13 кДа или примерно одну десятую от полного антитела. Доменные антитела можно получить из полных антител, таких как антитела, описываемые в настоящем документе.

Связывающиеся конструкции, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, являются мономерными или полимерными, биспецифическими или триспецифическими, бивалентными или тривалентными. Согласно иллюстративным аспектам, представленная в настоящем документе связывающаяся конструкция является моноспецифической. Согласно иллюстративным аспектам, представленная в настоящем документе связывающаяся конструкция является биспецифической. Согласно иллюстративным аспектам, представленная в настоящем документе связывающаяся конструкция является полностью человеческой. Согласно иллюстративным аспектам, связывающаяся конструкция содержит два Fab-фрагмента и является бивалентной. Согласно иллюстративным аспектам, связывающаяся конструкция является гомодимером из двух Fab-фрагментов, которые идентичны по структуре. Таким образом, согласно иллюстративным аспектам, связывающаяся конструкция является бивалентной, но моноспецифической в отношении к FIX Padua. Согласно иллюстративным аспектам, гомодимер димеризован с помощью мотива «спираль-петля-спираль». Согласно иллюстративным аспектам, связывающаяся конструкция является гомодимером из двух Fab-миниантител, которые идентичны по структуре. Таким образом, согласно иллюстративным аспектам, связывающаяся конструкция является бивалентной, но моноспецифической в отношении к FIX Padua. Согласно иллюстративным аспектам, гомодимер из двух Fab-миниантител димеризован с помощью домена щелочной фосфатазы.

Фрагменты антител, которые содержат антигенсвязывающую или идиотипическую детерминанту молекулы антитела, можно получить с помощью методик, которые известны из уровня техники. Например, к таким фрагментам относятся без ограничения $F(ab')_2$ -фрагмент, который можно получить путем расщепления пепсином молекулы антитела; Fab'-фрагменты, которые можно получить путем восстановления дисульфидных мостиков $F(ab')_2$ -фрагмента; и два Fab'-фрагмента, которые можно получить путем обработки молекулы антитела папаином и восстановителем.

Одноцепочечный фрагмент вариабельного участка (sFv), который состоит из укороченного Fab-фрагмента, содержащего вариабельный (V) домен тяжелой цепи

антитела, связанный с V-доменом легкой цепи антитела посредством синтетического пептида, можно получить с помощью стандартных методик с применением рекомбинантной ДНК (см., например, Janeway et al., выше). Аналогичным образом можно получить стабилизированные дисульфидными связями фрагменты варибельного участка (dsFv) с помощью технологии рекомбинантных ДНК (см., например, Reiter et al., Protein Engineering, 7, 697-704 (1994)).

Рекомбинантные фрагменты антител, например, scFv, также можно сконструировать так, чтобы они собирались в стабильные мультимерные олигомеры с высокой авидностью и специфичностью связывания с различными целевыми антигенами. Такие диатела (димеры), триотела (тримеры) или тетратела (тетрамеры) хорошо известны из уровня техники, см., например, работу Kortt et al., Biomol Eng. 2001 18:95-108, (2001) и работу Todorovska et al., J Immunol Methods. 248:47-66, (2001).

Биспецифические антитела (bscAb) представляют собой молекулы, содержащие два одноцепочечных Fv-фрагмента, соединенных посредством глицин-серинового линкера с помощью рекомбинантных способов. Домены V легкой цепи (V_L) и V тяжелой цепи (V_H) двух представляющих интерес антител, в соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, выделяют с помощью стандартных способов ПЦР. Молекулы кДНК V_L и V_H , полученные от каждой гибридомы, затем соединяют с получением одноцепочечного фрагмента в двухступенчатой ПЦР-гибридизации. Биспецифические гибридные белки получают аналогичным образом. Биспецифические одноцепочечные антитела и биспецифические гибридные белки представляют собой разновидности вещества антитела, включенные в объем настоящего раскрытия. Иллюстративные биспецифические антитела раскрыты в публикации заявки на выдачу патента США № 2005-0282233A1 и публикации международной патентной заявки № WO 2005/087812, причем обе эти заявки включены в настоящий документ посредством ссылки во всей их полноте.

В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, связывающаяся конструкция представляет собой антитело с двумя паратопами или его антигенсвязывающий фрагмент с двумя паратопами, которые обладают способностью связывать два различных неперекрывающихся эпитопа на одной и той же целевой молекуле антигена. Посредством одновременного связывания с одними и теми же целевыми молекулами на клеточной поверхности антитела с двумя паратопами и их антигенсвязывающие фрагменты с двумя паратопами могут в результате давать повышенную авидность связывания, что приводит к преимущественному (сильному) связыванию только с клетками, которые экспрессируют целевые молекулы, что позволяет производить «точную настройку» селективности антител. Было продемонстрировано, что антитела с двумя паратопами или их антигенсвязывающие фрагменты с двумя паратопами посредством одновременного связывания с двумя различными эпитопами на одной и той же целевой молекуле могут даже потенциально приобретать новые функциональные возможности, которых нельзя было достичь с исходными антителами (или антигенсвязывающими фрагментами) при использовании отдельно или в комбинации. Согласно иллюстративным аспектам, представленные в настоящем документе связывающиеся конструкции имеют два паратопа к FIX Padua.

В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, антигенсвязывающий фрагмент сконструирован так, чтобы он был биспецифическим, триспецифическим или мультиспецифическим. Согласно иллюстративным аспектам, антигенсвязывающий фрагмент содержит два или более различных антигенсвязывающих участков. Согласно

некоторым аспектам, антигенсвязывающий фрагмент является биспецифическим или триспецифическим антителом, специфическим к FIX Padua и по меньшей мере еще к одному антигену. Согласно иллюстративным аспектам, связывающаяся конструкция является биспецифическим антигенсвязывающим фрагментом, специфическим к первому эпитопу FIX Padua и ко второму эпитопу FIX Padua. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, антигенсвязывающий фрагмент сконструирован так, чтобы он был бивалентным, тривалентным или мультивалентным. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, связывающаяся конструкция является бивалентным Fab-фрагментом, моноспецифическим к FIX Padua. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антигенсвязывающий фрагмент имеет мономерную форму, тогда как в соответствии с другими вариантами осуществления, антигенсвязывающий фрагмент конъюгирован с одним или несколькими антигенсвязывающими фрагментами (например, каждый из которых распознает тот же эпитоп первого антигенсвязывающего фрагмента). Соответственно, согласно некоторым аспектам, антигенсвязывающий фрагмент является димеризованным, полимеризованным, олигомеризованным или мультимеризованным. Согласно иллюстративным аспектам, связывающаяся конструкция является димеризованным Fab-фрагментом. Согласно иллюстративным аспектам, связывающаяся конструкция является полностью человеческим димеризованным Fab-фрагментом. Согласно иллюстративным аспектам, связывающаяся конструкция димеризована с помощью мотива «спираль-петля-спираль». В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, антигенсвязывающий фрагмент сконструирован так, чтобы он был бивалентным, тривалентным или мультивалентным. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, связывающаяся конструкция является димеризованным бивалентным Fab-фрагментом, моноспецифическим к FIX Padua, причем такая связывающаяся конструкция димеризована с помощью мотива «спираль-петля-спираль».

Согласно иллюстративным аспектам, связывающаяся конструкция, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит следующие аминокислотные последовательности: SSY AIS (SEQ ID NO: 6); GIVPAFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO: 7); SWGVISFAY (SEQ ID NO: 8); RASQDISSYLN (SEQ ID NO: 9); AASNLSQ (SEQ ID NO: 10); и MQYDSLPTF (SEQ ID NO: 11). Согласно иллюстративным аспектам, между каждой из SEQ ID NO: 6-11 присутствует одна или несколько аминокислот. Согласно иллюстративным аспектам, связывающаяся конструкция, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит последовательность SEQ ID NO: 24, или SEQ ID NO: 25, или как SEQ ID NO: 24, так и SEQ ID NO: 25. Согласно иллюстративным аспектам, связывающаяся конструкция, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит последовательность SEQ ID NO: 26, или SEQ ID NO: 27, или как SEQ ID NO: 26, так и SEQ ID NO: 27. Согласно иллюстративным аспектам, аминокислотная последовательность связывающейся конструкции, например, антитела или ее антигенсвязывающего фрагмента, содержит дополнительные последовательности, например, линкер(-ы), метки экспрессии (например, His-метки, метки FLAG, метки тус, флуоресцентные белки (например, зеленый флуоресцентный белок, синий флуоресцентный белок, красный флуоресцентный белок, желтый флуоресцентный белок, голубой флуоресцентный белок, усиленный зеленый флуоресцентный белок и др.)). Согласно иллюстративным аспектам, связывающаяся конструкция, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит последовательность His-метки и/или метки FLAG. Согласно иллюстративным аспектам, метка FLAG содержит последовательность SEQ ID NO: 12. Согласно иллюстративным

аспектам, His-метка содержит последовательность SEQ ID NO: 13. Согласно иллюстративным аспектам, связывающаяся конструкция, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит линкер. Согласно иллюстративным аспектам, связывающаяся конструкция, например, антитело или его антигенсвязывающий

5 фрагмент, содержит синтетический двойной мотив «спираль-петля-спираль», например такой, который описан в работе Haylock et al., *Int J. Oncol.* 48(2): 461-470 (2016) или в работе Wang et al., *Anal. Chem.* 78: 997-1004 (2006). Согласно иллюстративным аспектам, связывающаяся конструкция, например, антитело или его антигенсвязывающий

10 фрагмент, содержит константный домен антитела. Такие домены антител описаны в работе Hu et al., *Cancer Res* 56: 3055-3061 (1996) и в работе McGregor et al., *Mol Immuno* 31: 219-226 (1994). Согласно иллюстративным аспектам, связывающаяся конструкция, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит домен бактериальной щелочной фосфатазы, например, такой, который описан в работе Wang et al. (2006), выше. Согласно иллюстративным аспектам, связывающаяся конструкция,

15 например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит последовательность SEQ ID NO: 28, или SEQ ID NO: 27, или как SEQ ID NO: 28, так и SEQ ID NO: 27.

Аптамеры

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывающаяся

20 конструкция является аналогом антитела. Согласно некоторым аспектам, связывающаяся конструкция является аптамером. Недавние достижения в области комбинаторных наук позволили выявить короткие полимерные последовательности (например, молекулы олигонуклеиновой кислоты или пептидов) с высокой аффинностью и специфичностью к заданной целевой молекуле. Например, для выявления аптамеров

25 ДНК и РНК со свойствами связывания, которые конкурируют с антителами млекопитающих, применяют технологию SELEX, в области иммунологии создают и выделяют антитела или фрагменты антител, которые связываются со множеством соединений, а фаговый дисплей используют для обнаружения новых пептидных последовательностей с очень благоприятными свойствами связывания. Исходя из успеха

30 этих методик молекулярной эволюции, несомненно, что можно создать молекулы, которые связываются с любой целевой молекулой. Петлевая структура зачастую связана с приданием требуемых характеристик связывания, как в случае аптамеров, в которых зачастую используют петли по типу «шпилька», созданные из коротких участков без комплементарного спаривания оснований, и естественно полученных антител, в которых

35 используется комбинаторная структура петлеобразных гипервариабельных участков, и новых библиотек фагового дисплея с использованием циклических пептидов, у которых наблюдали улучшенные результаты по сравнению с результатами фагового дисплея с линейными пептидами. Более подробно об аптамерах см., в целом, работу Gold, L., Singer, B., He, Y. Y., Brody, E., "Aptamers As Therapeutic And Diagnostic Agents," *J. Biotechnol.*

40 74:5-13 (2000). Соответствующие способы создания аптамеров можно найти в патенте США № 6699843, который включен посредством ссылки во всей своей полноте.

Способы получения антител или антигенсвязывающих фрагментов

Подходящие способы получения антител известны из уровня техники. Например, стандартные способы с применением гибридомы описаны, например, в работе Harlow and Lane (eds.), *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press (1988), и в работе CA. Janeway et al. (eds.), *Immunobiology*, 5th Ed., Garland Publishing, New York, NY (2001)).

45

Вкратце, поликлональное антитело получают путем иммунизации животного иммуногеном, содержащим полипептид по настоящему раскрытию, и сбора

антисыворотки от такого иммунизированного животного. Для получения антисыворотки можно применять широкий спектр видов животных. Согласно некоторым аспектам, животное, применяемое для получения анти-антисыворотки, является отличным от человека животным, включая кроликов, мышей, крыс, хомяков, коз, овец, свиней или лошадей. Из-за относительно большого объема крови у кроликов предпочтительным выбором для получения поликлональных антител является кролик. В соответствии с иллюстративным способом получения поликлональной антисыворотки, иммунореактивной с выбранным эпитопом FIX Padua, 50 мкг антигена FIX Padua эмульгируют в полном адъюванте Фрейнда для иммунизации кроликов. С интервалами, например, 21 день, 50 мкг эпитопа эмульгируют в неполном адъюванте Фрейнда для стимулирующих инъекций. Поликлональную антисыворотку можно получить после того, как будет дано время для образования антител, просто путем забора крови у животного и получения образцов сыворотки крови из цельной крови.

Моноклональные антитела для применения в соответствии со способами по настоящему раскрытию можно получить с помощью любой методики, которая предусматривает получение молекул антител с помощью стабильных клеточных линий в культуре. К ним относятся без ограничения методика с применением гибридомы, первоначально описанная в работе Koehler и Milstein (Nature 256: 495-497, 1975), методика с применением В-клеточной гибридомы человека (Kosbor et al., Immunol Today 4:72, 1983; Cote et al., Proc Natl Acad Sci 80: 2026-2030, 1983) и методика с применением EBV-гибридомы (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R Liss Inc, New York N.Y., pp 77-96, (1985).

Вкратце, в соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, для получения моноклональных антител мышь периодически получает инъекцию рекомбинантного FIX Padua, против которого необходимо индуцировать выработку антитела (например, 10-20 мкг эмульгированного в полном адъюванте Фрейнда). Мышь получает конечную, подготовительную перед гибридизацией, стимулирующую инъекцию FIX Padua в PBS, и через четыре дня мышь умерщвляют и удаляют ее селезенку. Селезенку помещают в 10 мл бессывороточной RPMI 1640 и получают одноклеточную суспензию путем измельчения селезенки между матированными краями двух покровных стекол для микроскопических препаратов, погруженных в бессывороточную RPMI 1640, дополненную 2 mM L-глутамин, 1 mM пирувата натрия, 100 единицами/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (RPMI) (Gibco, Канада). Клеточную суспензию фильтруют через стерильный сетчатый фильтр Nitex с размером ячейки 70 меш (Becton Dickinson, Парсиппани, Нью-Джерси) и дважды промывают центрифугированием с 200 g в течение 5 минут и ресуспендированием осадка в 20 мл бессывороточной RPMI. Спленоциты, взятые у трех интактных мышей Balb/c, готовят аналогичным образом и используют в качестве контроля. Клетки миеломы NS-1, поддерживаемые в логарифмической фазе в RPMI с 11% эмбриональной бычьей сывороткой (FBS) (Hyclone Laboratories, Inc., Логан, Юта) в течение трех дней до гибридизации, центрифугируют с 200 g в течение 5 минут, а осадок дважды промывают.

Клетки селезенки (1×10^8) объединяют с $2,0 \times 10^7$ клеток NS-1 и центрифугируют, а супернатант отсасывают. Клеточный осадок удаляют, постукивая по пробирке, и добавляют 1 мл 37°C ПЭГ 1500 (50% в 75 mM Hepes, pH 8,0) (Boehringer Mannheim) при помешивании в течение 1 минуты с последующим добавлением 7 мл бессывороточной RPMI в течение 7 минут. Добавляют дополнительные 8 мл RPMI и центрифугируют клетки с 200 g в течение 10 минут. После удаления супернатанта осадок ресуспендируют в 200 мл RPMI, содержащем 15% FBS, 100 мкМ гипоксантина натрия, 0,4 мкМ

аминоптерина, 16 мкМ тимидина (НАТ) (Gibco), 25 единиц/мл IL-6 (Boehringer Mannheim) и $1,5 \times 10^6$ спленоцитов/мл, и высевают в 10 плоскодонных 96-луночных планшетов Corning для культивирования тканей (Corning, Корнинг, Нью-Йорк).

На 2-й, 4-й и 6-й дни после гибридизации 100 мкл среды забирают из лунок планшетов для гибридизации и заменяют свежей средой. На 8-й день гибридизацию отслеживают скринингом с помощью ИФА, тестируя на наличие мышинового IgG, связывающегося с FIX Padua, согласно описанному далее. На 4 планшета Immulon (Dynatech, Кэмбридж, Массачусетс) наносят покрытие в течение 2 часов при 37°C 100 нг/лунка EGFR, разведенным в 25 mM Tris, pH 7,5. Аспирируют раствор для нанесения покрытия и добавляют 200 мкл/лунка блокирующего раствора (0,5% рыбьего желатина (Sigma), разведенного в CMF-PBS) и инкубируют в течение 30 мин. при 37°C. Планшеты трижды промывают посредством PBS с 0,05% твина 20 (PBST) и добавляют 50 мкл культурального супернатанта. После инкубации при 37°C в течение 30 минут и промывки, как указано выше, добавляют 50 мкл конъюгированного с пероксидазой хрена антитела козы к мышинному IgG(fc) (Jackson ImmunoResearch, Вест-Гров, Пенсильвания), разведенного 1:3500 в PBST. Планшеты инкубируют, как указано выше, промывают четыре раза посредством PBST и добавляют 100 мкл субстрата, состоящего из 1 мг/мл о-фенилендиамина (Sigma) и 0,1 мкл/мл 30% H₂O₂ в 100 mM цитрата, pH 4,5. Цветную реакцию останавливают через 5 минут добавлением 50 мкл 15% H₂SO₄. A₄₉₀ считывают на планшет-ридере (Dynatech).

Содержимое отобранных лунок для гибридизации дважды клонируют путем разведения в 96-луночных планшетах и визуального подсчета количества колоний/лунка через 5 дней. Моноклональные антитела, продуцируемые гибридами, изотипируют с помощью системы Isostrip (Boehringer Mannheim, Индианаполис, Индиана).

При использовании методики гибридом можно применять линии клеток миеломы. Такие линии клеток, пригодные для применения в процедурах гибридизации с целью получения гибридом, предпочтительно не продуцируют антитела, обладают высокой эффективностью гибридизации и лишены ферментов, которые делают их неспособными расти в определенных селективных средах, которые поддерживают рост только требуемых гибридных клеток (гибридом). Например, если иммунизированным животным является мышь, можно применять P3-X63/Ag8, P3-X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 и S194/15XX0 Bul; в случае крыс, можно применять R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F и 4B210; и все из U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-НМу2 и UC729-6 пригодны в связи с процедурами гибридизации клеток.

В зависимости от вида-хозяина можно применять различные адъюванты для увеличения иммунологического ответа. К таким адъювантам относятся без ограничения минеральные гели Фрейнда, такие как гидроксид алюминия, и поверхностно-активные вещества, такие как лизолецитин, плюрониловые полиолы, полианионы, пептиды, масляные эмульсии, гемоцианин лимфы улитки и динитрофенол. Потенциально полезными адъювантами человека являются БЦЖ (бацилла Кальмета - Герена) и *Corynebacterium parvum*.

В качестве альтернативы, из уровня техники известны и другие способы, такие как способы с EBV-гибридами (Haskard and Archer, J. Immunol. Methods, 74(2), 361-67 (1984), и Roder et al., Methods Enzymol., 121, 140-67 (1986)) и системы экспрессии на основе бактериофагового вектора (см., например, Huse et al., Science, 246, 1275-81 (1989)). Кроме того, способы получения антител у отличных от человека животных описаны, например, в патентах США № 5545806, № 5569825 и № 5714352 и публикации заявки на выдачу

патента США № 2002/0197266 A1).

Антитела также можно получить путем индукции продуцирования *in vivo* в популяции лимфоцитов или путем скрининга библиотек рекомбинантного иммуноглобулина или панелей высокоспецифических связывающих реагентов, как раскрыто в работах Orlandi et al (Proc Natl Acad Sci 86: 3833-3837; 1989) и Winter G and Milstein C (Nature 349: 293-299, 1991). Если известна полная последовательность антитела или антигенсвязывающего фрагмента, то можно использовать способы получения рекомбинантных белков. См., например, "Protein production and purification" Nat Methods 5(2): 135-146 (2008).

Для получения антитела по настоящему раскрытию можно также применять фаговый дисплей. В этом отношении фаговые библиотеки, кодирующие антигенсвязывающие переменные (V) домены антител, можно получить с помощью стандартных методик молекулярной биологии и рекомбинантной ДНК (см., например, Sambrook et al. (eds.), Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001)). Фаг, кодирующий переменный участок с требуемой специфичностью, отбирают по специфическому связыванию с требуемым антигеном и восстанавливают полное или частичное антитело, содержащее выбранный переменный домен. Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие восстановленное антитело, вводят в подходящую линию клеток, такую как клетка миеломы, применяемая для получения такой гибридомы, чтобы клеткой секретировались антитела, обладающие характеристиками моноклональных антител, (см., например, Janeway et al., выше, Huse et al., выше, и патент США № 6265150). Родственные способы также описаны в патенте США № 5403484, патенте США № 5571698, патенте США № 5837500, патенте США № 5702892. Такие методики описаны в патенте США № 5780279, патенте США № 5821047, патенте США № 5824520, патенте США № 5855885, патенте США № 5858657, патенте США № 5871907, патенте США № 5969108, патенте США № 6057098 и патенте США № 6225447.

Антитела можно получить с помощью трансгенных мышей, которые являются трансгенными по конкретным генам тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина. Такие способы известны из уровня техники и описаны, например, в патентах США № 5545806 и № 5569825 и в работе Janeway et al., выше.

Способы получения гуманизированных антител хорошо известны из уровня техники и подробно описаны, например, в работе Janeway et al., выше, патентах США № 5225539, № 5585089 и № 5693761, европейском патенте № 0239400 B1 и патенте Соединённого Королевства № 2188638. Гуманизированные антитела также можно получить с помощью технологии повторного изменения поверхностных свойств антител, описанной в патенте США № 5639641 и в работе Pedersen et al., J. Mol. Biol, 235, 959-973 (1994).

Предпочтительное химерное или гуманизированное антитело имеет человеческий константный участок, тогда как переменный участок или по меньшей мере CDR антитела получен от отличного от человека вида. Способы гуманизации отличных от человеческих антител хорошо известны из уровня техники. (См. патент США № 5585089 и № 5693762.) Как правило, гуманизированное антитело имеет один или несколько аминокислотных остатков, введенных в его каркасный участок из источника, который не является человеком. Гуманизацию можно произвести, например, с помощью способов, описанных в работах Jones et al. (Nature 321: 522-525, 1986), Riechmann et al., (Nature, 332: 323-327, 1988) и Verhoeven et al. (Science 239:1534-1536, 1988), путем замены по меньшей мере части определяющих комплементарность участков (CDR) грызуна на соответствующие участки человеческого антитела. Различные методики получения сконструированных антител описаны, например, в работе Owens and Young, J. Immunol.

Meth., 168:149-165 (1994). Затем можно внести дополнительные изменения в каркас антитела для модуляции аффинности или иммуногенности.

Можно применять методики, разработанные для получения «химерных антител», сплайсинга генов антител мыши с генами антител человека для получения молекулы с соответствующей антигенной специфичностью и биологической активностью (Morrison et al., Proc Natl Acad Sci 81: 6851-6855 (1984); Neuberger et al., Nature 312: 604-608 (1984); Takeda et al., Nature 314: 452-454 (1985)). Альтернативно, методики, описанные для получения одноцепочечных антител (патент США № 4946778), можно адаптировать для получения EGFR- или HSP90-специфических одноцепочечных антител.

Аналогично, с помощью методик, известных в настоящей области техники для выделения CDR, получают композиции, содержащие CDR. Определяющие комплементарность участки характеризуются шестью полипептидными петлями, по три петли для каждого из переменных участков тяжелой или легкой цепи. Положение аминокислоты в CDR определяют по Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest," U.S. Department of Health and Human Services, (1983), которая включена в настоящий документ посредством ссылки. Например, гипервариабельные участки человеческих антител приблизительно определяют как приходящиеся на остатки 28-35, 49-59 и остатки 92-103 переменных участков тяжелой и легкой цепей (Janeway and Travers, Immunobiology, 2nd Edition, Garland Publishing, New York, (1996)). Мышиные CDR также приходятся примерно на эти аминокислотные остатки. Из уровня техники понятно, что CDR-участки могут встречаться в пределах нескольких аминокислот этих аппроксимированных остатков, которые указаны выше. Вариабельный участок иммуноглобулина также состоит из четырех «каркасных» участков, окружающих CDR (FR1-4). Последовательности каркасных участков различных легких или тяжелых цепей являются весьма консервативными в пределах вида, а также являются консервативными среди человеческих и мышиных последовательностей.

Получены композиции, содержащие один, два и/или три CDR вариабельного участка тяжелой цепи или вариабельного участка легкой цепи моноклонального антитела. Методики клонирования и экспрессии нуклеотидных и полипептидных последовательностей хорошо известны в настоящей области техники (см., например, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, New York (1989)). Амплифицированные последовательности CDR лигируют в подходящий вектор экспрессии. Вектор, содержащий один, два, три, четыре, пять и/или шесть клонированных CDR, необязательно содержит дополнительные кодирующие полипептид участки, связанные с CDR.

Каккаркасные участки (FR) мышиного антитела гуманизируют путем замены совместимых человеческих каркасных участков, выбранных из большой базы данных вариабельных последовательностей антител человека, включая более двенадцати сотен человеческих последовательностей V_H и более одной тысячи последовательностей V_L . Базу данных применяемых для сравнения последовательностей антител скачивают с веб-страницы Andrew C. R. Martin's KabatMan (<http://www.rubic.rdg.ac.uk/abs/>). Способ выявления CDR по Kabat обеспечивает инструмент для картирования примерных CDR и каркасных участков из любого человеческого антитела и сравнения с последовательностью мышиного антитела в отношении сходства для определения CDR и FR. Наиболее совпадающие человеческие последовательности V_H и V_L отбирают на основании высокого общего совпадения каркасных участков, схожей длины CDR и минимального несовпадения канонических и контактных остатков V_H/V_L . Человеческие

каркасные участки, наиболее схожие с мышиной последовательностью, вставляют между мышинными CDR. Альтернативно, мышинный каркасный участок можно модифицировать путем внесения аминокислотных замен всего или части нативного каркасного участка, чтобы он как можно ближе напоминал каркасный участок человеческого антитела.

Кроме того, другой полезной методикой получения антител для применения в настоящем раскрытии может быть методика, в которой применяют подход рационального конструирования. Целью рационального конструирования является получение структурных аналогов биологически активных полипептидов или соединений, с которыми они взаимодействуют (агонистов, антагонистов, ингибиторов, пептидомиметиков, партнеров по связыванию и т.д.). В соответствии с одним подходом, можно было бы создать трехмерную структуру для антител или их эпитопсвязывающего фрагмента. Это можно осуществить с помощью рентгеновской кристаллографии, компьютерного моделирования или сочетания обоих подходов. Альтернативный подход, «аланиновое сканирование», предусматривает случайную замену по всей молекуле остатков на аланин и определение получаемого в результате эффекта на функцию.

Химически сконструированные биспецифические антитела можно получить путем химической сшивки гетерологичных Fab- или F(ab')₂-фрагментов посредством таких химических веществ, как гетеробифункциональный реагент сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиол)-пропионат (SPDP, Pierce Chemicals, Рокфорд, Иллинойс). Fab- и F(ab')₂-фрагменты можно получить из интактного антитела путем расщепления его соответственно папаином или пепсином (Karpovsky et al., J. Exp. Med. 160:1686-701 (1984); Titus et al., J. Immunol., 138:4018-22 (1987)).

Способы тестирования антител в отношении способности связываться с эпитопом FIX Радва независимо от того, каким способом получены антитела, известны из уровня техники и включают любой анализ связывания антитела с антигеном, такой как, например, радиоиммуноанализ (RIA), ИФА, вестерн-блоттинг, иммунопреципитация, поверхностный плазмонный резонанс и анализы конкурентного ингибирования (см., например, Janeway et al., ниже, и публикацию заявки на выдачу патента США 2002/0197266).

Полипептиды

Кроме того, настоящее изобретение относится к полипептиду, содержащему аминокислотную последовательность, содержащую каждую из SEQ ID NO: 6-11. Такой полипептид связывается с FIX_р и не связывается с FIX WT, например, полипептид связывается с FIX_р только в присутствии FIX WT, необязательно даже в присутствии других факторов свертывания, например, фактора II и фактора X. Согласно иллюстративным аспектам, полипептид связывается FIX_р в образце, содержащем по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10% или по меньшей мере 20% плазмы крови человека. Согласно иллюстративным аспектам, между каждой из SEQ ID NO: 6-11 присутствует одна или несколько аминокислот. Согласно иллюстративным аспектам, полипептид содержит последовательность SEQ ID NO: 24, или SEQ ID NO: 25, или как SEQ ID NO: 24, так и SEQ ID NO: 25. Согласно иллюстративным аспектам, полипептид содержит последовательность SEQ ID NO: 26, или SEQ ID NO: 27, или как SEQ ID NO: 26, так и SEQ ID NO: 27. Согласно иллюстративным аспектам, аминокислотная последовательность полипептида содержит дополнительные последовательности, например, линкер(-ы), метки экспрессии (например, His-метки, метки FLAG, метки тус, флуоресцентные белки (например, зеленый флуоресцентный белок, синий

флуоресцентный белок, красный флуоресцентный белок, желтый флуоресцентный белок, голубой флуоресцентный белок, усиленный зеленый флуоресцентный белок и др.).

Согласно иллюстративным аспектам, полипептид содержит последовательность His-метки и/или метки FLAG. Согласно иллюстративным аспектам, метка FLAG содержит последовательность SEQ ID NO: 12. Согласно иллюстративным аспектам, His-метка содержит последовательность SEQ ID NO: 13. Согласно иллюстративным аспектам, полипептид содержит линкер. Согласно иллюстративным аспектам, полипептид содержит последовательность синтетического двойного мотива «спираль-петля-спираль», например, такого, который описан в работе Haylock et al., *Int J. Oncol.* 48(2): 461-470 (2016) или в работе Wang et al., *Anal. Chem.* 78: 997-1004 (2006). Согласно иллюстративным аспектам, полипептид содержит последовательность константного домена антитела. Такие домены антител описаны в работе Hu et al., *Cancer Res* 56: 3055-3061 (1996) и в работе McGregor et al., *Mol Immuno* 31: 219-226 (1994). Согласно иллюстративным аспектам, полипептид содержит домен бактериальной щелочной фосфатазы, например, такой, который описан в работе Wang et al. (2006), выше. Согласно иллюстративным аспектам, полипептид содержит последовательность SEQ ID NO: 28, или SEQ ID NO: 27, или как SEQ ID NO: 28, так и SEQ ID NO: 27.

Конъюгаты

Описываемые в настоящем документе связывающиеся конструкции можно модифицировать, например, путем гликозилирования, амидирования, карбоксилирования или фосфорилирования или путем получения солей присоединения кислоты, амидов, сложных эфиров, в частности, С-концевых сложных эфиров, и N-ацильных производных. Связывающуюся конструкцию также можно модифицировать для получения производных путем образования ковалентных или нековалентных комплексов с другими фрагментами, т.е. конъюгатов. Связанные ковалентными связями комплексы можно получить путем связывания химических фрагментов с функциональными группами на боковых цепях аминокислот, содержащихся в связывающейся конструкции, либо на N-, либо на С-конце.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывающиеся конструкции по настоящему раскрытию прикрепляют, связывают, присоединяют или конъюгируют со вторым фрагментом (например, гетерологичным фрагментом), а полученный в результате продукт представляет собой конъюгат. Соответственно, настоящее изобретение относится к конъюгатам, содержащим описываемые в настоящем документе связывающиеся конструкции, (ковалентно или нековалентно) связанные с гетерологичным фрагментом. Применяемый в контексте настоящего документа термин «гетерологичный фрагмент» обозначает любую молекулу (химическую или биохимическую, природную или неcodируемую), которая отличается от связывающейся конструкции по настоящему изобретению. К иллюстративным гетерологичным фрагментам относятся без ограничения полимер, углеводов, липид, нуклеиновая кислота, олигонуклеотид, ДНК или РНК, аминокислота, пептид, полипептид, белок, терапевтическое средство (например, цитотоксическое средство, цитокин), диагностическое средство или индикаторное средство.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывающиеся конструкции химически модифицированы различными гетерологичными фрагментами. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, химические модификации придают дополнительные требуемые характеристики, которые описаны в настоящем документе. Химические модификации в некоторых аспектах принимают несколько различных форм, таких как гетерологичные пептиды, полисахариды, липиды,

радиоизотопы, нестандартные аминокислотные остатки и нуклеиновые кислоты, хелаты металлов и различные цитотоксические средства.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывающиеся конструкции гибридизируют с гетерологичными пептидами для придания различных свойств, например, повышенной растворимости, и/или стабильности, и/или периода полужизни, устойчивости к протеолитическому расщеплению, модуляции клиренса, нацеливания на клетки или ткани конкретных типов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывающиеся конструкции связывают с Fc-доменом IgG или другого иммуноглобулина. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывающуюся конструкцию гибридизируют с щелочной фосфатазой (AP). Способы получения гибридных конструкций с Fc или AP можно найти в международной патентной публикации № WO 02/060950. Путем гибридизации связывающейся конструкции с белковыми доменами, которые обладают конкретными свойствами (например, периодом полужизни, биодоступностью) можно придать эти свойства связывающейся конструкции по настоящему изобретению.

Связывающиеся конструкции можно конъюгировать с индикаторным средством (например, детектируемой меткой или репортерной группой), включая без ограничения радиоактивную метку, флуоресцентную метку, фермент (например, катализирующий калориметрическую или флуориметрическую реакцию), субстрат, твердую матрицу или носитель (например, биотин или авидин). Согласно иллюстративным аспектам, флуоресцентная метка включает родаминовый краситель, флуоресцеиновый краситель и/или цианиновый краситель. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, флуоресцентная метка включает набор красителей, например, родаминовый краситель TAMRA и флуоресцеиновый краситель FAM. В соответствии с другим вариантом осуществления, флуоресцентная метка включает набор флуоресцентных красителей, образованный путем выбора двух или более красителей из группы, состоящей из Oregon Green 488, флуоресцеина EX, флуоресцеина изотиоцианата, родамина Red-X, лиссамина родамина B, кальцеина, флуоресцеина, родамина, одного или нескольких красителей BODIPY, тexasского красного, Oregon Green 514 и одного или нескольких красителей Alexa Fluor. К типичным красителям BODIPY относятся BODIPY FL, BODIPY R6G, BODIPY TMR, BODIPY 581/591, BODIPY TR, BODIPY 630/650 и BODIPY 650/665. К типичным красителям Alexa Fluor относятся Alexa Fluor 350, 405, 430, 488, 500, 514, 532, 546, 555, 568, 594, 610, 633, 635, 647, 660, 680, 700, 750 и 790. Согласно иллюстративным аспектам, флуоресцентная метка включает один или несколько из Oregon Green 488, флуоресцеина EX, FITC, родамина Red-X, лиссамина родамина B, кальцеина, флуоресцеина, родамина, BODIPYS и тexasского красного, которые раскрыты, например, в работе Molecular Probes Handbook, 11th Edition (2010). Согласно иллюстративным аспектам, детектируемая метка выбрана из радиоизотопов, хромофоров, флуорофоров, флуорохромов, ферментов (например, пероксидазы хрена), линкерных молекул или других фрагментов или соединений, которые либо испускают детектируемый сигнал (например, радиоактивность, флуоресценцию, цветовой сигнал), либо испускают детектируемый сигнал после воздействия метки на ее субстрат. Из уровня техники также хорошо известны различные детектируемые пары метка/субстрат (например, пероксидаза хрена/диаминобензидин, биотин/стрептавидин, люцифераза/люциферин), способы мечения антител и способы применения меченых вторичных антител для детекции антигена. См., например, Harlow and Lane, eds. (Using Antibodies: A Laboratory Manual (1999) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывающуюся конструкцию непосредственно присоединяют к гетерологичному фрагменту без какого-либо линкера. Согласно альтернативным аспектам, связывающуюся конструкцию опосредованно соединяют с гетерологичным фрагментом через один или несколько линкеров. Независимо от того, напрямую ли они присоединены друг к другу или присоединены друг к другу опосредованно при помощи линкера, связывающуюся конструкцию можно присоединить посредством ковалентных связей (например, пептидной, сложноэфирной, амидной или сульфгидрильной связи) или нековалентных связей (например, посредством гидрофобного взаимодействия, водородной связи, вандер-ваальсовой связи, электростатического или ионного взаимодействия) или их комбинации. Связывающуюся конструкцию по настоящему изобретению и гетерологичный фрагмент можно соединить с помощью любых средств, известных из уровня техники, включая без ограничения линкер по любому изобретению.

Конкретные остатки описываемых в настоящем документе связывающихся конструкций представляют собой иллюстративные сайты, на которые может быть присоединен гетерологичный фрагмент. Например, сайтами, на которые может быть присоединен гетерологичный фрагмент, являются Cys, His, Lys и N-концевые остатки Arg, Tyr, Asp, Glu, Ser, Thr, Pro. Согласно некоторым аспектам, перед присоединением гетерологичного фрагмента остаток (или его часть) активируют одним или несколькими средствами и/или химическими веществами.

Для сшивания связывающейся конструкции с водонерастворимыми вспомогательными матрицами подходит дериватизация бифункциональными средствами. Такая дериватизация может также давать линкер, который может соединять соседние связывающиеся элементы в связывающейся конструкции или связывающиеся элементы с гетерологичным пептидом, например, Fc-фрагментом. К традиционно применяемым сшивающим средствам относятся, например, 1,1-бис(диазоацетил)-2-фенилэтан, глутаровый альдегид, N-гидроксисукцинимидные сложные эфиры, например эфиры с 4-азидосалициловой кислотой, гомобифункциональные сложные имидоэфиры, в том числе дисукцинимидиловые сложные эфиры, такие как 3,3'-дитиобис (сукцинимидилпропионат), и бифункциональные малеимиды, такие как бис-N-малеимидо-1,8-октан. Такие дериватирующие средства, как метил-3-[(параазидофенил)дитио]пропиоимидат, дают фотоактивируемые промежуточные продукты, которые способны образовывать поперечные связи при наличии света. Альтернативно, для иммобилизации белка используют реакционноспособные нерастворимые в воде матрицы, такие как активируемые бромистым цианом углеводы, и реакционноспособные субстраты, описанные в патентах США № 3969287, № 3691016, № 4195128, № 4247642, № 4229537 и № 4330440, которые включены в настоящий документ посредством ссылки.

В целом, химическую дериватизацию можно осуществить при любом подходящем условии, применяемом для прохождения реакции белка с гетерологичным фрагментом, например, активированной полимерной молекулой. Способы получения химических производных полипептидов обычно предусматривают стадии (а) проведения реакции связывающейся конструкции с гетерологичным фрагментом, например, активированной полимерной молекулой (такой как реакционноспособный сложный эфир или альдегидное производное полимерной молекулы) в условиях, при которых связывающаяся конструкция присоединяется к одной или нескольким полимерным молекулам, и (b) получения продукта(-ов) реакции. Оптимальные условия реакции будут определяться на основании известных параметров и требуемого результата. Например, чем больше соотношение полимерные молекулы:белок, тем больше количество присоединенной

полимерной молекулы. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, соединение может иметь один фрагмент полимерной молекулы на аминоконце. (См., например, патент США № 5234784).

Раскрываемые в настоящем документе дериватизированные связывающиеся конструкции могут обладать дополнительными активностями, повышенной или сниженной биологической активностью или другими характеристиками, такими как увеличенный или уменьшенный период полужизни, по сравнению с недериватизированными молекулами.

Конъюгаты: Fc-гибриды

В случае таких заместителей, как Fc-участок человеческого IgG, гибрид может быть гибридизирован со связывающейся конструкцией по настоящему изобретению непосредственно или гибридизирован через промежуточную последовательность. Например, для присоединения Fc-участка шарнир человеческого IgG, участок CH2 и CH3 можно гибридизировать либо на N-конце, либо на C-конце связывающейся конструкции. Полученная в результате Fc-гибридная конструкция делает возможной очистку посредством колонки для аффинной хроматографии с белком А (Pierce, Рокфорд, Иллинойс). Пептид и белки, гибридизированные с Fc-участком, могут характеризоваться значительно большим периодом полужизни *in vivo*, чем негибридизированный аналог. Гибридизация с Fc-участком делает возможной димеризацию/мультимеризацию гибридного полипептида. Fc-участок может быть природным Fc-участком или может быть модифицированным для получения превосходящих характеристик, например, терапевтических или диагностических качеств, времени циркуляции, уменьшенной агрегации. Как отмечалось выше, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывающиеся конструкции конъюгируют, например, гибридируют с иммуноглобулином или его частью (например, вариабельным участком, CDR или Fc-участком). К известным типам иммуноглобулинов (Ig) относятся IgG, IgA, IgE, IgD или IgM. Fc-участок представляет собой C-концевой участок тяжелой цепи Ig, который ответствен за связывание с Fc-рецепторами, которые осуществляют такие активности, как рециркуляция (что приводит к более длительному периоду полужизни), антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность (ADCC) и комплементзависимая цитотоксичность (CDC).

Например, согласно некоторым определениям, Fc-участок тяжелой цепи IgG человека длится от Cys226 до C-конца тяжелой цепи. «Шарнирный участок» обычно простирается от Glu216 до Pro230 человеческого IgG1 (шарнирные участки других изоформ IgG можно выравнивать с последовательностью IgG1 путем выравнивания цистеинов, участвующих в цистеиновом связывании). Fc-участок IgG включает в себя два константных домена, CH2 и CH3. Домен CH2 Fc-участка человеческого IgG обычно простирается от аминокислоты 231 до аминокислоты 341. Домен CH3 Fc-участка человеческого IgG обычно простирается от аминокислоты 342 до 447. Теперь обратимся к аминокислотной нумерации у иммуноглобулинов, или фрагментов или участков иммуноглобулина, которая во всех случаях основана на работе Kabat et al. 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Public Health, Bethesda, Md. В соответствии с родственными вариантами осуществления, Fc-участок может включать один или несколько нативных или модифицированных константных участков из тяжелой цепи иммуноглобулина, отличных от CH1, например, участки CH2 и CH3 из IgG и IgA или участки CH3 и CH4 из IgE.

Подходящие гетерологичные фрагменты включают части последовательности иммуноглобулина, которые включают сайт связывания FcRn. FcRn, рецептор

реутилизации, ответственен за рециркуляцию иммуноглобулинов и возвращение их в кровотоки. Участок Fc-части IgG, который связывается с рецептором FcRn, был описан на основе результатов рентгеновской кристаллографии (Burmeister et al. 1994, Nature 372:379). Основная область контакта Fc с FcRn находится вблизи точки соединения доменов CH2 и CH3. Все точки контакта Fc-FcRn лежат в пределах одной тяжелой цепи Ig. Основные сайты контакта включают аминокислотные остатки 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311 и 314 домена CH2 и аминокислотные остатки 385-387, 428 и 433-436 домена CH3.

В Fc-участок иммуноглобулина можно внести аминокислотные модификации. Такие варианты Fc-участков включают по меньшей мере одну аминокислотную модификацию в домене CH3 Fc-участка (остатки 342-447) и/или по меньшей мере одну аминокислотную модификацию в домене CH2 Fc-участка (остатки 231-341). К мутациям, которые, как полагают, придают повышенную аффинность к FcRn, относятся T256A, T307A, E380A и N434A (Shields et al. 2001, J. Biol. Chem. 276:6591). Другие мутации могут снижать связывание Fc-участка с FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB и/или FcγRIIIA без значительного снижения аффинности к FcRn. Например, замена Asn в положении 297 Fc-участка на Ala или другую аминокислоту удаляет высококонсервативный сайт N-гликозилирования и может приводить к уменьшенной иммуногенности с сопутствующим продолжительным периодом полужизни Fc-участка, а также с уменьшенным связыванием с молекулами FcγR (Routledge et al. 1995, Transplantation 60:847; Friend et al. 1999, Transplantation 68:1632; Shields et al. 1995, J. Biol. Chem. 276:6591). Были получены аминокислотные модификации в положениях 233-236 IgG1, которые снижают связывание с молекулами FcγR (Ward and Ghetie 1995, Therapeutic Immunology 2:77 и Armour et al. 1999, Eur. J. Immunol. 29:2613). Некоторые иллюстративные аминокислотные замены описаны в патентах США № 7355008 и № 7381408, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Гетерологичные фрагменты: полимеры, углеводы и липиды

В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, гетерологичный фрагмент представляет собой полимер. Полимер может быть разветвленным или неразветвленным. Полимер может иметь любую молекулярную массу. Полимер, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, имеет среднюю молекулярную массу от приблизительно 2 кДа до приблизительно 100 кДа (причем термин «приблизительно» указывает, что в препаратах водорастворимого полимера некоторые молекулы будут весить больше, а некоторые - меньше, чем заявленная молекулярная масса). Средняя молекулярная масса полимера составляет, согласно некоторым аспектам, от приблизительно 5 кДа до приблизительно 50 кДа, от приблизительно 12 кДа до приблизительно 40 кДа или от приблизительно 20 кДа до приблизительно 35 кДа.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, полимер модифицирован так, чтобы он имел одну реакционноспособную группу, такую как активная сложноэфирная группа для ацилирования или альдегидная группа для алкилирования, с тем чтобы можно было контролировать степень полимеризации. Полимер, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, является водорастворимым с тем, чтобы белок, к которому он присоединен, не осаждался в водной среде, такой как физиологическая среда. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, при применении, например, композиции для терапевтического применения полимер является фармацевтически приемлемым. Кроме того, согласно некоторым аспектам, полимер представляет собой смесь полимеров, например, сополимер, блок-сополимер.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, полимер выбран из группы, состоящей из полиамидов, поликарбонатов, полиалкиленов и их производных, включая полиалкиленгликоли, полиалкиленоксиды, полиалкилентерефталаты, полимеров акриловых и метакриловых сложных эфиров, включая полиметилметакрилат, полиэтилметакрилат, полибутилметакрилат, полиизобутилметакрилат, полигексилметакрилат, полиизодецилметакрилат, полилаурилметакрилат, полифенилметакрилат, полиметилакрилат, полиизопропилакрилат, полиизобутилакрилат и полиоктадецилакрилат, поливиниловых полимеров, включая поливиниловые спирты, поливиниловые простые эфиры, поливиниловые сложные эфиры, поливинилгалогениды, поливинилацетат и поливинилпирролидон, полигликолидов, полисилоксанов, полиуретанов и их сополимеров, целлюлоз, включая алкилцеллюлозу, гидроксилалкилцеллюлозу, простые эфиры целлюлозы, сложные эфиры целлюлозы, нитроцеллюлозы, метилцеллюлозу, этилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, гидроксibuтилметилцеллюлозу, ацетат целлюлозы, пропионат целлюлозы, ацетобутират целлюлозы, ацетофталат целлюлозы, карбоксилэтилцеллюлозу, триацетат целлюлозы и натриевую соль сульфата целлюлозы, полипропилена, полиэтиленов, включая полиэтиленгликоль, полиэтиленоксид и полиэтилентерефталат, и полистирола.

Согласно некоторым аспектам, полимер представляет собой биоразлагаемый полимер, в том числе синтетический биоразлагаемый полимер (например, полимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты, полиангидриды, сложные полиортоэфиры, полиуретаны, полибутановая кислота, поливалериановая кислота и сополимер лактида и капролактона) и природный биоразлагаемый полимер (например, альгинат и другие полисахариды, включая декстран и целлюлозу, коллаген, их химические производные (замены, добавления химических групп, например алкильной, алкиленовой, гидроксирования, окисления и другие модификации, обычно производимые специалистами в настоящей области техники), альбумин и другие гидрофильные белки (например, зеин и другие проламины и гидрофобные белки)), а также любой их сополимер или смесь. В целом, эти материалы разлагаются либо под действием ферментативного гидролиза, либо под действием воды *in vivo*, в результате поверхностного или объемного разрушения.

Согласно некоторым аспектам, полимер представляет собой биоадгезивный полимер, такой как биоразрушаемый гидрогель, описанный в работе H. S. Sawhney, C. P. Pathak and J. A. Hubbell in *Macromolecules*, 1993, 26, 581-587, идеи которой включены в настоящий документ, полигиалуроновые кислоты, казеин, желатин, глютин, полиангидриды, полиакриловую кислоту, альгинат, хитозан, полиметилметакрилаты, полиэтилметакрилаты, полибутилметакрилат, полиизобутилметакрилат, полигексилметакрилат, полиизодецилметакрилат, полилаурилметакрилат, полифенилметакрилат, полиметилакрилат, полиизопропилакрилат, полиизобутилакрилат и полиоктадецилакрилат.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, полимер представляет собой водорастворимый полимер или гидрофильный полимер. Подходящие водорастворимые полимеры известны из уровня техники, и к ним относятся, например, поливинилпирролидон, гидроксипропилцеллюлоза (HPC, Klucel), гидроксипропилметилцеллюлоза (HPMC, Methocel), нитроцеллюлоза, гидроксипропилэтилцеллюлоза, гидроксипропилбутилцеллюлоза, гидроксипропилпентилцеллюлоза, метилцеллюлоза, этилцеллюлоза (Ethocel), гидроксизтилцеллюлоза, различные алкилцеллюлозы и гидроксилалкилцеллюлозы,

различные простые эфиры целлюлозы, ацетат целлюлозы, карбоксиметилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза натрия, карбоксиметилцеллюлоза кальция, сополимеры винилацетата/котоновой кислоты, полигидроксипропилметакрилат, гидроксиметилметакрилат, сополимеры метакриловой кислоты, полиметакриловая кислота, полиметилметакрилат, сополимеры малеинового ангидрида/простого метилвинилового эфира, поливиниловый спирт, натриевая и кальциевая соль полиакриловой кислоты, полиакриловая кислота, кислые карбоксиполимеры, карбоксиполиметилена, карбоксивиниловые полимеры, сополимер полиоксиэтилена и полиоксипропилена, простой сополимер метилвинилового эфира и малеинового ангидрида, карбоксиметиламид, сополимер метакрилата дивинилбензола калия, полиоксиэтиленгликоли, полиэтиленоксид и их производные, соли и комбинации. Согласно некоторым аспектам, к водорастворимым полимерам или их смесям относятся без ограничения N-связанные или O-связанные углеводы, сахара, фосфаты, углеводы; сахара; фосфаты; полиэтиленгликоль (ПЭГ) (включая формы ПЭГ, которые применяются для дериватизации белков, в том числе моно-(C1-C10)-алкокси- или арилоксиполиэтиленгликоль); монометоксиполиэтиленгликоль; декстран (такой как низкомолекулярный декстран с массой, например, приблизительно 6 кДа), целлюлоза; целлюлоза; другие углеводные полимеры, поли(N-винилпирролидон)полиэтиленгликоль, гомополимеры пропиленгликоля, сополимер полипропиленоксида/этиленоксида, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин) и поливиниловый спирт. Также настоящим изобретением охватываются бифункциональные сшивающие молекулы, которые можно применять для получения ковалентно соединенных мультимеров.

Особенно предпочтительным водорастворимым полимером в контексте настоящего описания является полиэтиленгликоль (ПЭГ). В контексте настоящего описания термин «полиэтиленгликоль» понимают как охватывающий любую из форм ПЭГ, которые можно применять для дериватизации других белков, такую как моно-(C1-C10)-алкокси- или арилоксиполиэтиленгликоль. ПЭГ представляет собой линейный или разветвленный нейтральный простой полиэфир, доступный в широком диапазоне молекулярных масс и растворимый в воде и большинстве органических растворителей. ПЭГ эффективен при исключении других полимеров или пептидов, если они присутствуют в воде, прежде всего благодаря своей высокой динамической подвижности цепи и гидрофильной природе, тем самым создавая водную оболочку или гидратационную сферу при присоединении к другим белкам или полимерным поверхностям. ПЭГ является нетоксичным, неиммуногенным и одобрен Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств для внутреннего потребления.

Способы получения пегилированных соединений могут предусматривать стадии (а) проведения реакции соединения с полиэтиленгликолем (таким как реакционноспособный сложный эфир или альдегидное производное ПЭГ) в условиях, при которых соединение присоединяется к одной или нескольким группам ПЭГ, и (b) получения продукта (продуктов) реакции. В целом, оптимальные условия реакции для реакций ацилирования будут определяться на основании известных параметров и требуемого результата. Например, чем больше соотношение ПЭГ:соединение, тем больше процент полипегилированного продукта. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывающаяся конструкция будет иметь один фрагмент ПЭГ на N-конце. См. патент США № 8234784, включенный в настоящий документ посредством ссылки.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, гетерологичный фрагмент представляет собой углевод. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления,

углевод представляет собой моносахарид (например, глюкозу, галактозу, фруктозу), дисахарид (например, сахарозу, лактозу, мальтозу), олигосахарид (например, раффинозу, стахиозу), полисахарид (крахмал, амилазу, амилопектин, целлюлозу, хитин, каллозу, ламинарин, ксилан, маннан, фукоидан, галактоманнан).

- 5 В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, гетерологичный фрагмент представляет собой липид. Липид, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, представляет собой жирную кислоту, эйкозаноид, простагландин, лейкотриен, тромбоксан, N-ацилэтаноламин, глицеролипид (например, моно-, ди-, тризамещенные глицерины), глицерофосфолипид (например, фосфатидилхолин, 10 фосфатидилинозитол, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин), сфинголипид (например, сфингозин, церамид), стероидный липид (например, стероид, холестерин), преноловый липид, сахаролипид, или поликетид, масло, воск, холестерин, стерин, жирорастворимый витамин, моноглицерид, диглицерид, триглицерид, фосфолипид.

Гетерологичные фрагменты: терапевтические средства

- 15 В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, гетерологичный фрагмент представляет собой терапевтическое средство. Терапевтическим средством может быть любое из известных из уровня техники средств. Примеры терапевтических средств, которые рассматриваются в контексте настоящего описания, включают без ограничения природные ферменты, белки, полученные из естественных источников, рекомбинантные 20 белки, природные пептиды, синтетические пептиды, циклические пептиды, антитела, агонисты рецепторов, цитотоксические средства, иммуноглобулины, блокаторы бета-адренергических рецепторов, блокаторы кальциевых каналов, дилататоры коронарных артерий, сердечные гликозиды, антиаритмические средства, сердечные симпатомиметики, ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента (АСЕ), диуретики, инотропы, 25 редуцирующие холестерин и триглицерид средства, секвестранты желчных кислот, фибраты, ингибиторы 3-гидрокси-3-метилглутерил-(HMG)-CoA редуктазы, производные ниацина, антиадренергические средства, альфа-адреноблокаторы, антиадренергические средства центрального действия, вазодилататоры, калийсберегающие мочегонные средства, тиазиды и родственные средства, антагонисты рецепторов ангиотензина II, 30 периферические вазодилататоры, антиандрогены, эстрогены, антибиотики, ретиноиды, инсулины и аналоги, ингибиторы альфа-глюкозидазы, бигуаниды, меглитиниды, сульфонилмочевины, тиазолидинедионы, андрогены, прогестогены, регуляторы обмена веществ в костной ткани, гормоны передней доли гипофиза, гормоны гипоталамуса, гормоны задней доли гипофиза, гонадотропины, антагонисты гонадотропин- 35 высвобождающего гормона, стимуляторы овуляции, селективные модуляторы рецепторов эстрогена, антитиреоидные средства, тиреоидные гормоны, объемообразующие средства, слабительные средства, антиперистальтические средства, модификаторы флоры, кишечные абсорбенты, кишечные противомикробные средства, противоанорексические, противокашечные, противобулимические 40 средства, средства для подавления аппетита, средства против ожирения, антациды, средства для верхнего желудочно-кишечного тракта, антихолинергические средства, производные аминосалициловой кислоты, модификаторы биологического ответа, кортикостероиды, противоспазматические средства, частичные агонисты 5-HT₄, антигистаминные средства, каннабиноиды, антагонисты дофамина, антагонисты 45 серотонина, цитопротекторы, антагонисты рецептора гистамина H₂, защитное средство для слизистой оболочки, ингибиторы протонного насоса, средства для эрадикационной терапии H. pylori, стимуляторы эритропоэза, средство, влияющее на кроветворение, средства против анемии, гепарины, антифибринолитические средства, гемостатические

средства, факторы сворачивания крови, ингибиторы аденозиндифосфата, ингибиторы
 рецептора гликопротеина, ингибиторы связывания фибриногена с тромбоцитом,
 ингибиторы тромбксана- A_2 , активаторы плазминогена, антитромботические средства,
 глюкокортикоиды, минералокортикоиды, кортикостероиды, селективные
 5 иммунодепрессивные средства, противогрибковые средства, лекарственные средства,
 применяемые при профилактической терапии, ассоциированных со СПИДом инфекциях,
 цитомегаловирусе, нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы, нуклеозидные
 аналоги ингибиторов обратной транскриптазы, ингибиторы протеазы, средства против
 10 анемии, средства против саркомы Капоши, аминогликозиды, карбапенемы,
 цефалоспорины, гликопептиды, линкосамиды, макролиды, оксазолидиноны,
 пенициллины, стрептограммины, сульфонамиды, триметоприм и производные,
 тетрациклины, антигельминтные средства, амeboциды, бигуаниды, алкалоиды хинного
 дерева, антагонисты фолиевой кислоты, производные хинолина, средства для терапия
 15 против *Pneumocystis carinii*, гидразиды, имидазолы, триазолы, нитроимидазолы,
 циклические амины, ингибиторы нейраминидазы, нуклеозиды, фосфат-связывающие
 средства, ингибиторы холинэстеразы, средства для вспомогательной терапии,
 барбитураты и производные, бензодиазепины, производные гамма-аминомасляной
 кислоты, производные гидантоина, производные иминостильбена, производные
 сукцинимиды, противосудорожные средства, алкалоиды спорыньи, лекарственные
 20 препараты против мигрени, модификаторы биологического ответа, поглотители
 карбаминовой кислоты, трициклические производные, деполаризирующие средства,
 недеполаризирующие средства, средства, парализующие нейромышечную систему,
 стимуляторы ЦНС, дофаминергические реагенты, ингибиторы моноаминоксидазы,
 ингибиторы СОМТ, соли алкилсульфокислоты, этиленимины, имидазотетразины,
 25 аналоги азотистого иприта, нитрозомочевины, содержащие платину соединения,
 антиметаболиты, аналоги пурина, аналоги пиримидина, производные мочевины,
 антрациклины, актиномицины, производные камптотецина, эпиподофиллотоксины,
 таксаны, алкалоиды барвинка и аналоги, антиандрогены, антиэстрогены, нестероидные
 ингибиторы ароматазы, антинеопластические ингибиторы протеинкиназ, производные
 30 азаспиродекандиона, транквилизаторы, стимуляторы, ингибиторы обратного захвата
 моноамида, селективные ингибиторы обратного захвата серотонина, антидепрессанты,
 производные бензооксазола, производные бутирофенона, производные
 дибензодиазепина, производные дибензотиазепина, производные
 дифенилбутилпиперидина, фенотиазины, производные тиенобензодиазепина,
 35 производные тиоксанта, аллергенные экстракты, нестероидные средства, антагонисты
 рецепторов лейкотриена, ксантины, антагонист рецептора эндотелина, простагландины,
 сурфактанты легких, муколитики, антимитотические средства, средства для выведения
 мочевой кислоты, ингибиторы ксантиноксидазы, ингибиторы фосфодиэстеразы, соли
 уротропина, производные нитрофурана, хинолоны, миорелаксанты гладких мышц,
 40 парасимпатомиметические средства, галогенпроизводные углеводов, эфиры
 аминокислот, амиды (например, лидокаин, артикаина гидрохлорид,
 бупивакаина хлоргидрат), жаропонижающие средства, снотворные средства и
 седативные средства, циклопирролоны, пиразолопиримидины, нестероидные
 противовоспалительные лекарственные средства, опиоиды, производные
 45 парааминофенола, ингибитор алкогольдегидрогеназы, антагонисты гепарина,
 адсорбенты, рвотные средства, антагонисты опиоидов, реактиваторы холинэстеразы,
 средства для заместительной терапии никотина, аналоги и антагонисты витамина А,
 аналоги и антагонисты витамина В, аналоги и антагонисты витамина С, аналоги и

антагонисты витамина D, аналоги и антагонисты витамина E, аналоги и антагонисты витамина K.

Конъюгаты: индикаторные средства

В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, связывающаяся конструкция конъюгирована с индикаторным средством. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, индикаторное средство способно излучать детектируемый (поддающийся измерению) сигнал за счет ферментативной активности, радиоактивности, хромогенной активности и/или связывающей активности. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, сигнал является радиоактивным, хромогенным, колориметрическим, флуорометрическим, хемилюминесцентным, усиленным хемилюминесцентным, прямым флуоресцентным, разрешенным во времени флуоресцентным, прямым хемилюминесцентным, фосфоресцирующим, ферментативным или основанным на связывании микро- или наночастицы, стрептавидина/авидина с биотином и белком A. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, индикаторное средство включает в себя фермент, радиоактивный изотоп, ДНК-репортер, хромогенный или флуорогенный репортер или электрохемилюминесцентную метку. Согласно иллюстративным аспектам, фермент представляет собой пероксидазу хрена (HRP), щелочную фосфатазу (AP), глюкозооксидазу или бета-галактозидазу. Согласно иллюстративным аспектам, фермент при воздействии определенных реагентов вызывает выработку хемилюминесцентного или светового сигнала. Согласно иллюстративным аспектам, радиоизотоп представляет собой I^{125} . Согласно иллюстративным аспектам, ДНК-репортер представляет собой ДНК-зонд. Согласно иллюстративным аспектам, флуорогенный репортер представляет собой фикоэритрин (PE), например, B-PE, R-PE или аллоцикоцианин (APC).

Конъюгаты: димеры и мультимеры

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, связывающаяся конструкция представлена в виде димера или мультимера, в котором друг с другом связаны несколько связывающихся конструкций по настоящему изобретению. Димер, согласно некоторым аспектам, представляет собой гомодимер, содержащий две связывающихся конструкции одного типа (например, с одной структурой), которые соединены друг с другом. Согласно альтернативным аспектам, димер представляет собой гетеродимер, содержащий две связывающихся конструкции по настоящему изобретению, причем две связывающихся конструкции структурно отличаются друг от друга. Мультимер, согласно некоторым аспектам, является гомомультимером, содержащим более одной связывающейся конструкции по настоящему изобретению, и каждая связывающаяся конструкция относится к одному и тому же типу (например, все они имеют одинаковую структуру). Согласно альтернативным аспектам, мультимер представляет собой гетеромультимер, содержащий более одной связывающейся конструкции по настоящему изобретению, и причем по меньшей мере две связывающихся конструкции гетеромультимера структурно отличаются друг от друга. Согласно иллюстративным аспектам, связывающаяся конструкция содержит димер, например, гомодимер, из двух Fab-фрагментов, причем каждый такой Fab-фрагмент связывается с FIXp, но не с FIX WT, например, связывается с FIXp даже в присутствии FIX WT или в образце, содержащем плазму крови человека. Согласно иллюстративным аспектам, гомодимер, содержащий два Fab-фрагмента, является бивалентным, но все еще моноспецифическим в отношении FIXp. Согласно иллюстративным аспектам, каждый Fab-фрагмент гомодимера содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6-11. Согласно иллюстративным аспектам, между каждой из SEQ ID NO: 6-11

присутствует одна или несколько аминокислот. Согласно иллюстративным аспектам, каждый Fab-фрагмент гомодимера содержит последовательность SEQ ID NO: 24, или SEQ ID NO: 25, или как SEQ ID NO: 24, так и SEQ ID NO: 25. Согласно иллюстративным аспектам, каждый Fab-фрагмент гомодимера содержит последовательность SEQ ID NO: 26, или SEQ ID NO: 27, или как SEQ ID NO: 26, так и SEQ ID NO: 27.

Две или более связывающихся конструкций можно совместно связать с помощью стандартных связывающих средств и процедур, известных специалистам в настоящей области техники. В соответствии с определенными вариантами осуществления, линкер, соединяющий две (или более) связывающихся конструкции, является известным из уровня техники линкером. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, линкер представляет собой дисульфидную связь. Например, каждый мономер в димере может содержать сульфгидрил, и атом серы каждого из них участвует в образовании дисульфидной связи. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, линкер представляет собой мотив «спираль-петля-спираль». Согласно иллюстративным аспектам, каждый мономер в димере соединен посредством мотива «спираль-петля-спираль». Согласно иллюстративным аспектам, каждый мономер в димере соединен посредством домена щелочной фосфатазы.

Согласно иллюстративным аспектам, гомодимер, содержащий два Fab-фрагмента, содержит линкер, соединяющий два Fab-фрагмента. Согласно иллюстративным аспектам, гомодимер содержит синтетический двойной мотив «спираль-петля-спираль», например, такой, который описан в работе Haylock et al., *Int J. Oncol.* 48(2): 461-470 (2016) или в работе Wang et al., *Anal. Chem.* 78: 997-1004 (2006). Согласно иллюстративным аспектам, гомодимер содержит константный домен антитела. Такие домены антител описаны в работе Hu et al., *Cancer Res* 56: 3055-3061 (1996) и в работе McGregor et al., *Mol Immuno* 31: 219-226 (1994). Согласно иллюстративным аспектам, гомодимер содержит домен бактериальной щелочной фосфатазы, например, такой, который описан в работе Wang et al. (2006), выше. Согласно иллюстративным аспектам, гомодимер содержит последовательность SEQ ID NO: 28, или SEQ ID NO: 27, или как SEQ ID NO: 28, так и SEQ ID NO: 27.

Нуклеиновые кислоты

Кроме того, настоящее изобретение относится к нуклеиновым кислотам, содержащим нуклеотидную последовательность, кодирующую любую из описываемых в настоящем документе связывающихся конструкций (например, антитела, антигенсвязывающие фрагменты, полипептиды или конъюгаты). В контексте настоящего документа «нуклеиновая кислота» включает «полинуклеотид», «олигонуклеотид» и «молекулу нуклеиновой кислоты» и в целом означает полимер ДНК или РНК, который может быть одноцепочечным или двухцепочечным, синтезированным или полученным (например, выделенным и/или очищенным) из природных источников, который может содержать природные, неприродные или измененные нуклеотиды и который может содержать природную, неприродную или измененную межнуклеотидную связь, такую как фосфорамидатная связь или фосфотиоатная связь, вместо фосфодиэфирной, встречающейся между нуклеотидами немодифицированного олигонуклеотида. Обычно предпочтительно, чтобы нуклеиновая кислота не содержала никаких вставок, делеций, инверсий и/или замен. Тем не менее, в некоторых случаях, как рассмотрено в настоящем документе, может быть подходящим, чтобы нуклеиновая кислота содержала одну или несколько вставок, делеций, инверсий и/или замен.

Предпочтительно, нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению являются рекомбинантными. В контексте настоящего документа термин «рекомбинантный»

относится к (i) молекулам, которые сконструированы вне живых клеток путем соединения природных или синтетических сегментов нуклеиновой кислоты с молекулами нуклеиновой кислоты, которые могут реплицироваться в живой клетке, или (ii) молекулам, которые являются продуктом репликации молекул, описанных выше в (i).

5 В контексте настоящего документа репликация может быть репликацией *in vitro* или репликацией *in vivo*.

Нуклеиновые кислоты можно конструировать с использованием химического синтеза и/или ферментативных реакций лигирования с помощью процедур, известных в настоящей области техники. См., например, Sambrook et al., выше, и Ausubel et al., выше.

10 Например, нуклеиновую кислоту можно химически синтезировать с применением встречающихся в природе нуклеотидов или различным образом модифицированных нуклеотидов, предназначенных для повышения биологической стабильности молекул или для повышения физической стабильности образующегося при гибридизации дуплекса (например, фосфотиоатные производные и нуклеотиды с акридиновым заместителем).

15 К примерам модифицированных нуклеотидов, которые можно применять для получения нуклеиновых кислот, относятся без ограничения 5-фторурацил, 5-бром урацил, 5-хлорурацил, 5-йодурацил, гипоксантин, ксантин, 4-ацетилцитозин, 5-(карбоксигидроксиметил)урацил, 5-карбоксиметиламин метил-2-тиоуридин, 5-карбоксиметиламин метилурацил, дигидроурацил, бета-D-галактозилквеуозин, инозин,

20 N6-изопентениладенин, 1-метилгуанин, 1-метилюридин, 2,2-диметилгуанин, 2-метиладенин, 2-метилгуанин, 3-метилцитозин, 5-метилцитозин, N-замещенный аденин, 7-метилгуанин, 5-метиламин метилурацил, 5-метоксиамин метил-2-тиоурацил, бета-D-маннозилквеуозин, 5'-метоксикарбоксиметилурацил, 5-метоксиурацил, 2-метилтио-N6-изопентениладенин, урацил-5-оксиуксусная кислота (v), вибутоксозин, псевдоуратил,

25 квеуозин, 2-тиоцитозин, 5-метил-2-тиоурацил, 2-тиоурацил, 4-тиоурацил, 5-метилурацил, метиловый эфир урацил-5-оксиуксусной кислоты, 3-(3-амино-3-N-2-карбоксипропил) урацил и 2,6-диаминопурин. Альтернативно, одну или несколько нуклеиновых кислот по настоящему изобретению можно приобрести у таких компаний, как Macromolecular Resources (Форт-Коллинс, Колорадо) и Synthesgen (Хьюстон, Техас).

30 Согласно некоторым аспектам, нуклеиновая кислота кодирует лишь часть антител, антигенсвязывающих фрагментов, полипептидов или конъюгатов. Например, если конъюгат содержит полимер, который не содержит аминокислот и, следовательно, не кодируется нуклеиновой кислотой, такая нуклеиновая кислота кодирует лишь такую часть конъюгата, которая может кодироваться нуклеиновой кислотой. В соответствии

35 с иллюстративными вариантами осуществления, нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, в каждой из которой содержится SEQ ID NO: 6-11. Согласно иллюстративным аспектам, нуклеиновая кислота кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, в каждой из которых содержится SEQ ID NO: 6-11, причем между

40 каждой из SEQ ID NO: 6-11 присутствует одна или несколько аминокислот. Согласно иллюстративным аспектам, нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который дополнительно содержит метку экспрессии, например метку FLAG, содержащую DYKDDDDK (SEQ ID NO: 12), и/или гекса-His-метку, содержащую HHHHHH (SEQ ID NO: 13).

45 Нуклеиновые кислоты пригодны, например, в способах рекомбинантного получения связывающихся конструкций по настоящему изобретению.

Рекомбинантный вектор экспрессии

Нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению можно встроить в

рекомбинантный вектор экспрессии или «вектор». В этом отношении настоящее изобретение относится к рекомбинантным векторам экспрессии или «векторам», содержащим любую из нуклеиновых кислот по настоящему изобретению. В контексте настоящего документа термин «рекомбинантный вектор экспрессии» или «вектор» 5 означает генетически модифицированную олигонуклеотидную или полинуклеотидную конструкцию, которая обеспечивает экспрессию мРНК, белка, полипептида или пептида клеткой-хозяином, если такая конструкция содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую мРНК, белок, полипептид или пептид, и вектор вводят в контакт с клеткой в условиях, достаточных для того, чтобы мРНК, белок, полипептид или пептид 10 экспрессировались в клетке. Векторы по настоящему изобретению не встречаются в природе в целом виде. Однако части векторов могут встречаться в природе. Рекомбинантные векторы экспрессии по настоящему изобретению могут содержать нуклеотиды любого типа, включая без ограничения ДНК и РНК, которые могут быть одноцепочечными или двухцепочечными, синтезированными или полученными частично 15 из природных источников и которые могут содержать природные, неприродные или измененные нуклеотиды. Рекомбинантные векторы экспрессии могут содержать встречающиеся в природе или не встречающиеся в природе межнуклеотидные связи или связи обоих таких типов. Предпочтительно, измененные нуклеотиды или не встречающиеся в природе межнуклеотидные связи не препятствуют транскрипции или 20 репликации вектора.

Рекомбинантный вектор экспрессии по настоящему изобретению может представлять собой любой подходящий рекомбинантный вектор экспрессии, и его можно применять для трансформации или трансфекции любого подходящего хозяина. К подходящим векторам относятся векторы, которые предназначены для размножения и увеличения 25 в количестве или для экспрессии или как первого, так и второго, такие как плазмиды и вирусы. Вектор можно выбрать из группы, состоящей из серии pUC (Fermentas Life Sciences), серии pBluescript (Stratagene, Ла-Холья, Калифорния), серии pET (Novagen, Мэдисон, Висконсин), серии pGEX (Pharmacia Biotech, Уппсала, Швеция) и серии pEX (Clontech, Пало-Алто, Калифорния). Также можно применять векторы на основе 30 бактериофага, такие как λ GT10, λ GT11, λ ZapII (Stratagene), λ EMBL4 и λ NMI 149. К примерам векторов экспрессии у растений относятся pBIO1, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 и pBIN19 (Clontech). К примерам векторов экспрессии у животных относятся pEUK-C1, pMAM и pMAMneo (Clontech). Предпочтительно, рекомбинантный вектор экспрессии представляет собой вирусный вектор, например, ретровирусный вектор.

Рекомбинантные векторы экспрессии по настоящему изобретению можно получить с помощью стандартных методик с применением рекомбинантной ДНК, описанных, например, в Sambrook et al., выше, и Ausubel et al., выше. Конструкции векторов экспрессии, которые являются циклическими или линейными, можно получить такими, чтобы они содержали систему репликации, способную функционировать в 40 прокариотической или эукариотической клетке-хозяине. Системы репликации можно получить, например, из CoIE1, плазмиды 2 μ , λ , SV40, вируса папилломы крупного рогатого скота и др.

Желательно, чтобы рекомбинантный вектор экспрессии содержал регуляторные последовательности, такие как кодоны инициации и терминации транскрипции и трансляции, которые специфичны в отношении типа хозяина (например, бактерии, гриба, растения или животного), в который необходимо ввести вектор, в зависимости и с учетом того, является ли такой вектор ДНК- или РНК-вектором.

Рекомбинантный вектор экспрессии может содержать нативный или нормативный

промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей полипептид (в том числе его функциональные части и функциональные варианты), или с нуклеотидной последовательностью, которая комплементарна или которая гибридизируется с нуклеотидной последовательностью, кодирующей полипептид. Выбор промоторов, например, сильных, слабых, индуцируемых, тканеспецифических и специфических для стадии развития, входит в компетенцию рядового специалиста в настоящей области техники. Аналогичным образом, объединение нуклеотидной последовательности с промотором также входит в компетенцию рядового специалиста в настоящей области техники. Промотор может быть невирусным промотором или вирусным промотором, например цитомегаловирусным промотором (CMV), промотором SV40, промотором RSV и промотором, встречающимся в длинном концевом повторе вируса мышинных стволовых клеток.

Рекомбинантные векторы экспрессии по настоящему изобретению могут быть предназначены либо для временной экспрессии, либо для стабильной экспрессии, либо для того и другого. Также можно создать рекомбинантные векторы экспрессии для конститутивной экспрессии или для индуцируемой экспрессии. Дополнительно можно создать такие рекомбинантные векторы экспрессии, чтобы они включали «суицидальный» ген.

Клетки-хозяева

Настоящее изобретение дополнительно относится к клетке-хозяину, содержащей любую из описываемых в настоящем документе нуклеиновых кислот или рекомбинантных векторов экспрессии. В контексте настоящего документа термин «клетка-хозяин» обозначает клетку любого типа, которая может содержать и экспрессировать рекомбинантный вектор экспрессии по настоящему изобретению.

Клетка-хозяин может быть эукариотической клеткой, например, растения, животного, гриба или водоросли, или может быть прокариотической клеткой, например, бактерией или простейшим. Клетка-хозяин может быть культивированной клеткой или первичной клеткой, т. е. выделенной непосредственно из организма, например, человека. Клетка-хозяин может быть адгезивной клеткой или суспендированной клеткой, т.е. клеткой, которая растет во взвешенном состоянии. Подходящие клетки-хозяева известны из уровня техники и включают, например, клетки E. Coli DH5α, клетки яичника китайского хомячка, клетки VERO обезьян, клетки COS, клетки HEK293 и др. С точки зрения амплификации или репликации рекомбинантного вектора экспрессии, клетка-хозяин предпочтительно представляет собой прокариотическую клетку, например, клетку DH5α. С точки зрения получения рекомбинантного полипептида, клетка-хозяин предпочтительно представляет собой клетку млекопитающего, например, клетку СНО.

Наборы

Настоящее изобретение относится к наборам, содержащим любую одну или любые несколько связывающихся конструкций по настоящему раскрытию. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, набор содержит описываемое в настоящем документе антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, или полипептид, или конъюгат, или нуклеиновую кислоту, или вектор, или клетку-хозяина или комбинацию любых из вышеперечисленных. Согласно иллюстративным аспектам, связывающаяся конструкция в наборе представлена в заданном количестве или в заданной концентрации. Например, набор может представлять собой набор для детекции, содержащий заданное количество связывающейся конструкции для детекции FIX Padua в образце. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, одна или несколько связывающихся конструкций по настоящему раскрытию представлены в

наборе в водном растворе. Согласно иллюстративным аспектам, водный раствор поставляют конечному потребителю на сухом льду. Согласно некоторым аспектам, водный раствор поставляют конечному потребителю отдельно от других компонентов набора. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, связывающиеся конструкции по настоящему раскрытию представлены в наборе в лиофилизированной или другой высушенной сублимацией форме. Согласно иллюстративным аспектам, связывающиеся конструкции по настоящему раскрытию представлены в наборе в замороженной или криоконсервированной форме. Согласно иллюстративным аспектам, концентрация антитела, или антигенсвязывающего фрагмента, или полипептида, или конъюгата, которые представлены в наборе, составляет приблизительно 1-10 мкг/мл или приблизительно 1-5 мкг/мл. Согласно иллюстративным аспектам, концентрация антитела, или антигенсвязывающего фрагмента, или полипептида, или конъюгата, которые представлены в наборе, составляет приблизительно 1,5 мкг/мл или приблизительно 2,0 мкг/мл.

Согласно иллюстративным аспектам, набор также содержит твердую подложку, и, согласно иллюстративным аспектам, на эту твердую подложку предварительно нанесено антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, или полипептид, или конъюгат. Согласно иллюстративным аспектам, набор содержит твердую подложку, выбранную из группы, состоящей из пробирки, чашки, колбы, мешка, планшета (например, микротитровального планшета), мембраны, фильтра, микроносителя, волокна, зонда и др. Согласно иллюстративным аспектам, твердая подложка выполнена из полимера. Согласно иллюстративным аспектам, твердая подложка выполнена из агарозы, целлюлозы, декстрана, полиакриламида, латекса или стекла с контролируемым размером пор. Согласно иллюстративным аспектам, твердая подложка выполнена из агарозы. Согласно иллюстративным аспектам, твердая подложка выполнена из поливинилдифторида (PVDF), нитроцеллюлозы, нейлона 66, протраннитроцеллюлозы или бумаги. Согласно иллюстративным аспектам, мембрана представляет собой одну из мембран Immobilon®, Protran®, QuickDraw®, Westran®, Whatman® или Hybond® (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури). Согласно иллюстративным аспектам, твердая подложка представляет собой полимерный микроноситель, микротитровальный планшет, мембрану или фильтр. Согласно иллюстративным аспектам, набор содержит твердую подложку, на которую предварительно нанесено покрытие раствора, содержащего приблизительно 100 нг или более, приблизительно 150 нг или более, приблизительно 200 нг или более, приблизительно 500 нг или более антитела, или антигенсвязывающего фрагмента, или полипептида, или конъюгата. Согласно некоторым аспектам, набор содержит твердую подложку, на которую предварительно нанесено покрытие раствора, содержащего от приблизительно 50 нг до приблизительно 550 нг, от приблизительно 100 нг до приблизительно 500 нг, от приблизительно 125 нг до приблизительно 400 нг, от приблизительно 150 нг до приблизительно 350 нг, от приблизительно 175 нг до приблизительно 300 нг или от приблизительно 200 нг до приблизительно 250 нг антитела, или антигенсвязывающего фрагмента, или полипептида, или конъюгата. Согласно некоторым аспектам, набор содержит твердую подложку, на которую предварительно нанесено покрытие раствора, содержащего от приблизительно 100 нг до приблизительно 150 нг, от приблизительно 150 нг до приблизительно 200 нг, от приблизительно 200 нг до приблизительно 500 нг антитела, или антигенсвязывающего фрагмента, или полипептида, или конъюгата. Согласно иллюстративным аспектам, набор содержит твердую подложку, содержащую предварительно поделенные на аликвоты количества антитела, или антигенсвязывающего фрагмента, или полипептида, или конъюгата.

Согласно иллюстративным аспектам, набор содержит микротитровальный планшет, причем каждая лунка микротитровального планшета содержит раствор, содержащий от приблизительно 100 мкл до приблизительно 500 мкл раствора, содержащего

5 антигенсвязывающего фрагмента, или полипептида, или конъюгата. Согласно иллюстративным аспектам, набор содержит микротитровальный планшет, причем каждая лунка микротитровального планшета содержит раствор, содержащий от приблизительно 100 мкл до приблизительно 500 мкл раствора, содержащего приблизительно 2,5 мкг/мл антитела, или антигенсвязывающего фрагмента, или

10 полипептида, или конъюгата.

Согласно иллюстративным аспектам, набор содержит дополнительные реагенты, субстраты, растворители, буферы, разбавители и т. д., применяемые в описываемых в настоящем документе способах детекции. Согласно иллюстративным аспектам, один или несколько дополнительных компонентов представлены в наборе в заданном

15 количестве, например, количестве, необходимом и подходящем для анализа на детекцию.

Согласно иллюстративным аспектам, набор содержит вторичное антитело, которое связывается с FIX Padua-связывающимся антителом, антигенсвязывающим фрагментом, полипептидом или конъюгатом. Согласно иллюстративным аспектам, вторичное антитело содержит индикаторное средство. В соответствии с иллюстративными

20 вариантами осуществления, индикаторное средство включает в себя фермент, радиоактивный изотоп, ДНК-репортер, хромогенный или флуорогенный репортер или электрохемилюминесцентную метку. Индикаторное средство может представлять собой любое из описанных в настоящем документе индикаторных средств. Согласно иллюстративным аспектам, к индикаторному средству присоединено вторичное антитело

25 или FIX Padua-связывающееся антитело, антигенсвязывающий фрагмент, полипептид или конъюгат.

Композиции

Настоящее изобретение относится к композициям, содержащим любую одну или любые несколько связывающихся конструкций по настоящему раскрытию. Согласно

30 иллюстративным аспектам, композиция содержит описываемую в настоящем документе связывающуюся конструкцию, смешиваемую с индикаторным средством. Согласно иллюстративным аспектам, индикаторное средство представляет собой любое из описанных в настоящем документе индикаторных средств. См. раздел под заголовком «Конъюгаты: индикаторные средства».

35 Согласно иллюстративным аспектам, композиция содержит описываемую в настоящем документе связывающуюся конструкцию, смешиваемую с биологическим образцом, полученным от субъекта. Согласно иллюстративным аспектам, биологический образец представляет собой любой из описываемых в настоящем документе биологических образцов. См. раздел под заголовком «Образцы». Согласно

40 иллюстративным аспектам, композиция содержит описываемые в настоящем документе антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, или полипептид, или конъюгат, смешиваемые с биологическим образцом, содержащим плазму крови человека или ее разведенную фракцию. Согласно иллюстративным аспектам, композиция содержит описываемые в настоящем документе антитело, или антигенсвязывающий фрагмент,

45 или полипептид, или конъюгат, смешиваемые с биологическим образцом, содержащим ткань человека или ее клетки. Согласно иллюстративным аспектам, биологический образец содержит ткань печени. Согласно иллюстративным аспектам, композиция дополнительно содержит индикаторное средство.

Настоящее изобретение дополнительно относится к композициям, содержащим любую одну или несколько связывающихся конструкций по настоящему изобретению, смешиваемых с образцом, например, биологическим образцом, содержащим белки плазмы крови человека. Согласно иллюстративным аспектам, композиция содержит описываемые в настоящем документе антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, или полипептид, или конъюгат, смешиваемые по меньшей мере с одним из белков плазмы крови человека, выбранным из группы, состоящей из фактора IX, фактора II и фактора X и их вариантов. Согласно иллюстративным аспектам, композиция дополнительно содержит индикаторное средство.

Способы детекции

Связывающиеся конструкции, которые представлены в настоящем документе, пригодны, например, в способах детекции, которые позволяют производить однозначную или специфическую детекцию FIX Padua в образцах, например, клинических образцах, содержащих, например, FIX Padua и FIX WT. Связывающиеся конструкции можно применять в любом анализе или методике на основе антител или в любом иммуноанализе, которые известны в настоящей области техники, таком как без ограничения радиоиммуноанализ (RIA), магнитный иммуноанализ (MIA), иммуноцитохимические (ICC) анализы, иммуногистохимические (IHC) анализы, иммунофлуоресцентные анализы, ИФА, EIA, ELISPOT, иммуноферментный анализ, анализ связывания радиоактивных меток, вестерн-блоттинг, иммунопреципитация, дот-блоттинг, проточная цитометрия, количественный иммуноанализ на основе ПЦР в режиме реального времени, белковые микрочипы и др. См., например, The Immunoassay Handbook (Fourth Edition); Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques, ed. Wild, Elsevier Ltd. (Oxford, UK) 2013, Green and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY) 2012, и Immunoassay, Diamandis and Christopolous, Academic Press 1996.

Соответственно, настоящее изобретение относится к применениям описываемых в настоящем документе связывающихся конструкций (например, антитела или антигенсвязывающего фрагмента, полипептида или конъюгата), нуклеиновой кислоты, вектора, клетки-хозяина и/или набора для детекции фактора IX Padua в образце. Согласно иллюстративным аспектам, образец представляет собой биологический образец, который был получен от субъекта, которому был введен вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую FIX Padua. Например, в соответствии с различными вариантами осуществления, субъект страдает от нарушения свертываемости крови и проходит заместительную терапию фактора IX, необязательно осуществляемую путем экспрессии нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный фактор IX Padua.

Также настоящее изобретение относится к способам детекции фактора IX Padua в образце, полученном от субъекта. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, способ предусматривает (i) приведение в контакт образца со связывающейся конструкцией (например, описываемым в настоящем документе антителом, или антигенсвязывающим фрагментом, или полипептидом, или конъюгатом) для формирования комплекса (например, иммунокомплекса), содержащего FIXr и связывающуюся конструкцию (например, антитело, антигенсвязывающий фрагмент, полипептид или конъюгат), и (ii) детекцию комплекса.

В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, FIX Padua содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, детекция комплекса

предусматривает детекцию сигнала от индикаторного средства. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, сигнал образуется за счет ферментативной активности, радиоактивности, хромогенной активности и/или связывающей активности. В соответствии с иллюстративными вариантами

- 5 осуществления, сигнал является радиоактивным, хромогенным, колориметрическим, флуориметрическим, хемилюминесцентным, усиленным хемилюминесцентным, прямым флуоресцентным, разрешенным во времени флуоресцентным, прямым хемилюминесцентным, фосфоресцирующим, ферментативным или основанным на связывании микро- или наночастицы, стрептавидина/авидина с биотином и белком А.
- 10 В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, индикаторное средство включает в себя фермент, радиоактивный изотоп, ДНК-репортер, хромогенный или флуорогенный репортер, электрохемилюминесцентную метку. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, детекция комплекса предусматривает осуществление метода поверхностного плазмонного резонанса для детекции комплекса
- 15 или измерение изменения сопротивления на электроде (по мере связывания FIX Padua с антителом, антигенсвязывающим фрагментом, полипептидом или конъюгатом). См. González-Díaz et al., "Plasmonic Au/Co/Au nanosandwiches with Enhanced Magneto-Optical Activity" *Small*4(2): 202-5 (2008) и Tsekenis (2008). "Label-less immunosensor assay for myelin basic protein based upon an ac impedance protocol." *Analytical Chemistry*80(6): 2058-62 (2008).
- 20 Согласно иллюстративным аспектам, фермент представляет собой пероксидазу хрена (HRP), щелочную фосфатазу (AP), глюкозооксидазу или бета-галактозидазу. Согласно иллюстративным аспектам, фермент подвергают воздействию реагентов, которые заставляют его хемилюминесцировать или испускать свет. Согласно иллюстративным
- 25 аспектам, радиоизотоп представляет собой I^{125} . Согласно иллюстративным аспектам, ДНК-репортер представляет собой ДНК-зонд. См., например, Rajkovic, "Immunoquantitative real-time PCR for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B in foods." *Applied and Environmental Microbiology* 72 (10): 6593-9 (2006); и Gofflot "Immuno-quantitative polymerase chain reaction for detection and quantitation of prion protein." *Journal of Immunoassay and Immunochemistry* 25 (3): 241-58 (2004). Согласно
- 30 иллюстративным аспектам, флуорогенный репортер представляет собой фикоэритрин (PE), например, B-PE, R-PE или аллоцикоцианин (APC).

В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, или полипептид конъюгированы с индикаторным средством. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, конъюгат

35 содержит индикаторное средство. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, или полипептид не конъюгированы с индикаторным средством, или конъюгат не содержит индикаторное средство. В соответствии с такими иллюстративными вариантами осуществления, способы предусматривают приведение в контакт образца со вторичным антителом,

40 содержащим индикаторное средство, причем вторичное антитело связывается с антителом, или антигенсвязывающим фрагментом, или полипептидом, или конъюгатом. Вторичное антитело может быть любым антителом любого изотипа или класса при условии, что вторичное антитело будет связываться с антителом к FIX Padua, его антигенсвязывающим фрагментом, полипептидом или конъюгатом.

45 В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, или полипептид конъюгированы с твердой подложкой. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, конъюгат включает твердую подложку. Например, твердая подложка выбрана из группы, состоящей из

пробирки, чашки, колбы, мешка, планшета (например, микротитровального планшета), мембраны, фильтра, микроносителя, волокна, зонда и др. Согласно иллюстративным аспектам, твердая подложка выполнена из полимера. Согласно иллюстративным аспектам, твердая подложка выполнена из агарозы, целлюлозы, декстрана, полиакриламида, латекса или стекла с контролируемым размером пор. Согласно иллюстративным аспектам, твердая подложка выполнена из агарозы. Согласно иллюстративным аспектам, твердая подложка выполнена из поливинилдифторида (PVDF), нитроцеллюлозы, нейлона 66, протраннитроцеллюлозы или бумаги. Согласно иллюстративным аспектам, мембрана представляет собой одну из мембран Immobilon®, Protran®, QuickDraw®, Westran®, Whatman® или Hybond® (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури). Согласно иллюстративным аспектам, твердая подложка представляет собой полимерный микроноситель, магнитный или парамагнитный микроноситель, микротитровальный планшет, мембрану или фильтр.

Субъекты

В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, упоминаемый в настоящем документе субъект представляет собой млекопитающее, включая без ограничения млекопитающих отряда Rodentia, таких как мыши и хомяки, и млекопитающих отряда Logomorpha, таких как кролики, млекопитающих из отряда Carnivora, включая кошачьих (кошек) и псовых (собак), млекопитающих из отряда Artiodactyla, включая бычьих (коров) и свиней (поросят), или отряда Perssodactyla, включая лошадей (коней). Согласно некоторым аспектам, млекопитающие принадлежат к отряду приматов, широконосых обезьян или обезьянообразных (обезьяны) или к отряду антропоидов (люди и человекообразные обезьяны). Согласно иллюстративным аспектам, млекопитающее является человеком. Согласно иллюстративным аспектам, человек-субъект является взрослым, например, возрастом 18 лет или старше, или подростком. Согласно иллюстративным аспектам, субъекту был введен вектор экспрессии, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую FIX Padua, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1. Согласно иллюстративным аспектам, субъект имеет нарушение свертываемости крови. Согласно иллюстративным аспектам, субъект имеет нарушение свертываемости крови, при котором кровь субъекта не сворачивается должным образом. Согласно иллюстративным аспектам, у субъекта отсутствует экспрессия или имеет место низкий уровень экспрессии фактора IX, например, фактора IX WT. Согласно иллюстративным аспектам, субъект имеет мутацию в гене, кодирующем фактор IX. Согласно иллюстративным аспектам, субъект страдает гемофилией, например гемофилией В (также известной как болезнь Кристмаса). Согласно иллюстративным аспектам, субъект характеризуется свертывающей активностью, которая превышает нормальную. Согласно иллюстративным аспектам, субъект имеет природный FIX Padua, например, имеет мутацию гена, приводящую к экспрессии FIX Padua.

Образцы

В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления, упоминаемый в настоящем документе образец представляет собой биологический образец, содержащий одну или несколько жидкостей организма, например, жидкостей человеческого организма. Согласно иллюстративным аспектам, образец содержит жидкость организма, в том числе без ограничения кровь, плазму крови, сыворотку, лимфу, грудное молоко, слюну, слизистую, сперму, влагалищные выделения, клеточные экстракты, воспалительные жидкости, спинномозговую жидкость, фекалии, жидкую часть стекловидного тела или мочу, полученную от субъекта. Согласно иллюстративным

аспектам, образец содержит кровь, плазму крови или сыворотку. Согласно иллюстративным аспектам, образец получен из крови, плазмы крови или сыворотки. Согласно иллюстративным аспектам, образец представляет собой фракцию крови, плазмы крови или сыворотки. Согласно иллюстративным аспектам, образец представляет собой образец крови, образец плазмы крови или образец сыворотки. Согласно иллюстративным аспектам, образец содержит кровь или ее фракцию (например, плазму крови, сыворотку). Согласно иллюстративным аспектам, образец содержит или представляет собой плазму крови.

Согласно иллюстративным аспектам, образец представляет собой образец ткани человека. Согласно иллюстративным аспектам, образец ткани человека содержит мышечную ткань, эпителиальную ткань, соединительную ткань или нервную ткань. Согласно иллюстративным аспектам, образец ткани человека содержит костную ткань. Согласно иллюстративным аспектам, образец ткани человека содержит ткань сердца, ткань селезенки, ткань лимфатического узла, ткань головного мозга, ткань спинного мозга, нервную ткань, ткань уха, носа или глаза, ткань груди, подкожную ткань, ткань молочной железы, миелоидную ткань, лимфоидную ткань, ткань носоглотки, ткань гортани, ткань трахеи, ткань бронха, ткань легкого, ткань кожи, ткань слюнной железы, ткань с языка или полости рта, ткань ротоглотки, ткань гортаноглотки, ткань пищевода, ткань желудка, ткань тонкой кишки, ткань аппендикса, ткань толстой кишки, ткань прямой кишки, ткань анального отверстия, ткань печени, ткань желчного протока, ткань поджелудочной железы, ткань желчного пузыря, ткань почки, ткань мочеочника, ткань мочевого пузыря, ткань уретры, ткань матки, ткань влагалища, ткань вульвы, ткань яичника, ткань плаценты, ткань мошонки, ткань полового члена, ткань предстательной железы, ткань яичка, ткань семенного пузырька, ткань гипофиза, ткань шишковидной железы, ткань щитовидной железы, ткань парашитовидной железы, ткань надпочечников или ткань панкреатических островков. Согласно иллюстративным аспектам, образец ткани человека содержит ткань печени, или ткань селезенки, или ткань почки. Согласно иллюстративным аспектам, образец ткани человека содержит ткань печени.

Последующие примеры приведены лишь с целью иллюстрации настоящего изобретения и никоим образом не ограничения его объема.

Примеры

Пример 1

В этом примере продемонстрирован способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению.

Для отбора кандидата специфической, связывающейся с FIX Padua конструкции применяли способ фагового дисплея. Фаговую библиотеку подвергали скринингу с применением линейного пептида, который включал единственную аминокислотную замену в положении 338, структурного пептида, который включал единственную аминокислотную замену в положении 338, или полноразмерного рекомбинантного FIX Padua для захвата кандидатов. Три раунда пэннинга, с конкуренцией и без нее, с последовательностями FIX дикого типа, приводили к выявлению нескольких кандидатов связывающихся конструкций. Для определения специфичности и аффинности полученных кандидатов проводили эксперименты BIACORE и ИФА.

Один кандидат (называемый BC1) получали с помощью линейного пептида, содержащего последовательность DRATCLLSTKFT, а два кандидата (называемые BC2 и BC3) получали со структурным пептидом, содержащим последовательность LVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFH. Еще один кандидат (BC4) получали с помощью

пептида, содержащего линейный пептид или структурный пептид и чередующегося с FIX Padua.

Из результатов скрининговых анализов было видно, что кандидаты связываются с FIX Padua. В случае BC2 и BC3 сигнал связывания (кратность относительно фонового) с FIX дикого типа был меньше 11, тогда как сигнал связывания (кратность относительно фонового) с FIX Padua был более 71. В случае BC1 сигнал связывания (кратность относительно фонового) с FIX дикого типа составлял 1, тогда как сигнал связывания с FIX Padua составлял почти 200. Во втором наборе скрининговых анализов сигнал связывания с FIX дикого типа составлял 1 или менее для каждого из BC1, BC2 и BC3, тогда как сигналы связывания для BC1, BC2 и BC3 с FIX Padua составляли соответственно 70, 30 и 10. У BC4 наблюдали сигнал связывания с FIX Padua более 36, тогда как сигнал связывания с FIX дикого типа составлял приблизительно 1.

Связывание BC1 с FIX Padua тестировали с помощью ИФА на Ni^{2+} планшетах, в которых варьировали концентрации покрытия BC1, а также концентрации FIX Padua. Тестируемыми концентрациями BC1 и FIX Padua были 0,04 мкг/мл, 0,2 мкг/мл, 1 мкг/мл и 5 мкг/мл. Сигналы связывания BC1 с FIX Padua сравнивали с контролем FIX WT. В каждой протестированной концентрации связывание FIX Padua с BC1 превышало связывание FIX WT с BC1 (фиг. 2).

Связывание BC1, BC2 и BC3 с FIX Padua в присутствии FIX дикого типа тестировали с помощью ИФА (как показано на фиг. 10). На планшеты MaxiSorp наносили покрытие 5 мкг/мл BC1, BC2 или BC3 и в планшеты с покрытием вносили растворы, содержащие FIX Padua в различных концентрациях и 5 мкг/мл FIX дикого типа. Тестируемыми концентрациями FIX Padua были 0 мкг/мл, 0,156 мкг/мл, 0,313 мкг/мл, 0,625 мкг/мл, 1,25 мкг/мл, 2,5 мкг/мл, 5 мкг/мл и 10 мкг/мл. Как показано на фиг. 3, у BC1 наблюдали сильную аффинность к FIX Padua, даже в присутствии фактора IX WT. У BC1 наблюдали наиболее высокую аффинность в присутствии 5 мкг/мл фактора IX WT.

Связывание BC1 с различными концентрациями FIX Padua в присутствии 5% плазмы крови человека и 5 мкг/мл фактора IX WT тестировали с помощью ИФА (как показано на фиг. 10). Как показано на фиг. 4, связывание BC1 с FIX Padua увеличивалось по мере увеличения концентрации FIX Padua, даже в присутствии фактора IX WT и других белков плазмы крови. FIX Padua варьировал от 25 нг/мл до 1000 нг/мл.

Связывание BC1 с FIX Padua в растворах с варьирующим % плазмы крови, содержащих 50 мМ бензамидина, тестировали с помощью ИФА (как показано на фиг. 10). Растворы содержали 5%, 10% или 20% (об./об.) плазмы крови. Как показано на фиг. 5, с помощью BC1 можно детектировать FIX Padua в диапазоне от 3,13 нг/мл до 200 нг/мл в 20% растворе плазмы крови.

Связывание BC1, BC2 и BC4 с FIX Padua в присутствии 20% плазмы крови человека, содержащей 5 мкг/мл фактора IX WT, тестировали с помощью ИФА. Применяемые в этом анализе концентрации FIX Padua были следующими: 0, 3,13, 6,25, 12,5, 25, 50, 100 и 200 нг/мл. Как показано на фиг. 6, BC1 обладал наиболее высокой чувствительностью, в то время как BC2 обладал наиболее низкой чувствительностью и не связывался с FIX Padua в образце 20% плазмы крови человека, содержащем 5 мкг/мл фактора IX WT. У BC4 наблюдали более низкую способность связывания с FIX Padua, чем у BC1 (фиг. 6). Как и BC2, BC3 не выполняло функцию специфического к FIX Padua детектирующего антитела в образце, содержащем 20% плазмы крови человека (данные не показаны).

Связывание BC1 и BC4 с другими факторами свертывания тестировали с помощью ИФА. В частности, тестировали связывание BC1 или BC4 с фактором II и фактором X. Как показано на фиг. 7, связывание BC1 было высокоспецифическим к FIX Padua, без

проявлений перекрестной реактивности по отношению к фактору II или фактору X, тогда как у BC4, напротив, наблюдали небольшую перекрестную реактивность по отношению к фактору II.

Связывание BC1 было специфическим к FIX Padua. В отличие от этого, две другие связывающиеся конструкции (BC5 и BC6) были получены посредством фагового дисплея с применением структурного пептида. Как показано на фиг. 8, связывание BC5 и BC6 не было специфическим к FIX Padua, поскольку наблюдали существенное связывание с FIX WT.

Значение KD для BC1 определяли с помощью поверхностного плазмонного резонанса Biacore. KD для BC1 составляла 56 нМ. У BC1 наблюдали наиболее высокую аффинность к FIX Padua по сравнению с остальными кандидатами. Это значение было схожим, если не лучше, со значением KD (М) у коммерческих антител. Например, значение KD (М) у коммерчески доступного овечьего антитела к человеческому FIX дикого типа составляло $3,11 \times 10^{-9}$.

Последовательности CDR тяжелой и легкой цепей BC1 определяли с помощью ПЦР с последующим трансляцией последовательности, а сами последовательности были следующими:

CDR1 тяжелой цепи	SSYAIS	SEQ ID NO: 6
CDR2 тяжелой цепи	GIVPAFGTANYAQKFQG	SEQ ID NO: 7
CDR3 тяжелой цепи	SWGVISFAY	SEQ ID NO: 8
CDR1 легкой цепи	RASQDISSYLN	SEQ ID NO: 9
CDR2 легкой цепи	AASNLSQS	SEQ ID NO: 10
CDR3 легкой цепи	MQYDSLPTTF	SEQ ID NO: 11

BC1, полученный с помощью линейного пептида, обеспечивал характерное и специфическое связывание FIX Padua, и эта активность была подтверждена. BC1 характеризовался пределом детекции ~3 нг/мл плазмы крови и не проявлял перекрестной реактивности к FIX дикого типа даже при очень высоких (>5 мкг/мл) концентрациях.

Эти данные подтверждали, что было получено высокоспецифическое антитело к FIX Padua. Это антитело связывалось с FIX Padua, но не связывалось ни с одним из фактора IX WT, фактора II и фактора X в образцах плазмы крови человека. Эти данные подтверждали, что это антитело можно применять, например, для разработки клинических анализов для селективного распознавания уровней антигенов FIX дикого типа FIX и FIX Padua.

Пример 2

В этом примере продемонстрирован способ применения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению.

Fab-фрагмент недавно разработанного антитела (BC1), специфически связывающегося с фактором IX Padua (FIXr), наносили покрытием в 96-луночные микропланшеты в количестве 2 мкг/мл с использованием стандартных условий. В качестве системы детекции применяли коммерчески доступный биотинилированный поликлональный овечий IgG к FIX человека и стрептавидин-пероксидазу. Схема компонентов анализа показана на фиг. 9.

Калибровку анализа производили путем создания шеститочечной калибровочной кривой с препаратом FIXr, охватывающим диапазон концентраций FIXr от 27,1 до 0,85 нг/мл. Образцы от пациентов разводили HEPES/NaCl буфером, содержащим 5 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 10 мМ бензамида, 10 мМ CaCl₂ и 0,05% твина 20.

В случае нормальной плазма крови человека или очищенного FIX человека не наблюдали сигналов в FIX-специфическом ИФА. Получали точные калибровочные кривые. В случае FIX, введенного в 1/10-разведенную нормальную плазму крови человека, наблюдали приемлемые получаемые значения с кривыми разведение/ответ, которые были параллельны полученным в случае аналитического стандарта в буфере. Важно отметить, что в результате анализа образцов от шести пациентов, обработанных вектором экспрессии, кодирующим FIX, получали весьма схожие кривые активности белка FIX и FIX с течением времени, а в случае образцов от пациентов, положительных по материалу, который был перекрестно-реактивным (CRM+), не наблюдали повышенных сигналов для белка FIX по сравнению с CRM- пациентами, что свидетельствовало о специфичности анализа.

FIX-специфический ИФА позволяет производить дополнительное отслеживание результата лечения путем измерения белка FIX.

Пример 3

В этом примере продемонстрирован селективный ИФА на FIX Padua и продемонстрировано применение такого ИФА для тестирования образца плазмы крови человека.

Препарат BC1 (0,94 мг/мл) разводили 1/500 посредством 0,1 М $\text{NaHCO}_3\text{-Na}_2\text{CO}_3$, pH 9,5, и иммобилизовали в лунках планшета Maxisorp F96 путем инкубации в количестве 100 мкл/лунка при температуре от 0 до +10°C в течение ночи. Буфер для разведения (DB), который использовали для разведения образцов и реагентов, а также для блокировки планшетов, представлял собой 0,1 М HEPES, 0,1 М NaCl, pH 7,2, содержащий 5 мг/мл не содержащего биотин бычьего сывороточного альбумина (BSA), 10 mM Ca^{2+} , 0,05% твина 20 (Bio-Rad, со степенью чистоты, пригодной для ферментативного иммуноанализа) и 10 mM бензамидина. После нанесения покрытия планшет промывали фосфатно-солевым буферным раствором, содержащим 0,05% твина 20, и блокировали лунки путем инкубации с 200 мкл DB/лунка при комнатной температуре (RT, 18-26°C) в течение 60 минут. Стадию блокировки прекращали посредством промывания. Затем вносили различные разведения стандарта/образцов, готовя последовательные серии 1+1 разведений непосредственно на планшете. Разведения (100 мкл/лунка) инкубировали с планшетом при RT в течение 60 минут. Затем планшет снова промывали и добавляли биотинилированное поликлональное овечье детекторное антитело к человеческому FIX, полученное из F9-1030A (Cofact) (100 мкл/лунка, рабочее разведение 1/500). После инкубации при RT в течение 60 минут планшет снова промывали, добавляли стрептавидин-пероксидазу (DakoCytomation) (100 мкл/лунка, разведение 1/4000) и инкубировали при RT в течение 30 минут. После окончательной обширной процедуры промывки измеряли активность связанной пероксидазы с помощью готового к применению субстрата пероксидазы SureBlue, останавливая реакцию посредством 3 н. серной кислоты. Затем планшет измеряли на 450 нм с помощью ИФА-ридера, вычитая результаты, полученные на 620 нм.

На фиг. 11 показаны кривые зависимости концентрации от ответа, полученные для очищенного препарата FIX Padua человека и свежемороженого контрольного препарата плазмы крови (CRYOCheck; Precision Biologics) с концентрацией FIX WT 5 мкг/мл.

Кривая зависимости дозы от ответа, полученная для концентрации рекомбинантного FIX Padua человека, охватывающей диапазон от 29 до 0,91 нг/мл, соответствовала принятым требованиям, точности, погрешности и линейности, и поэтому ее считали подходящей для экстраполяции образцов. В частности, коэффициент корреляции кривой

логарифмической регрессии составлял 0,9985 при средней точности 101,4% и погрешности 7,0%. Точность и погрешность рассчитывали с помощью метода замещений сигналов, измеренных для шести концентраций калибровочной кривой. Дополнительно из этих данных видна абсолютная специфичность подхода для FIX Padua: эталонная плазма крови человека, содержащая FIX wt в нормальной концентрации в плазме 5 мкг/мл и измеренная с помощью минимального разведения 1/10, не давала никакого сигнала.

ИФА проводили так, как описано выше. Калибровочные кривые получали с использованием другого препарата рекомбинантного FIX Padua человека с концентрацией белка 542,42 мкг/мл. Специфическая свертывающая активность, составлявшая 2310 МЕ/мг белка, позволяла четко классифицировать этот препарат как гиперактивный вариант FIX Padua. Серия последовательных разведений варьировала от 1/20000 до 1/640000 и определяла диапазон концентраций FIX от 27,1 до 0,85 нг/мл. На фиг. 12 показана средняя калибровочная кривая, полученная в виде кривых линейной регрессии между логарифмами скорректированных по фону средних сигналов и концентрациями FIX для шести аналитических стандартов. На вставке видна согласованность полученных с помощью метода замещений аналитических калибраторов D1 - D6 с их соответствующими номинальными концентрациями. Калибровочные кривые для FIX Padua характеризовались хорошей линейностью в диапазоне концентраций от 27,1 до 0,85 нг/мл. Это было показано с помощью среднего коэффициента корреляции $r=0,9992$ (диапазон: 0,9986-0,9996) и подтверждено полученными с помощью метода замещений значениями концентраций, рассчитанными для отдельных точек калибровочной кривой, которые отличались менее чем на 9% (диапазон: от 91,1% до 108,6%) от ожидаемых значений по всему диапазону. Эти полученные методом замещений данные с легкостью удовлетворяли требованию, определяемому нормами ЕМА для валидации биоаналитического способа для выявления подходящих калибровочных кривых для анализов на связывание лиганда. Относительная общая погрешность (RTE) калибровочной кривой была низкой. В частности, RTE рассчитывали методом замещений средних значений оптической плотности (OD) с коррекцией по фону для стандартов калибровочной кривой. Полученные концентрации нормализовали путем умножения на их разведение. Теперь RTE рассчитывали как сумму абсолютной разницы между номинальной концентрацией аналитического стандарта и средней концентрацией, определяемой с помощью подхода с использованием метода замещений и двойного стандартного отклонения этой средней концентрации. Кроме того, низкий RSD углового коэффициента свидетельствовал, что эти кривые могут быть получены с воспроизводимостью, необходимой для анализа, который должен использоваться в клинических условиях.

ИФА проводили так, как описано выше. В нормальную свежемороженную плазму крови человека и в FIX-дефицитную плазму крови вносили FIX Padua. Серия разведений двух препаратов плазмы крови с внесенным фактором начиналась с разведения 1/10. На фиг. 13 показаны кривые зависимости разведения от ответа для двух образцов плазмы крови в сравнении с кривыми, полученными в буфере. Угловые коэффициенты кривых зависимости разведения от ответа, полученных для образцов плазмы крови с введенным FIX Padua, отличались менее чем на 5% от значений коэффициентов, полученных для серии разведений в буфере. Это свидетельствовало о том, что матрица плазмы крови не влияла на результаты анализа.

Традиционные поликлональные антитела к FIX человека также связываются с FIX яванского макака (данные на дату подачи) из-за высокой гомологии

последовательностей между FIX человека и FIX обезьяны. Поэтому селективность ИФА на FIX Padua проверяли также для матрицы цитратной плазмы крови обезьяны. В частности, в образец цитратной плазмы крови самки и самца обезьяны вводили FIX Padua и измеряли, начиная серию разведения с минимального разведения 1/10. На фиг. 14 показаны кривые зависимости разведения от ответа для двух образцов плазмы крови в сравнении с кривыми, полученными в буфере.

Угловые коэффициенты кривых зависимости разведения от ответа, полученных для образцов плазмы крови с введенным FIX Padua, отличались менее чем на 4% от значений коэффициентов, полученных для серии разведений в буфере. Это свидетельствовало о том, что матрица цитратной плазмы крови обезьян не влияла на результаты анализа. Кроме того, полученные в результате значения концентраций введенного FIX Padua составляли 91,3% и 103,1% для образцов плазмы крови соответственно самца и самки.

Проводили измерения FIX Padua в образцах цитратной плазмы крови от субъекта с материалом, который является перекрестно-реактивным с FIX (CRM+), в клиническом испытании 1-й/2-й фазы после обработки вирусным вектором AAV2/8, экспрессирующим FIX Padua. ИФА на FIX Padua проводили так, как описано выше, с применением образцов плазмы крови от субъекта. Измерения свертывающей активности FIX и уровня антигена FIX с применением образцов плазмы крови, полученных от субъекта, проводили с помощью стандартных способов. На фиг. 15 показаны результаты измерения активности FIX и уровня белка FIX, проведенные для образцов плазмы крови, полученных от субъекта из клинического испытания 1-й/2-й фазы, у которого постоянно наблюдали концентрацию антигена FIX, близкую к 1 ед./мл, но активность FIX была ниже нижнего предела количественной оценки. Эти данные позволяли квалифицировать субъекта, как демонстрирующего CRM+, т.е. неактивный в отношении свертывания белок FIX, измеряемый с помощью традиционного ИФА на FIX. Результаты ИФА на FIX Padua, полученные в нг/мл, преобразовывали в единицы активности и уровня антигена, используя, в случае преобразования активности, специфическую активность аналитического стандарта (2310 МЕ/мг), а в случае преобразования уровня антигена, - нормальную концентрацию FIX человека, равную 5 мкг/мл.

Данные по ИФА на FIX Padua были параллельными с данными по активности FIX, что свидетельствовало о том, что полученная в результате измерений активность FIX зависела от экспрессии FIX Padua. В отличие от этого, концентрации антигена FIX, измеренные с помощью специфического к FIX Padua ИФА, были явно ниже, чем концентрации, полученные с помощью стандартного ИФА, что свидетельствовало о том, что ИФА на FIX Padua позволял дифференцировать CRM+ материал от FIX Padua.

Проводили измерения FIX Padua в образцах цитратной плазмы крови от второго субъекта с материалом, который является перекрестно-реактивным с FIX (CRM+), в клиническом испытании 1-й/2-й фазы после обработки вирусным вектором AAV2/8, экспрессирующим FIX Padua. ИФА на FIX Padua проводили так, как описано выше, с применением образцов плазмы крови от второго субъекта. Измерения свертывающей активности FIX и уровня антигена FIX с применением образцов плазмы крови, полученных от второго субъекта, проводили с помощью стандартных способов. На фиг. 16 показаны результаты измерения активности FIX и уровня белка FIX, проведенные для образцов плазмы крови, полученных от второго субъекта, у которого постоянно наблюдали концентрацию антигена FIX, близкую к 0,8 ед./мл, но активность FIX была ниже нижнего предела количественной оценки. Эти данные позволяли квалифицировать субъекта, как демонстрирующего CRM+, т.е. неактивный в отношении свертывания белок FIX, измеряемый с помощью традиционного ИФА на FIX. Результаты ИФА на

FIX Padua, полученные в нг/мл, преобразовывали в единицы активности и уровня антигена, используя, в случае преобразования активности, специфическую активность аналитического стандарта (2310 МЕ/мг), а в случае преобразования уровня антигена, - нормальную концентрацию FIX человека, равную 5 мкг/мл.

5 Данные по ИФА на FIX Padua были параллельными с данными по активности FIX, что свидетельствовало о том, что полученная в результате измерений активность FIX зависела от экспрессии FIX Padua. В отличие от этого, концентрации антигена FIX, измеренные с помощью специфического к FIX Padua ИФА, были явно ниже, чем концентрации, полученные с помощью стандартного ИФА, что свидетельствовало о том, что ИФА на FIX Padua позволял дифференцировать CRM+ материал от FIX Padua.

Проводили измерения FIX Padua в образцах цитратной плазмы крови от субъекта без FIX CRM+ в клиническом испытании 1-й/2-й фазы после обработки вирусным вектором AAV2/8, экспрессирующим FIX Padua. ИФА на FIX Padua проводили так, как описано выше, с применением образцов плазмы крови от субъекта без FIX CRM+.

15 Измерения свертывающей активности FIX и уровня антигена FIX с применением образцов плазмы крови от субъекта без FIX CRM+ проводили с помощью стандартных способов. На фиг. 17 показаны результаты измерения активности FIX и уровня белка FIX, проведенного для образцов плазмы крови, полученных от субъекта, у которого устойчиво не наблюдался CRM+. Результаты ИФА на FIX Padua, полученные в нг/мл, преобразовывали в единицы активности и уровня антигена, используя, в случае преобразования активности, специфическую активность аналитического стандарта (2310 МЕ/мг), а в случае преобразования уровня антигена, - нормальную концентрацию FIX человека, равную 5 мкг/мл. Данные по ИФА на FIX Padua были параллельными с данными по активности FIX и уровню белка FIX, что свидетельствовало о том, что полученная в результате измерений активность FIX зависела от экспрессии FIX Padua.

Пример 4

Также был разработан анализ хромогенной активности FIX с применением BC1. FIX Padua подвергали селективной очистке из матрицы образца путем связывания с BC1, который был связан с планшетом. Несвязанные компоненты образца, включая 30 человеческий FIX дикого типа, удаляли путем интенсивной промывки перед проведением на лунках микропланшета теста на хромогенный фактор IX 221806 (Hyphen Biomed). Образцы разводили буфером для разведения, который описан выше. На фиг. 18 показана кривая зависимости дозы от ответа, полученная для FIX Padua и нормального эталонного препарата плазмы крови.

35 У FIX Padua наблюдали линейную кривую зависимости концентрации от ответа, в то время как в случае нормальной концентрации эталонной плазмы крови с концентрацией FIX приблизительно 1 ед./мл не наблюдали какого-либо поддающегося измерению сигнала. Эти данные свидетельствовали о возможности реализации подхода, описывающего анализ специфической активности FIX Padua, и в то же время подтверждали его специфичность.

Пример 5

Далее описано выделение антител, которые способны дифференцировать FIX дикого типа и вариант FIX Padua.

45 FIX Padua представляет собой естественный гиперфункциональный вариант FIX дикого типа с единственной аминокислотной заменой (FIX R338L). Полезность FIX Padua для генной терапии гемофилии В была показана на доклинических моделях и в настоящее время изучается в клинических программах 1-й/2-й фазы. Оценка успеха терапии в значительной степени зависит от определения экспрессии трансгена FIX

Padua, которая, тем не менее, затруднена из-за отсутствия антитела, которое способно различать FIX дикого типа и FIX Padua. Антитела, которые специфически распознают FIX Padua без перекрестной реактивности к FIX дикого типа, позволяют разрабатывать анализы, которые однозначно детектируют FIX Padua в клинических образцах. Для отбора специфической, связывающейся с FIX Padua молекулы применяли способ фагового дисплея. Фаговую библиотеку подвергали скринингу с помощью линейного и структурного пептида, который включал в себе единственную аминокислотную замену в положении 338, а также полноразмерного рекомбинантного FIX Padua. Три раунда пэннинга, с конкуренцией и без нее, с последовательностями FIX дикого типа, приводили к выявлению нескольких связывающихся молекул. Для определения специфичности и аффинности полученных антител проводили эксперименты BIACORE (поверхностного плазмонного резонанса) и ИФА. В результате различных путей пэннинга фаговой библиотеки первоначально выявляли различные антитела. У антитела, полученного по пути линейного пептида, наблюдали характерное и специфическое связывание FIX Padua. Выбранное антитело характеризовалось пределом детекции ~3 нг/мл плазмы и не имело перекрестной реактивности к FIX дикого типа даже при очень высоких (>50 мкг/мл) концентрациях. Высокоспецифическое антитело к FIX Padua можно применять для разработки клинических анализов для селективного распознавания уровней антигенов FIX дикого типа и FIX Padua.

Введение:

FIX Padua представляет собой естественный гиперфункциональный вариант FIX дикого типа (wt) с единственной аминокислотной заменой (FIX R338L). Это внесение функциональной мутации приводит к 8-10-кратному увеличению специфической свертывающей активности по сравнению с нормальным FIX. In vitro, рекомбинантный FIX-R338L характеризовался в 5-10 раз более высокой специфической свертывающей активностью относительно активности у рекомбинантного FIX дикого типа [1]. Полезность FIX Padua для генной терапии гемофилии В была показана на доклинических моделях и в настоящее время изучается в клинических испытаниях 1-й/2-й фазы. Оценка успеха терапии в значительной степени зависит от определения экспрессии трансгена FIX Padua, которое, тем не менее, затруднено из-за отсутствия антитела, которое способно различать FIX wt и FIX Padua.

Целью настоящего исследования было получение антител, которые специфически связывают FIX Padua без перекрестной реактивности с FIX дикого типа, обеспечивая возможность детекции FIX Padua в присутствии FIX wt в клинических образцах.

Далее описаны способы, осуществляемые в ходе настоящего исследования.

Получение специфических к FIX Padua антител: Антитела (бивалентные Fab) получали с помощью технологии фагового дисплея, основанной на библиотеке HuCAL PLATINUM® и технологии CysDisplay®. Для выделения антител, которые специфичны к FIX Padua, применяли четыре различных подхода (фиг. 19). Два из них реализовывали с пептидами, которые включали единственную аминокислотную замену в положении 338, либо в твердофазном, либо в жидкофазном (на микроносителях) анализе. Третья и четвертая стратегия предусматривали использование полноразмерного активного белка FIX Padua. Для каждой стратегии проводили три раунда пэннинга, включающие надлежащие отрицательные контроли (пептиды wt или FIX wt). Получали молекулы Fab уникальных положительных клонов и тестировали их в отношении специфического связывания с антигенами FIX Padua. В случае ИФА антигены [5 мкг/мл] наносили покрытием и инкубировали с Fab-фрагментами [2 мкг/мл] с последующей детекцией с помощью конъюгата AP и антитела к Fab.

Плазменный ИФА: молекулы Fab наносили покрытием на планшеты для ИФА MaxiSorp [5 мкг/мл] и инкубировали с 20% плазмой крови человека, разведенной в PBS-буфере плюс 50 мМ бензамидина. В плазму вносили 5 мкг/мл rFIX wt и возрастающие концентрации rFIX Padua (полученном в своей лаборатории в HEK293). Детекцию производили с применением HRP-меченого поликлонального антитела козы к FIX (100 нг/мл).

BiaCore: все эксперименты проводили при 25°C с применением устройства Biacore™ 200 и биосенсорных чипов с никелевым покрытием (NTA-Chip GE Healthcare). Устройство сначала трижды подвергали начальной обработке подвижным буфером HBS-EP, а проточную ячейку 1 (FC1) использовали в качестве эталонной проточной ячейки, которая не была модифицирована и не содержала лиганда Fab. Проточную ячейку 2 (FC2) применяли для иммобилизации ~500 RU FIX Padua-специфического Ab42. Концентрации лигандов варьировали от 100 до 6,25 нМ.

Результаты этого исследования описаны ниже.

Из результатов структурного анализа свиного FIX wt выявляли, что единственная модификация Padua (R338L) расположена на поверхности белка [2] (фиг. 21) и поэтому является подходящим эпитопом для получения высокоспецифических антител. Очищенные бивалентные Fab тестировали в отношении антигенной специфичности (фиг. 22) и перекрестной реакционной способности к FIX wt в 20% плазме крови человека с помощью ИФА (фиг. 23). В матрице 20% плазмы, содержащей 5 мкг/мл введенного FIX wt, только два (Ab42 и Ab76) из четырех выделенных бивалентных Fab специфически связывались с FIX Padua. Лишь у Ab42 не наблюдали никакой перекрестной реактивности в отношении человеческого FII и человеческого FX (данные не показаны).

Исходя из этих данных, был сделан вывод, что с помощью технологии фагового дисплея было получено высокоспецифическое миниантитело Ab42 к Fix Padua. У выбранного кандидата не наблюдали перекрестной реактивности с FIX дикого типа или другими распространенными белковыми факторами крови, такими как FII или FX. Эффективное связывание с FIX Padua было показано в матрице плазмы крови человека (20%) и в присутствии обычной концентрации FIX wt. Миниантитело Ab42 в настоящее время применяют для анализа FIX Padua в плазме крови от пациентов, которые были подвергнуты лечению в ходе клинического испытания 1-й/2-й фазы (см. ниже).

В описанном выше исследовании даны ссылки на следующие источники: (1) Simioni et al., X-Linked Thrombophilia with a Mutant Factor IX (Factor IX Padua) *N Engl J Med* 2009; 361: 1671-5; и (2) Brandstetter et al., X-ray structure of dotting factor IXa: active site and module structure related to Xase activity and hemophilia B. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Oct 10; 92 (21): 9796-800

Ниже описаны разработка и применение FIX Padua-специфического иммуноанализа для отслеживания генной терапии гемофилии В.

Генная терапия остается весьма перспективным направлением в качестве будущего варианта лечения гемофилии. В одном клиническом испытании 1-й/2-й фазы применяли вирусные векторы AAV2/8 для экспрессии FIX Padua (FIXp), гиперфункционального варианта FIX с единственной аминокислотной заменой (R338L), у субъектов с тяжелой гемофилией В. Специфическая детекция трансгенного продукта является ключевой для оценки успеха такой терапии, но затруднительна для пациентов с материалом, который является перекрестно-реактивным с FIX (CRM+). Разработка FIXp-специфического ИФА и применение такого анализа для измерения экспрессированного FIXp в плазме пациентов с гемофилией В после лечения вирусным вектором AAV2/8, экспрессирующим FIX Padua. Fab-фрагмент недавно разработанного антитела, специфически

связывающегося с FIXp, наносили покрытием в 96-луночные микропланшеты в количестве 2 мкг/мл с использованием стандартных условий. В качестве системы детекции применяли биотинилированный поликлональный овечий IgG к FIX человека и стрептавидин-пероксидазу. Калибровку анализа производили путем создания

5 шеститочечной калибровочной кривой с препаратом FIXp, охватывающим диапазон концентраций FIXp от 27,1 до 0,85 нг/мл. Образцы от пациентов разводили HEPES/NaCl буфером, содержащим 5 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 10 mM бензамидина, 10 mM CaCl₂ и 0,05% твина 20. В случае нормальной плазма крови человека или очищенного FIX человека не наблюдали сигналов в FIXp-специфическом ИФА.

10 Получали точные калибровочные кривые. В случае FIXp, введенного в 1/10-разведенную нормальную плазму крови человека, наблюдали приемлемые получаемые значения с кривыми разведение/ответ, которые были параллельны полученным в случае аналитического стандарта в буфере. Важно отметить, что анализ образцов от шести пациентов, обработанных AAV, кодирующим FIXp, демонстрировал весьма схожие

15 кривые активности белка FIXp и FIX с течением времени, а в случае образцов от CRM+ пациентов не наблюдали повышенных сигналов для белка FIXp по сравнению с CRM-пациентами, что свидетельствовало о специфичности анализа. FIXp-специфический ИФА позволяет производить дополнительное отслеживание результата лечения путем измерения белка FIXp. Это первые данные, демонстрирующие осуществимость такого

20 подхода.

Введение:

Генная терапия остается весьма перспективным направлением в качестве будущего варианта лечения гемофилии [1]. В клиническом испытании 1-й/2-й фазы применяли вирусные векторы AAV2/8 для экспрессии FIX Padua (FIXp) [2], гиперфункционального

25 варианта FIX с единственной аминокислотной заменой (R338L), у субъектов с тяжелой гемофилией В. Специфическая детекция трансгенного продукта является важнейшей для оценки успеха такой терапии, но затруднительна для пациентов с материалом, который является перекрестно-реактивным с FIX (CRM+).

На фиг. 25 показан принцип способа (анализа), описанного в этом исследовании.

30 Fab к FIX Padua наносили покрытием в лунки микропланшета, и он селективно захватывал FIX Padua из образца. После стадии промывки, удаления несвязанных образцов, связанный FIX Padua детектировали с применением собственного биотинилированного поликлонального овечьего IgG к FIX и стрептавидин-пероксидазы. Активность связанной HRP измеряли с использованием готового к применению

35 субстрата HRP SureBlue.

Далее описаны способы, осуществляемые в ходе настоящего исследования.

Процедура ИФА: Fab-препарат Ab42 (0,94 мг/мл) разводили 1/500 посредством 0,1 M NaHCO₃-Na₂CO₃, pH 9,5, и иммобилизовали в лунках планшета Maxisorp F96 путем

40 инкубации в количестве 100°мкл/лунка при температуре от 0 до +10°C в течение ночи. Буфер для разведения (DB), который использовали для разведения образцов и реагентов и для блокировки планшетов, содержал 0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, pH 7,2, 5 мг/мл не содержащего биотин бычьего сывороточного альбумина (BSA), 10°мМ Ca²⁺, 0,05% твина 20 (Bio-Rad, со степенью чистоты, пригодной для ферментативного иммуноанализа)

45 и 10 mM бензамидина. После нанесения покрытия планшет промывали фосфатно-солевым буферным раствором, содержащим 0,05% твина 20. Затем лунки блокировали путем инкубации с 200 мкл DB/лунка при комнатной температуре (RT) в течение 60 мин. Стадию блокирования прекращали промыванием. Затем вносили различные

разведения стандарта/образцов, готовя последовательные серии 1+1 разведений непосредственно на планшете. Разведения (100 мкл/лунка) инкубировали при RT в течение 60 минут. Планшет снова промывали и добавляли биотинилированное поликлональное овечье детекторное антитело к человеческому FIX, полученное из F9-1030A (A-Coa) (100 мкл/лунка, 11500-кратное разведение). После инкубации при RT в течение 60 минут планшет снова промывали и добавляли стрептавидин-пероксидазу (DakoCytomation) (100 мкл/лунка, разведение 1/4000) и инкубировали при RT в течение 30 минут. После окончательной процедуры промывки измеряли активность связанной пероксидазы с помощью готового к применению субстрата пероксидазы SureBlue (KPL), останавливая реакцию посредством 3 н. серной кислоты. Затем планшет измеряли на 450 нм, вычитая результаты, полученные на 620 нм. Калибровочную кривую строили с помощью очищенного рекомбинантного препарата FIX Padua (FIXp), имеющего концентрацию белка 542,4 мкг/мл. Специфическая свертывающая активность, составлявшая 2°310 МЕ/мг белка, позволяла четко классифицировать этот препарат как гиперактивный вариант FIX Padua. Серия последовательных разведений варьировала от 1/20000 до 1/640000 и определяла диапазон концентраций FIX от 27,1 до 0,85 нг/мл.

Результаты этого исследования описаны ниже и на фигурах. Измерения свертывающей активности FIX и уровня антигена FIX проводили с применением общеизвестных стандартных способов; образцы цитратной плазмы также подвергали специфическому измерению уровня белка FIX Padua с помощью ИФА. Результаты ИФА на FIX Padua, полученные в нг/мл, преобразовывали в единицы активности и уровня антигена. В частности, для расчета единиц активности использовали удельную активность рекомбинантного очищенного препарата FIX Padua, составлявшую 2310 МЕ FIX/мг, применяемого в качестве аналитического стандарта для ИФА на FIXp, тогда как преобразование в единицы уровня антигена в плазме было основано на нормальной концентрации FIX в плазме, составляющей 5 мкг/мл. На фиг. 26-29 продемонстрирована соответственно селективность анализа, калибровочные кривые, исследование параллелизма в нормальной и FIX-дефицитной плазме крови и влияние кальция на чувствительность ИФА

Образцы плазмы крови получали от пациентов, которые получали лечение вирусным вектором AAV2/8. На фиг. 30-32 продемонстрирована активность и экспрессия FIX Padua в образцах, полученных от трех пациентов. В образцах плазмы крови, полученных от субъекта 05-001, последовательно наблюдали концентрацию антигена FIX, близкую к 1 Ед/мл, но активность FIX была ниже нижнего предела количественной оценки. Эти данные позволяли выявить наличие материала, который является перекрестно-реактивным с FIX (CRM+), т.е. неактивного в отношении свертывания белка FIX, измеряемого с помощью традиционного ИФА на FIX. Данные по ИФА на FIXp были параллельными с данными по активности FIX, что указывало на то, что полученная в результате измерений активность FIX зависела от экспрессии FIX Padua. В отличие от этого, концентрации антигена FIX, измеренные с помощью специфического к FIX Padua ИФА, были явно ниже, чем концентрации, полученные с помощью стандартного ИФА, что свидетельствовало о том, что ИФА на FIX Padua позволял дифференцировать CRM+ материал от FIX Padua. Аналогичные данные, хотя и с более низкими уровнями CRM+, были обнаружены для образцов от субъекта 10-005, тогда как образцы от субъекта 03-004 не содержали CRM+, что давало в результате параллельные кривые зависимости времени и концентрации для обеих ИФА-систем.

Из этих данных был сделан вывод о том, что FIX Padua-специфический ИФА, основанный на применении высокоспецифического Fab-фрагмента для захвата FIXp,

позволял дополнительно отслеживать результаты лечения путем измерения FIXp. Это первые данные, демонстрирующие осуществимость такого подхода.

В описанном выше исследовании даны ссылки на следующие источники: [1] Simioni P, et al (2009): NEJM 361, 1671-1675. X-Linked thrombophilia with a Mutant Factor IX (Factor IX Padua); [2] Crudele JM, et al (2015). Blood 125:1553-1561. AAV liver expression of FIX-Padua prevents and eradicates FIX inhibitor without increasing thrombogenicity in hemophilia B dogs and mice.

Варианты осуществления настоящего описания также можно описать следующим образом:

1. Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывает фактор IX Padua, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и не связывается с фактором IX дикого типа (WT), содержащим аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 2).

2. Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по варианту осуществления 1, которое связывает эпитоп SEQ ID NO: 1, причем эпитоп представляет собой линейный эпитоп в пределах аминокислотной последовательности DRATCLLSTKFT (SEQ ID NO: 3).

3. Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по варианту осуществления 1, которое связывается с эпитопом SEQ ID NO: 1, причем эпитоп представляет собой конформационный эпитоп сложной структуры аминокислотной последовательности LVD RATC LLSTKFTIYNNMFCAGFH (SEQ ID NO: 5).

4. Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по варианту осуществления 1 или 3, причем сложная структура содержит дисульфидный мостик.

5. Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по любому одному предыдущих вариантов осуществления, которое не связывается с аминокислотной последовательностью DRATCLRSTKFT (SEQ ID NO: 14) или LVD RATCLRSTKFTIYNNMFCAGFH (SEQ ID NO: 15).

6. Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по любому из предыдущих вариантов осуществления, причем антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, связывается с фактором IX Padua с K_D , составляющей приблизительно 100 нМ или менее.

7. Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по любому из предыдущих вариантов осуществления, причем антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, связывается с фактором IX Padua с K_D в пределах диапазона, составляющего от приблизительно 25 нМ до приблизительно 75 нМ.

8. Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по любому из предыдущих вариантов осуществления, причем антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, связывается с фактором IX Padua с K_D в пределах диапазона, составляющего от приблизительно 50 нМ до приблизительно 60 нМ.

9. Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по любому из предыдущих вариантов осуществления, причем антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, связывается с фактором IX Padua с K_D в пределах диапазона, составляющего от приблизительно 20 нМ до приблизительно 100 нМ, от приблизительно 25 нМ до приблизительно 95 нМ, от приблизительно 30 нМ до приблизительно 90 нМ, от приблизительно 35 нМ до приблизительно 85 нМ, от приблизительно 40 нМ до приблизительно 80 нМ, от приблизительно 45 нМ до приблизительно 75 нМ, от приблизительно 50 нМ до приблизительно 70 нМ или от приблизительно 55 нМ до

приблизительно 65 нМ.

10. Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по любому из предыдущих вариантов осуществления, причем антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, связывается с фактором IX Padua и не связывается с фактором IX WT в образце, содержащем плазму крови человека, необязательно при этом образец содержит по меньшей мере или приблизительно 5%, по меньшей мере или приблизительно 10% или по меньшей мере или приблизительно 20% плазмы крови человека, а также образец содержит по меньшей мере или приблизительно 5 мкг/мл фактора IX WT.

11. Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по любому из предыдущих вариантов осуществления, причем антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, не связывается с полипептидом фактора II или полипептидом фактора X.

12. Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по любому из предыдущих вариантов осуществления, причем антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, не связывается ни с фактором II, ни с фактором X.

13. Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по любому из предыдущих вариантов осуществления, которое представляет собой Fab- или Fab2'-фрагмент антитела.

14. Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по любому из предыдущих вариантов осуществления, которое является моноспецифическим.

15. Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по любому из предыдущих вариантов осуществления, которое является полностью человеческим.

16. Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по любому из предыдущих вариантов осуществления, которое является бивалентным.

17. Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по любому из предыдущих вариантов осуществления, которое является бивалентным, но моноспецифическим в отношении FIX Padua.

18. Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по любому из предыдущих вариантов осуществления, содержащее димеризированные Fab-фрагменты или димеризированное Fab-миниантитело.

19. Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по любому из предыдущих вариантов осуществления, которое является димеризированным посредством линкера Fab-фрагментом.

20. Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по любому из предыдущих вариантов осуществления, содержащее (i) аминокислотные последовательности: SSYAIS (SEQ ID NO: 6); GIVPAFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO: 7); SWGVISFAY (SEQ ID NO: 8); RASQDISSYLN (SEQ ID NO: 9); AASNLSQ (SEQ ID NO: 10); и MQYDSLPTF (SEQ ID NO: 11), или (ii) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, или SEQ ID NO: 25, или SEQ ID NO: 24 и 25, или (iii) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, или SEQ ID NO: 27, или SEQ ID NO: 26 и 27.

21. Полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, в каждой из которой содержится SEQ ID NO: 6-11, необязательно причем (i) между каждой из SEQ ID NO: 6-11 присутствует одна или несколько аминокислот, и/или (ii) полипептид необязательно дополнительно содержит метку FLAG, содержащую DYKDDDDK (SEQ ID NO: 12), и/или гекса-His метку, содержащую HHHHHH (SEQ ID NO: 13).

22. Полипептид по варианту осуществления 21, причем метка FLAG и/или гекса-His метка расположена на С-конце полипептида.

23. Конъюгат, содержащий антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент или полипептид по любому из предыдущих вариантов осуществления, конъюгированное

с гетерологичным фрагментом.

24. Конъюгат по варианту осуществления 23, причем гетерологичный фрагмент можно выбрать из группы, состоящей из полимера, углевода, липида, нуклеиновой кислоты, олигонуклеотида, аминокислоты, пептида, полипептида, белка и индикаторного средства.

25. Конъюгат по варианту осуществления 23 или 24, причем антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент или полипептид, конъюгировано с агарозой, целлюлозой, декстраном, полиакриламидом, латексом или стеклом с контролируемым размером пор.

26. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 23-25, причем антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент или полипептид, конъюгировано с флуорофором, хромофором, радиоизотопом, ферментативной меткой или биотином.

27. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 23-26, содержащий гомодимер полипептида по варианту осуществления 19.

28. Конъюгат по варианту осуществления 27, причем полипептиды димера связаны при помощи структуры «спираль-петля-спираль».

29. Нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, полипептид, конъюгат или фрагмент по любому из предыдущих вариантов осуществления.

30. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 29.

31. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 29 или вектор по варианту осуществления 30.

32. Набор, содержащий антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по любому из вариантов осуществления 1-20, полипептид по варианту осуществления 21-22, конъюгат по любому из вариантов осуществления 23-28, нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 29, вектор по варианту осуществления 30 и/или клетку-хозяина по варианту осуществления 31.

33. Набор по варианту осуществления 32, дополнительно содержащий вторичное антитело, которое связывается с антителом, антигенсвязывающим фрагментом, полипептидом или конъюгатом.

34. Набор по варианту осуществления 32 или 33, дополнительно содержащий твердую подложку.

35. Набор по любому из вариантов осуществления 32-34, причем антитело, антигенсвязывающий фрагмент, полипептид или конъюгат предварительно нанесены на твердую подложку.

36. Набор по варианту осуществления 34 или 35, причем твердая подложка представляет собой полимерный микроноситель, микротитровальный планшет, мембрану или фильтр.

37. Набор по варианту осуществления 35 или 36, содержащий твердую подложку, на которую предварительно нанесено покрытие раствора, содержащего приблизительно 100 нг или более, приблизительно 150 нг или более, приблизительно 200 нг или более, приблизительно 500 нг или более антигенсвязывающего фрагмента.

38. Набор по любому из вариантов осуществления 32-37, причем набор дополнительно содержит инструкции по применению.

39. Композиция, содержащая антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по любому из вариантов осуществления 1-20, смешиваемое с полученным от человека биологическим образцом, содержащим плазму крови человека или ее разведенную фракцию, и/или ткань человека или ее клетки, необязательно при этом композиция

содержит индикаторное средство.

40. Композиция, содержащая антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, по любому из вариантов осуществления 1-20, смешиваемое с полученным от человека биологическим образцом, содержащим белки плазмы крови человека, причем по меньшей мере один из белков плазмы крови человека выбран из группы, состоящей из фактора IX, варианта фактора IX, фактора II, варианта фактора II, фактора X и варианта фактора X.

41. Композиция по варианту осуществления 40, причем композиция содержит индикаторное средство.

42. Применение антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, по любому из вариантов осуществления 1-20, полипептида по варианту осуществления 21-22, конъюгата по любому из вариантов осуществления 23-28, нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 29, вектора по варианту осуществления 30, клетки-хозяина по варианту осуществления 31 и/или набора по любому из вариантов осуществления 32-38 для детекции фактора IX Padua в образце.

43. Способ детекции фактора IX Padua в полученном от субъекта образце, предусматривающий (i) приведение в контакт образца с антителом, или его антигенсвязывающим фрагментом, по любому из вариантов осуществления 1-20, полипептидом по варианту осуществления 21 или 22 или конъюгатом по любому из вариантов осуществления 23-28 для формирования комплекса, содержащего фактор IX Padua и антитело, антигенсвязывающий фрагмент, полипептид или конъюгат, и (ii) детекцию комплекса в образце.

44. Способ по варианту осуществления 43, предусматривающий, что антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент или полипептид, конъюгировано с индикаторным средством и/или твердой подложкой, или что конъюгат содержит индикаторное средство.

45. Способ по варианту осуществления 43 или 44, предусматривающий приведение в контакт образца со вторичным антителом, содержащим индикаторное средство, причем вторичное антитело связывается с антителом, или антигенсвязывающим фрагментом, или полипептидом, или конъюгатом.

46. Способ по любому из вариантов осуществления 43-45, предусматривающий, что детекция комплекса предусматривает детекцию сигнала от индикаторного средства.

47. Способ по варианту осуществления 46, предусматривающий, что сигнал представляет собой ферментативную активность, связывающую активность и/или хромогенную активность.

48. Способ по любому из вариантов осуществления 43-47, предусматривающий, что образец представляет собой образец крови, образец сыворотки или образец плазмы крови.

49. Способ по любому из вариантов осуществления 43-48, предусматривающий, что субъект был подвергнут лечению вектором, содержащим нуклеотидную последовательность, кодирующую фактор IX Padua.

50. Описанная в настоящем документе связывающаяся конструкция.

Все источники, включая публикации, заявки на выдачу патента и патенты, упомянутые в настоящем документе, включены, таким образом, посредством ссылки в той же степени, как если бы каждый источник был индивидуально и конкретно указан включенным по ссылке и был полностью изложен в настоящем документе.

Применение терминов в форме единственного числа в контексте описания настоящего раскрытия (особенно в контексте приведенной далее формулы изобретения) следует истолковывать как охватывающее как формы единственного числа, так и формы

множественного числа, если в настоящем документе не указано иное или это явно не противоречит контексту. Термины «охватывающий», «имеющий», «включающий» и «содержащий» следует истолковывать как открытые термины (т.е. означающие «включающий без ограничений»), если не указано иное.

5 Указание диапазонов значений в настоящем документе должно служить лишь в качестве сокращенного способа индивидуальной отсылки к каждому отдельному значению, подпадающему в такой диапазон, и каждой конечной точки, если в настоящем документе не указано иное, и каждое отдельное значение и конечная точка включены в настоящее описание, как если бы они были индивидуально указаны в настоящем
10 документе.

Все описанные в настоящем документе способы можно осуществлять в любом подходящем порядке, если в настоящем документе не указано иное или это явно не противоречит контексту. Использование всех без исключения примеров или иллюстративного выражения (например, «такие как»), которые представлены в
15 настоящем документе, предназначено лишь для лучшего освещения настоящего раскрытия и не является ограничением объема настоящего раскрытия, если не заявлено иное. Ни одно из выражений в настоящем описании не следует истолковывать как указание любого незаявленного элемента в качестве существенного для осуществления настоящего раскрытия на практике.

20 В настоящем документе описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего раскрытия, включая лучший способ, известный авторам настоящего изобретения, для осуществления настоящего раскрытия. Рядовым специалистам в настоящей области техники после прочтения вышеприведенного описания могут стать очевидны вариации таких предпочтительных вариантов осуществления. Авторы
25 настоящего изобретения ожидают, что специалисты в настоящей области техники будут при необходимости использовать такие вариации, и авторы настоящего изобретения предполагают, что настоящее раскрытие может быть реализовано на практике иначе, чем конкретно описано в настоящем документе. Соответственно, настоящее раскрытие включает в себя все модификации и эквиваленты предмета изобретения, указанного в
30 прилагаемой к нему формуле изобретения, которые разрешены действующим законодательством. Более того, любая комбинация вышеописанных элементов во всех возможных его вариациях охватывается настоящим раскрытием, если в настоящем документе не указано иное или это явно не противоречит контексту.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

35 <110> БАКСАЛТА ИНКОРПОРЕЙТЕД
БАКСАЛТА ГМБХ
<120> АНТИТЕЛЛА К ФАКТОРУ IX PADUA
<130> 31315/50573
<160> 28
40 <170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 461
<212> PRT
<213> Homo sapiens
45 <400> 1
Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr
1 5 10 15
Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu

RU 2 770 006 C2

		20		25		30										
	Asp	His	Glu	Asn	Ala	Asn	Lys	Ile	Leu	Asn	Arg	Pro	Lys	Arg	Tyr	Asn
		35		40		45										
5	Ser	Gly	Lys	Leu	Glu	Glu	Phe	Val	Gln	Gly	Asn	Leu	Glu	Arg	Glu	Cys
		50		55		60										
	Met	Glu	Glu	Lys	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Val	Phe	Glu	Asn
	65			70		75									80	
	Thr	Glu	Arg	Thr	Thr	Glu	Phe	Trp	Lys	Gln	Tyr	Val	Asp	Gly	Asp	Gln
				85		90								95		
10	Cys	Glu	Ser	Asn	Pro	Cys	Leu	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Asp	Ile
				100		105								110		
	Asn	Ser	Tyr	Glu	Cys	Trp	Cys	Pro	Phe	Gly	Phe	Glu	Gly	Lys	Asn	Cys
				115		120								125		
	Glu	Leu	Asp	Val	Thr	Cys	Asn	Ile	Lys	Asn	Gly	Arg	Cys	Glu	Gln	Phe
15		130		135		140										
	Cys	Lys	Asn	Ser	Ala	Asp	Asn	Lys	Val	Val	Cys	Ser	Cys	Thr	Glu	Gly
	145			150		155									160	
	Tyr	Arg	Leu	Ala	Glu	Asn	Gln	Lys	Ser	Cys	Glu	Pro	Ala	Val	Pro	Phe
				165		170								175		
20	Pro	Cys	Gly	Arg	Val	Ser	Val	Ser	Gln	Thr	Ser	Lys	Leu	Thr	Arg	Ala
				180		185								190		
	Glu	Thr	Val	Phe	Pro	Asp	Val	Asp	Tyr	Val	Asn	Ser	Thr	Glu	Ala	Glu
				195		200								205		
	Thr	Ile	Leu	Asp	Asn	Ile	Thr	Gln	Ser	Thr	Gln	Ser	Phe	Asn	Asp	Phe
25		210		215		220										
	Thr	Arg	Val	Val	Gly	Gly	Glu	Asp	Ala	Lys	Pro	Gly	Gln	Phe	Pro	Trp
	225			230		235									240	
	Gln	Val	Val	Leu	Asn	Gly	Lys	Val	Asp	Ala	Phe	Cys	Gly	Gly	Ser	Ile
				245		250								255		
30	Val	Asn	Glu	Lys	Trp	Ile	Val	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Val	Glu	Thr	Gly
				260		265								270		
	Val	Lys	Ile	Thr	Val	Val	Ala	Gly	Glu	His	Asn	Ile	Glu	Glu	Thr	Glu
				275		280								285		
	His	Thr	Glu	Gln	Lys	Arg	Asn	Val	Ile	Arg	Ile	Ile	Pro	His	His	Asn
35		290		295		300										
	Tyr	Asn	Ala	Ala	Ile	Asn	Lys	Tyr	Asn	His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Glu
	305			310		315									320	
	Leu	Asp	Glu	Pro	Leu	Val	Leu	Asn	Ser	Tyr	Val	Thr	Pro	Ile	Cys	Ile
				325		330								335		
40	Ala	Asp	Lys	Glu	Tyr	Thr	Asn	Ile	Phe	Leu	Lys	Phe	Gly	Ser	Gly	Tyr
				340		345								350		
	Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Arg	Val	Phe	His	Lys	Gly	Arg	Ser	Ala	Leu	Val
				355		360								365		
	Leu	Gln	Tyr	Leu	Arg	Val	Pro	Leu	Val	Asp	Arg	Ala	Thr	Cys	Leu	Arg
45		370		375		380										
	Ser	Thr	Lys	Phe	Thr	Ile	Tyr	Asn	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Phe	His
	385			390		395									400	
	Glu	Gly	Gly	Arg	Asp	Ser	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	His	Val

RU 2770 006 C2

				405					410				415			
	Thr	Glu	Val	Glu	Gly	Thr	Ser	Phe	Leu	Thr	Gly	Ile	Ile	Ser	Trp	Gly
				420					425					430		
	Glu	Glu	Cys	Ala	Met	Lys	Gly	Lys	Tyr	Gly	Ile	Tyr	Thr	Lys	Val	Ser
5			435				440					445				
	Arg	Tyr	Val	Asn	Trp	Ile	Lys	Glu	Lys	Thr	Lys	Leu	Thr			
		450				455					460					
	<210>	2														
	<211>	461														
10	<212>	PRT														
	<213>	Homo sapiens														
	<400>	2														
	Met	Gln	Arg	Val	Asn	Met	Ile	Met	Ala	Glu	Ser	Pro	Gly	Leu	Ile	Thr
	1			5					10				15			
15	Ile	Cys	Leu	Leu	Gly	Tyr	Leu	Leu	Ser	Ala	Glu	Cys	Thr	Val	Phe	Leu
			20				25						30			
	Asp	His	Glu	Asn	Ala	Asn	Lys	Ile	Leu	Asn	Arg	Pro	Lys	Arg	Tyr	Asn
		35				40						45				
	Ser	Gly	Lys	Leu	Glu	Glu	Phe	Val	Gln	Gly	Asn	Leu	Glu	Arg	Glu	Cys
20		50				55					60					
	Met	Glu	Glu	Lys	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Val	Phe	Glu	Asn
	65				70				75						80	
	Thr	Glu	Arg	Thr	Thr	Glu	Phe	Trp	Lys	Gln	Tyr	Val	Asp	Gly	Asp	Gln
			85			90						95				
25	Cys	Glu	Ser	Asn	Pro	Cys	Leu	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Asp	Ile
			100				105						110			
	Asn	Ser	Tyr	Glu	Cys	Trp	Cys	Pro	Phe	Gly	Phe	Glu	Gly	Lys	Asn	Cys
		115				120						125				
	Glu	Leu	Asp	Val	Thr	Cys	Asn	Ile	Lys	Asn	Gly	Arg	Cys	Glu	Gln	Phe
30		130				135					140					
	Cys	Lys	Asn	Ser	Ala	Asp	Asn	Lys	Val	Val	Cys	Ser	Cys	Thr	Glu	Gly
	145			150					155					160		
	Tyr	Arg	Leu	Ala	Glu	Asn	Gln	Lys	Ser	Cys	Glu	Pro	Ala	Val	Pro	Phe
			165			170						175				
35	Pro	Cys	Gly	Arg	Val	Ser	Val	Ser	Gln	Thr	Ser	Lys	Leu	Thr	Arg	Ala
		180				185							190			
	Glu	Thr	Val	Phe	Pro	Asp	Val	Asp	Tyr	Val	Asn	Ser	Thr	Glu	Ala	Glu
		195				200						205				
	Thr	Ile	Leu	Asp	Asn	Ile	Thr	Gln	Ser	Thr	Gln	Ser	Phe	Asn	Asp	Phe
40		210				215						220				
	Thr	Arg	Val	Val	Gly	Gly	Glu	Asp	Ala	Lys	Pro	Gly	Gln	Phe	Pro	Trp
	225			230					235					240		
	Gln	Val	Val	Leu	Asn	Gly	Lys	Val	Asp	Ala	Phe	Cys	Gly	Gly	Ser	Ile
			245			250						255				
45	Val	Asn	Glu	Lys	Trp	Ile	Val	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Val	Glu	Thr	Gly
		260				265						270				
	Val	Lys	Ile	Thr	Val	Val	Ala	Gly	Glu	His	Asn	Ile	Glu	Glu	Thr	Glu
		275				280						285				

RU 2 770 006 C2

His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His His Asn
 290 295 300
 Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu
 305 310 315 320
 5 Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile
 325 330 335
 Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr
 340 345 350
 Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val
 10 355 360 365
 Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Leu
 370 375 380
 Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His
 385 390 395 400
 15 Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val
 405 410 415
 Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly
 420 425 430
 Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser
 20 435 440 445
 Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
 450 455 460
 <210> 3
 <211> 12
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 Asp Arg Ala Thr Cys Leu Leu Ser Thr Lys Phe Thr
 1 5 10
 30 <210> 4
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 35 Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Leu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr
 1 5 10 15
 Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His Glu
 20 25
 <210> 5
 40 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Leu Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr
 45 1 5 10 15
 Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His
 20 25
 <210> 6

```

<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 6
5 Ser Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5
<210> 7
<211> 17
<212> PRT
10 <213> Homo sapiens
<400> 7
Gly Ile Val Pro Ala Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15
Gly
15 <210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 8
20 Ser Trp Gly Val Ile Ser Phe Ala Tyr
1 5
<210> 9
<211> 11
<212> PRT
25 <213> Homo sapiens
<400> 9
Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
1 5 10
<210> 10
30 <211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 10
Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser
35 1 5
<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
40 <400> 11
Met Gln Tyr Asp Ser Leu Pro Phe Thr Phe
1 5 10
<210> 12
<211> 8
45 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 12
Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

```

```

1          5
<210> 13
<211> 6
<212> PRT
5 <213> Homo sapiens
<400> 13
His His His His His His
1          5
<210> 14
10 <211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 14
Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr
15 1          5          10
<210> 15
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens
20 <400> 15
Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr
1          5          10          15
Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His
20          25
25 <210> 16
<211> 622
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<300>
30 <308> GenBank / AAH51332.1
<309> 2006-07-15
<313> (1)..(622)
<400> 16
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
35 1          5          10          15
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
20          25          30
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Ala Asn Thr Phe Leu
35          40          45
40 Glu Glu Val Arg Lys Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys Val Glu Glu Thr
50          55          60
Cys Ser Tyr Glu Glu Ala Phe Glu Ala Leu Glu Ser Ser Thr Ala Thr
65          70          75          80
Asp Val Phe Trp Ala Lys Tyr Thr Ala Cys Glu Thr Ala Arg Thr Pro
45 85          90          95
Arg Asp Lys Leu Ala Ala Cys Leu Glu Gly Asn Cys Ala Glu Gly Leu
100          105          110
Gly Thr Asn Tyr Arg Gly His Val Asn Ile Thr Arg Ser Gly Ile Glu

```

RU 2 770 006 C2

		115		120		125											
		Cys	Gln	Leu	Trp	Arg	Ser	Arg	Tyr	Pro	His	Lys	Pro	Glu	Ile	Asn	Ser
		130						135					140				
		Thr	Thr	His	Pro	Gly	Ala	Asp	Leu	Gln	Glu	Asn	Phe	Cys	Arg	Asn	Pro
5		145					150					155					160
		Asp	Ser	Ser	Thr	Thr	Gly	Pro	Trp	Cys	Tyr	Thr	Thr	Asp	Pro	Thr	Val
						165					170					175	
		Arg	Arg	Gln	Glu	Cys	Ser	Ile	Pro	Val	Cys	Gly	Gln	Asp	Gln	Val	Thr
					180					185					190		
10		Val	Ala	Met	Thr	Pro	Arg	Ser	Glu	Gly	Ser	Ser	Val	Asn	Leu	Ser	Pro
				195					200					205			
		Pro	Leu	Glu	Gln	Cys	Val	Pro	Asp	Arg	Gly	Gln	Gln	Tyr	Gln	Gly	Arg
				210					215					220			
		Leu	Ala	Val	Thr	Thr	His	Gly	Leu	Pro	Cys	Leu	Ala	Trp	Ala	Ser	Ala
15		225					230					235					240
		Gln	Ala	Lys	Ala	Leu	Ser	Lys	His	Gln	Asp	Phe	Asn	Ser	Ala	Val	Gln
						245					250					255	
		Leu	Val	Glu	Asn	Phe	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Asp	Glu	Glu	Gly	Ala
				260						265				270			
20		Trp	Cys	Tyr	Val	Ala	Gly	Lys	Pro	Gly	Asp	Phe	Gly	Tyr	Cys	Asp	Leu
				275					280					285			
		Asn	Tyr	Cys	Glu	Glu	Ala	Val	Glu	Glu	Glu	Thr	Gly	Asp	Gly	Leu	Asp
				290				295					300				
		Glu	Asp	Ser	Asp	Arg	Ala	Ile	Glu	Gly	Arg	Thr	Ala	Thr	Ser	Glu	Tyr
25		305					310					315					320
		Gln	Thr	Phe	Phe	Asn	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Asp	Cys
						325					330					335	
		Gly	Leu	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr	Glu
				340					345					350			
30		Arg	Glu	Leu	Leu	Glu	Ser	Tyr	Ile	Asp	Gly	Arg	Ile	Val	Glu	Gly	Ser
				355					360					365			
		Asp	Ala	Glu	Ile	Gly	Met	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Met	Leu	Phe	Arg	Lys
				370				375					380				
		Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Asp	Arg	Trp
35		385					390					395					400
		Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	Leu	Tyr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lys	Asn
						405					410					415	
		Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Ile	Gly	Lys	His	Ser	Arg	Thr
				420					425					430			
40		Arg	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Lys	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Ile	Tyr
				435					440					445			
		Ile	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asp	Ile	Ala
				450				455					460				
		Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ile	His	Pro
45		465					470					475					480
		Val	Cys	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	Gly
						485				490						495	
		Tyr	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp	Thr

RU 2 770 006 C2

	500	505	510
	Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn Leu		
	515	520	525
5	Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg Ile		
	530	535	540
	Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys Arg		
	545	550	555
	Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val Met Lys Ser		
	565	570	575
10	Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu		
	580	585	590
	Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe Arg		
	595	600	605
	Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu		
15	610	615	620
	<210> 17		
	<211> 467		
	<212> PRT		
	<213> Homo sapiens		
20	<300>		
	<308> PRF / 1205236A		
	<309> 1996-10-18		
	<313> (1)..(467)		
	<400> 17		
25	Leu Leu Gly Glu Ser Leu Phe Ile Arg Arg Glu Gln Ala Asn Asn Ile		
	1 5 10 15		
	Leu Ala Arg Val Thr Arg Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Met Lys Lys		
	20 25 30		
	Gly His Leu Glu Arg Glu Cys Met Glu Glu Thr Cys Ser Tyr Glu Glu		
30	35 40 45		
	Ala Arg Glu Val Phe Glu Asp Ser Asp Lys Thr Asn Glu Phe Trp Asn		
	50 55 60		
	Lys Tyr Lys Asp Gly Asp Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln Asn Gln		
	65 70 75 80		
35	Gly Lys Cys Lys Asp Gly Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Glu		
	85 90 95		
	Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Phe Thr Arg Lys Leu Cys Ser		
	100 105 110		
	Leu Asp Asn Gly Asp Cys Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln Asn Ser		
40	115 120 125		
	Val Val Cys Ser Cys Ala Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn Gly Lys		
	130 135 140		
	Ala Cys Ile Pro Thr Gly Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr Leu Glu		
	145 150 155 160		
45	Arg Arg Lys Arg Ser Val Ala Gln Ala Thr Ser Ser Ser Gly Glu Ala		
	165 170 175		
	Pro Asp Ser Ile Thr Trp Lys Pro Tyr Asp Ala Ala Asp Leu Asp Pro		
	180 185 190		

RU 2 770 006 C2

	Thr	Glu	Asn	Pro	Phe	Asp	Leu	Leu	Asp	Phe	Asn	Gln	Thr	Gln	Pro	Glu
			195					200					205			
	Arg	Gly	Asp	Asn	Asn	Leu	Thr	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Gln	Glu	Cys	Lys
		210					215					220				
5	Asp	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Ala	Leu	Leu	Ile	Asn	Glu	Glu	Asn	Glu
		225				230					235					240
	Gly	Phe	Cys	Gly	Gly	Thr	Ile	Leu	Ser	Glu	Phe	Tyr	Ile	Leu	Thr	Ala
				245						250					255	
	Ala	His	Cys	Leu	Tyr	Gln	Ala	Lys	Arg	Phe	Glu	Gly	Asp	Arg	Asn	Thr
10				260					265					270		
	Glu	Gln	Glu	Glu	Gly	Gly	Glu	Ala	Val	His	Glu	Val	Glu	Val	Val	Ile
			275					280					285			
	Lys	His	Asn	Arg	Phe	Thr	Lys	Glu	Thr	Tyr	Asp	Phe	Asp	Ile	Ala	Val
		290					295					300				
15	Leu	Arg	Leu	Lys	Thr	Pro	Ile	Thr	Phe	Arg	Met	Asn	Val	Ala	Pro	Ala
		305				310					315					320
	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	Asp	Trp	Ala	Glu	Ser	Thr	Leu	Met	Thr	Gln	Lys
				325						330					335	
	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Gly	Phe	Gly	Arg	Thr	His	Glu	Lys	Gly	Arg	Gln
20				340					345					350		
	Ser	Thr	Arg	Leu	Lys	Met	Leu	Glu	Val	Pro	Tyr	Val	Asp	Arg	Asn	Ser
			355					360					365			
	Cys	Lys	Leu	Ser	Ser	Ser	Phe	Ile	Ile	Thr	Gln	Asn	Met	Phe	Cys	Ala
		370					375					380				
25	Gly	Tyr	Asp	Thr	Lys	Gln	Glu	Asp	Ala	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly
		385				390					395					400
	Pro	His	Val	Thr	Arg	Phe	Lys	Asp	Thr	Tyr	Phe	Val	Thr	Gly	Ile	Val
				405						410					415	
	Ser	Trp	Gly	Glu	Gly	Cys	Ala	Arg	Lys	Gly	Lys	Tyr	Gly	Ile	Tyr	Thr
30				420					425					430		
	Lys	Val	Thr	Ala	Phe	Leu	Lys	Trp	Ile	Asp	Arg	Ser	Met	Lys	Thr	Arg
			435					440					445			
	Gly	Leu	Pro	Lys	Ala	Lys	Ser	His	Ala	Pro	Glu	Val	Ile	Thr	Ser	Ser
		450					455					460				
35	Pro	Leu	Lys													
	465															
	<210>	18														
	<400>	18														
	000															
40	<210>	19														
	<400>	19														
	000															
	<210>	20														
	<400>	20														
45	000															
	<210>	21														
	<400>	21														
	000															

<210> 22
 <400> 22
 000
 <210> 23
 5 <400> 23
 000
 <210> 24
 <211> 118
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 24
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 15 20 25 30
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Ile Val Pro Ala Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 20 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Trp Gly Val Ile Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 25 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 25
 <211> 109
 30 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 25
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 35 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 40 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Met Gln Tyr Asp Ser Leu Pro Phe
 85 90 95
 45 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105
 <210> 26
 <211> 220

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

5 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 10 Gly Gly Ile Val Pro Ala Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 15 85 90 95
 Ala Arg Ser Trp Gly Val Ile Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 20 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 25 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 30 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220

<210> 27

<211> 214

<212> PRT

35 <213> Homo sapiens
 <400> 27

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 Asp Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 45 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Met Gln Tyr Asp Ser Leu Pro Phe
 85 90 95

RU 2 770 006 C2

	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala
				100					105					110		
	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly
			115					120					125			
5	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala
		130					135				140					
	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln
	145					150					155					160
	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser
10					165					170					175	
	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr
				180					185					190		
	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser
			195					200					205			
15	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Ala										
		210														
	<210>	28														
	<211>	290														
	<212>	PRT														
20	<213>	Homo sapiens														
	<400>	28														
	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
	1				5					10					15	
	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
25				20					25					30		
	Ala	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
			35					40					45			
	Gly	Gly	Ile	Val	Pro	Ala	Phe	Gly	Thr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
		50					55					60				
30	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
	65					70					75					80
	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85					90				95		
	Ala	Arg	Ser	Trp	Gly	Val	Ile	Ser	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
35				100					105					110		
	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro
			115						120					125		
	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly
		130					135					140				
40	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn
	145					150					155					160
	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln
					165					170					175	
	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser
45				180					185					190		
	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser
			195					200					205			
	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Glu	Phe	Pro	Lys

[illegible]

(57) Формула изобретения

1. Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывает фактор IX Padua, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность SSY AIS (SEQ ID NO: 6); GIVPAFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO: 7); SWGVISFAY (SEQ ID NO: 8); RASQDISSYLN (SEQ ID NO: 9); AASNLS (SEQ ID NO: 10) и MOYDSLPTF (SEQ ID NO: 11).

2. Антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, по п. 1, которое связывается с
20 эпитопом SEQ ID NO: 1, причем эпитоп представляет собой линейный эпитоп в пределах
аминокислотной последовательности DRATCLLSTKFT (SEQ ID NO: 3).

3. Антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, по п. 1, которое связывается с эпитопом SEQ ID NO: 1, причем эпитоп представляет собой конформационный эпитоп сложной структуры аминокислотной последовательности
LVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFH (SEQ ID NO: 5).

4. Антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, по п. 3, причем указанная сложенная структура содержит дисульфидный мостик.

5. Антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, по любому из предыдущих пунктов, которое не связывается с фактором IX дикого типа (WT), содержащим аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 2).

6. Антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, по любому из предыдущих пунктов, которое не связывается с аминокислотной последовательностью DRATCLRSTKFT (SEQ ID NO: 14), LVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFH (SEQ ID NO: 15), или с обеими SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15.

35 7. Антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, по любому из предыдущих пунктов, причем антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, связывается с фактором IX Padua с K_D приблизительно 100 нМ или менее.

8. Антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, по любому из предыдущих пунктов, причем антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, связывается с фактором IX Padua с K_D в пределах диапазона, составляющего от приблизительно 25 до приблизительно 75 нМ.

9. Антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, по п. 8, причем антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, связывается с фактором IX Padua с K_D в пределах диапазона, составляющего от приблизительно 50 нМ до приблизительно 60 нМ.

10. Антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, по любому из предыдущих пунктов, причем антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, связывается с фактором IX Padua и не связывается с фактором IX WT в образце, содержащем плазму крови человека.

11. Антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, по п. 10, причем образец содержит по меньшей мере или приблизительно 5%, по меньшей мере или приблизительно 10% или по меньшей мере или приблизительно 20% плазмы крови человека, а также образец содержит по меньшей мере или приблизительно 5 мкг/мл фактора IX WT.

5 12. Антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, по любому из предыдущих пунктов, причем антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, не связывается с полипептидом фактора II, полипептидом фактора X, или ни с полипептидом фактора II, ни с полипептидом фактора X.

10 13. Антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, по любому из предыдущих пунктов, которое представляет собой Fab- или Fab2'-фрагмент антитела.

14. Антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, по любому из предыдущих пунктов, которое является моноспецифическим.

15. Антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, по любому из предыдущих пунктов, которое является полностью человеческим.

15 16. Антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, по любому из предыдущих пунктов, которое является бивалентным.

17. Антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, по любому из предыдущих пунктов, содержащее димеризированные Fab-фрагменты или димеризированное Fab-миниантитело.

20 18. Антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, по любому из предыдущих пунктов, которое является димеризированным посредством линкера Fab-фрагментом.

19. Антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, по любому из предыдущих пунктов, содержащее (i) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, или SEQ ID NO: 25, или SEQ ID NO: 24 и 25, или (ii) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, или SEQ ID NO: 27, или SEQ ID NO: 26 и 27.

20. Полипептид, который связывает фактор IX Padua, причем:

а) полипептид содержит аминокислотную последовательность, содержащую каждый из SEQ ID NO: 6-11, причем между каждой из SEQ ID NO: 6-11 присутствует одна или более аминокислот;

30 б) не связывается с фактором IX дикого типа (WT); и

в) имеет структуру антигенсвязывающего фрагмента, аналога антитела, синтетического миметика антитела, сконструированного белка или аптамера.

21. Полипептид по п. 20, причем полипептид содержит (i) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, или SEQ ID NO: 25, или SEQ ID NO: 24 и 25, или (ii) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, или SEQ ID NO: 27, или SEQ ID NO: 26 и 27.

22. Полипептид по п. 20 или 21, причем полипептид дополнительно содержит метку FLAG, содержащую DYKDDDDK (SEQ ID NO: 12), и/или гекса-His метку, содержащую НННННН (SEQ ID NO: 13).

40 23. Полипептид по п. 22, причем метка FLAG и/или гекса-His метка расположена на С-конце полипептида.

24. Конъюгат, который связывает фактор IX Padua, содержащий антитело, или антигенсвязывающий фрагмент или полипептид, по любому из предыдущих пунктов, конъюгированное с гетерологичным фрагментом, выбранным из группы, состоящей из полимера, углевода, липида, нуклеиновой кислоты, олигонуклеотида, аминокислоты, пептида, полипептида, белка и индикаторного средства.

25. Конъюгат по п. 24, причем антитело, или антигенсвязывающий фрагмент или полипептид, конъюгировано с агарозой, целлюлозой, декстраном, полиакриламидом,

латексом или стеклом с контролируемым размером пор.

26. Конъюгат по п. 24 или 25, причем антитело, или антигенсвязывающий фрагмент или полипептид, конъюгировано с флуорофором, хромофором, радиоизотопом, ферментативной меткой или биотином.

5 27. Конъюгат по любому из пп. 24-26, содержащий антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, по п. 15.

28. Конъюгат по п. 27, причем полипептиды димеризированного Fab-фрагмента связаны при помощи структуры «спираль-петля-спираль».

10 29. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело, антигенсвязывающий фрагмент, полипептид, или антитело, антигенсвязывающий фрагмент, и полипептидные части конъюгата по любому из предыдущих пунктов.

30. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 29.

15 31. Клетка-хозяин, экспрессирующая антитело, антигенсвязывающий фрагмент, полипептид, или антитело, антигенсвязывающий фрагмент, и полипептидные части конъюгата по любому из пп. 24-28, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 29 или вектор по п. 30.

20 32. Набор для детекции фактора IX Padua, содержащий (i) антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, по любому из пп. 1-19, полипептид по любому из пп. 20-23, конъюгат по любому из пп. 24-28, нуклеиновую кислоту по п. 29, вектор по п. 30, и/или клетку-хозяина по п. 31, и инструкции по применению.

33. Набор по п. 32, причем набор дополнительно содержит (ii) вторичное антитело, которое связывается с антителом, антигенсвязывающим фрагментом, полипептидом или конъюгатом из (i).

34. Набор по п. 32 или 33, дополнительно содержащий твердую подложку.

25 35. Набор по п. 34, причем антитело, антигенсвязывающий фрагмент, полипептид или конъюгат предварительно нанесены на твердую подложку.

36. Набор по п. 34 или 35, причем твердая подложка представляет собой полимерный микроноситель, микротитровальный планшет, мембрану или фильтр.

30 37. Набор по п. 35 или 36, содержащий твердую подложку, на которую предварительно нанесено покрытие раствором, содержащим приблизительно 100 нг или более, приблизительно 150 нг или более, приблизительно 200 нг или более, приблизительно 500 нг или более антигенсвязывающего фрагмента.

35 38. Композиция для детекции фактора IX Padua, содержащая подходящее количество антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, по любому из пп. 1-19, смешанное с полученным от человека биологическим образцом, содержащим плазму крови человека или ее разведенную фракцию, и/или ткань человека или ее клетки.

39. Композиция по п. 38, причем композиция дополнительно содержит индикаторное средство.

40 40. Композиция для детекции фактора IX Padua, содержащая подходящее количество антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, по любому из пп. 1-19, смешанное с полученным от человека биологическим образцом, содержащим белки плазмы крови человека, причем по меньшей мере один из белков плазмы крови человека выбран из группы, состоящей из фактора IX или его варианта, фактора II и фактора X.

45 41. Композиция по п. 40, причем композиция дополнительно содержит индикаторное средство.

42. Применение антитела, или антигенсвязывающего фрагмента, по любому из пп. 1-19, полипептида по любому из пп. 20-23, конъюгата по любому из пп. 24-28, нуклеиновой кислоты по п. 29, вектора по п. 30, клетки-хозяина по п. 31 и/или набора

по любому из пп. 32-37 для детекции фактора IX Padua в образце.

43. Способ детекции фактора IX Padua в полученном от субъекта образце, предусматривающий (i) приведение в контакт образца с антителом, или антигенсвязывающим фрагментом, по любому из пп. 1-19, полипептидом по любому из пп. 20-23 или конъюгатом по любому из пп. 24-28 для формирования комплекса, содержащего фактор IX Padua и антитело, антигенсвязывающий фрагмент, полипептид или конъюгат, и (ii) детекцию комплекса в образце.

44. Способ по п. 43, причем антитело, или антигенсвязывающий фрагмент или полипептид, конъюгировано с индикаторным средством и/или твердой подложкой, или причем конъюгат содержит индикаторное средство.

45. Способ по п. 43, предусматривающий приведение в контакт образца со вторичным антителом, содержащим индикаторное средство, причем вторичное антитело связывается с антителом, или антигенсвязывающим фрагментом, или полипептидом, или конъюгатом.

46. Способ по п. 44 или 45, причем детекция комплекса предусматривает детекцию сигнала от индикаторного средства.

47. Способ по п. 46, причем сигнал представляет собой ферментативную активность, связывающую активность и/или хромогенную активность.

48. Способ по любому из пп. 43-47, причем образец представляет собой образец крови, образец сыворотки или образец плазмы крови.

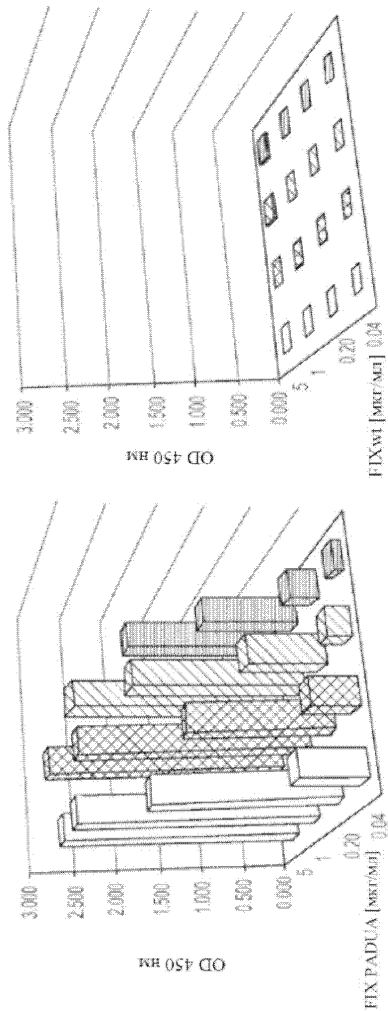
49. Способ по любому из пп. 43-48, причем субъект был подвергнут лечению вектором, содержащим нуклеотидную последовательность, кодирующую фактор IX Padua.



Фиг. 1

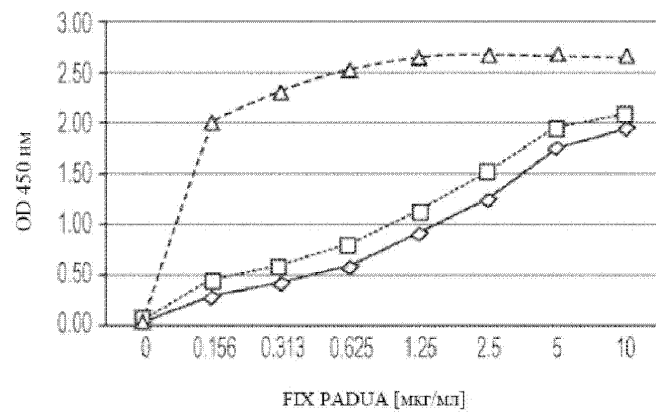
Мутант PADUA

Замена аминокислотного артинина (R) на лейцин (L) в положении 384 приводит к гиперфункциональной активности FIX (~5-10X). Положение 384 соответствует положению 338 последовательности зрелого пептида, которая исключает сигнальный пептид и пропептид.



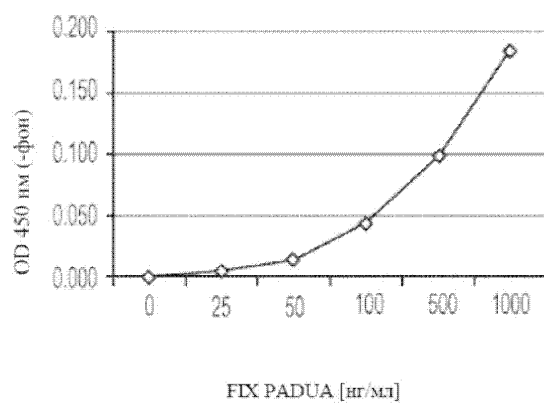
Фиг. 2

3/32

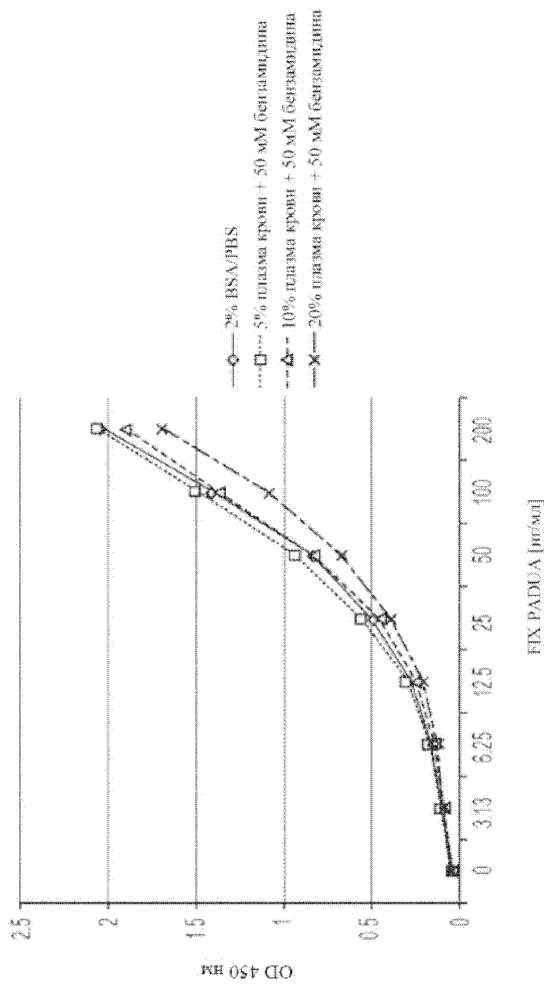


Фиг. 3

4/32

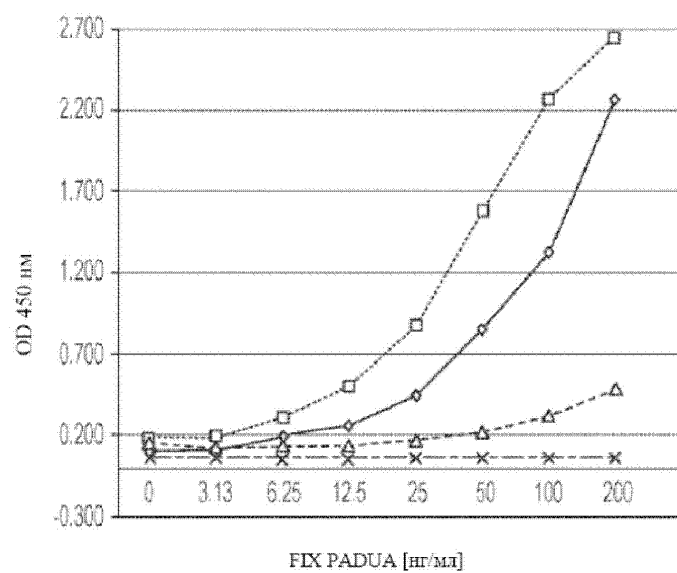


Фиг. 4

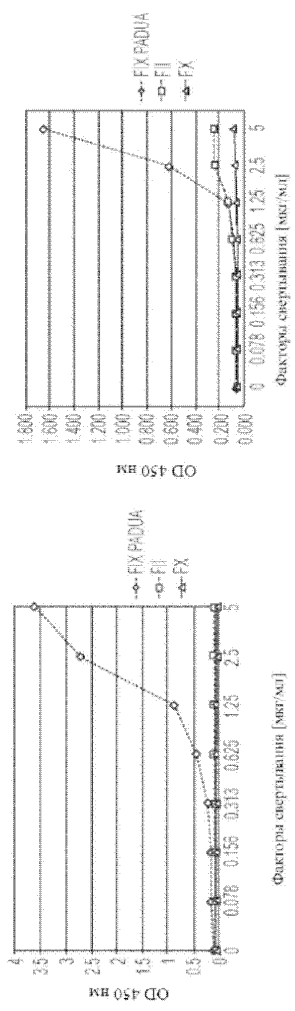


Фиг. 5

6/32

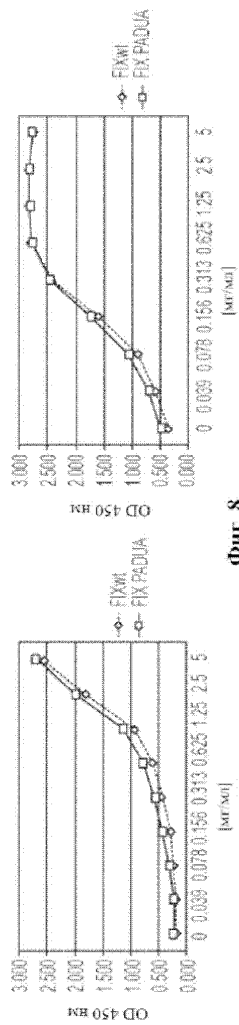


Фиг. 6



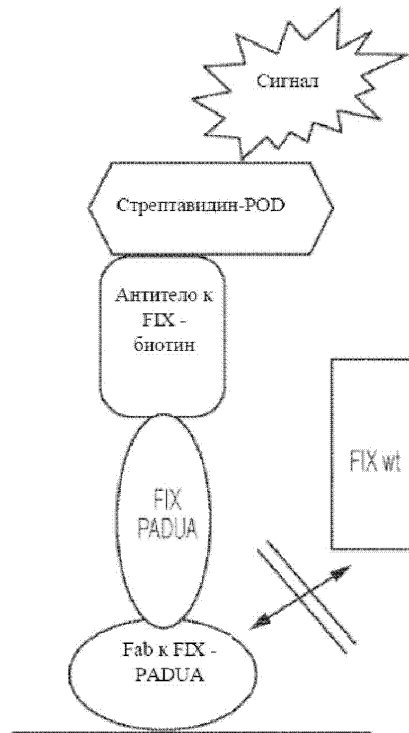
Фиг. 7

8/32



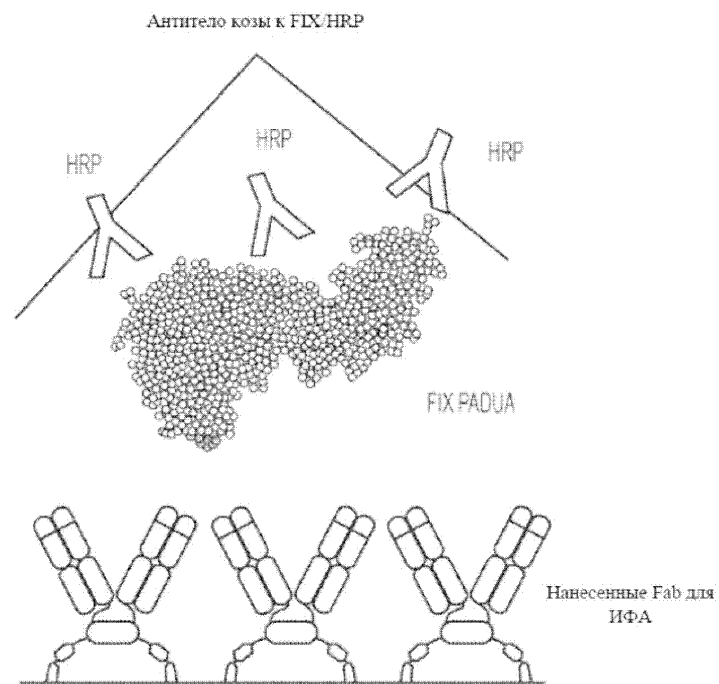
Фиг. 8

9/32



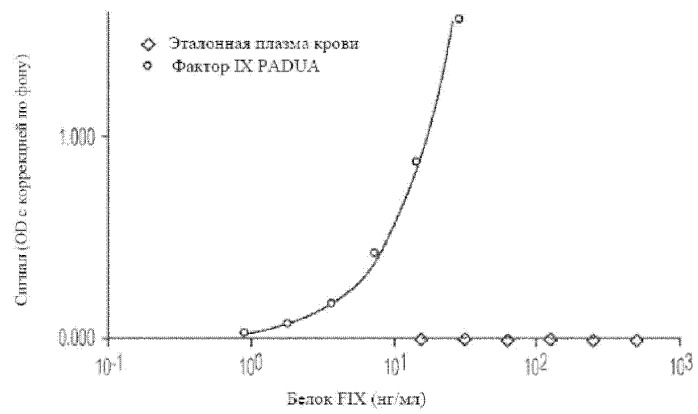
Фиг. 9

10/32



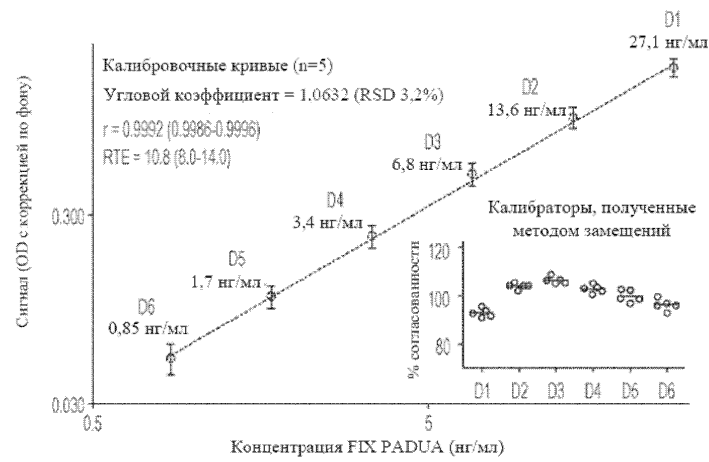
Фиг. 10

11/32

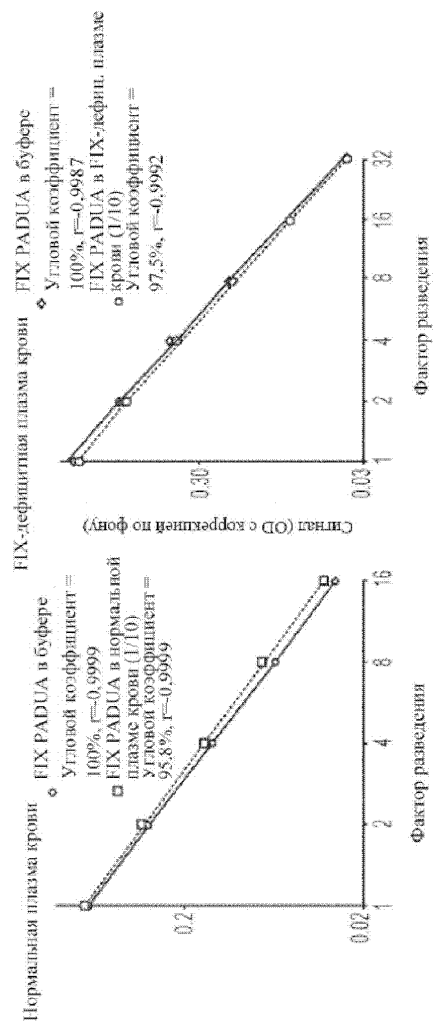


Фиг. 11

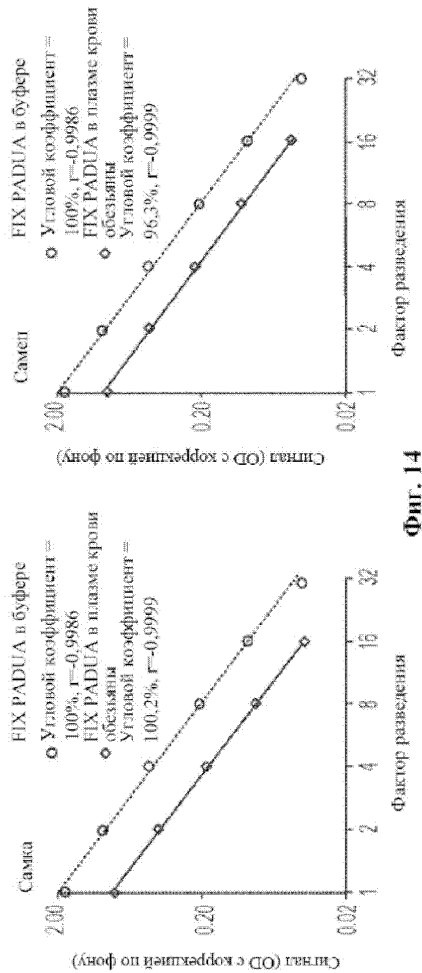
12/32



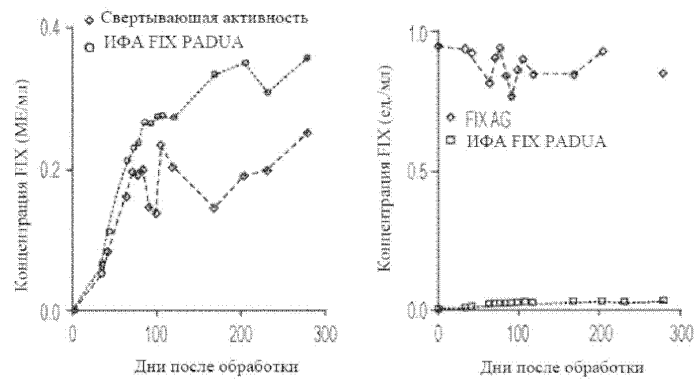
Фиг. 12



Фиг. 13

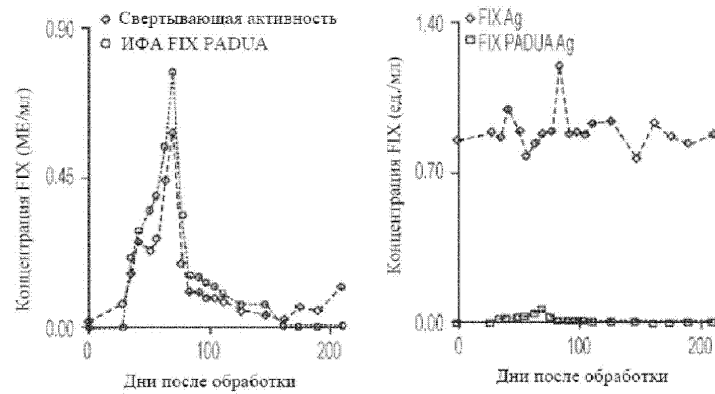


15/32



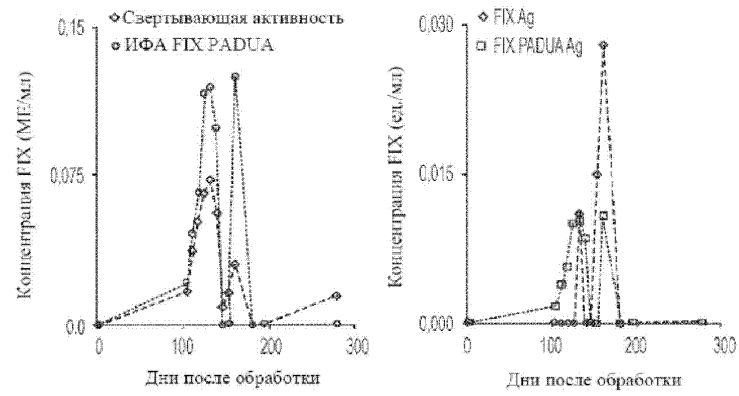
Фиг. 15

16/32



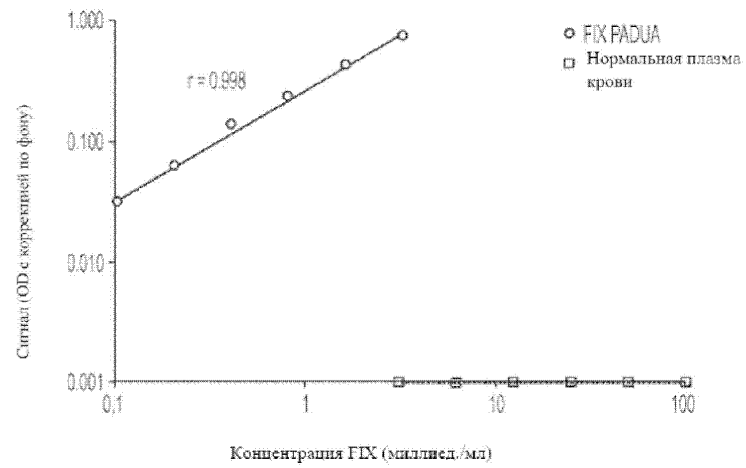
Фиг. 16

17/32



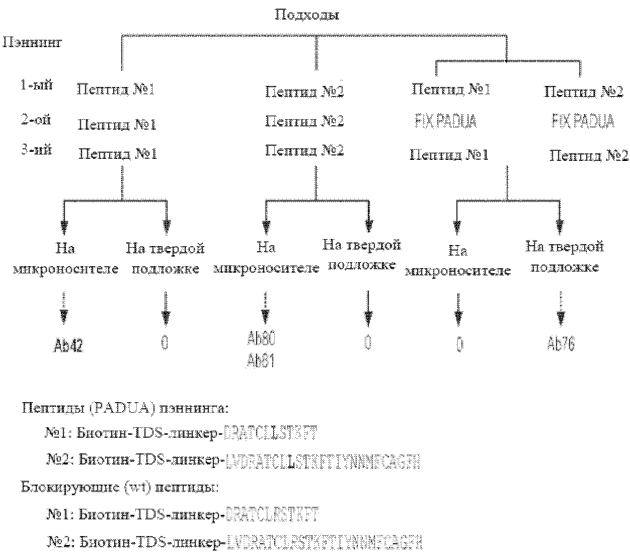
Фиг. 17

18/32



Фиг. 18

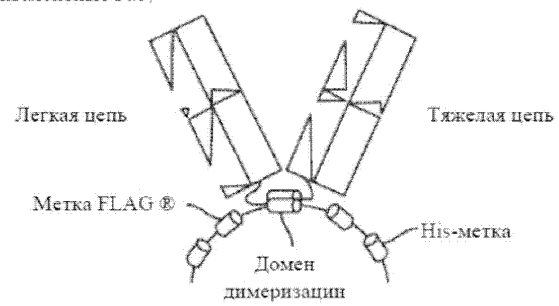
19/32



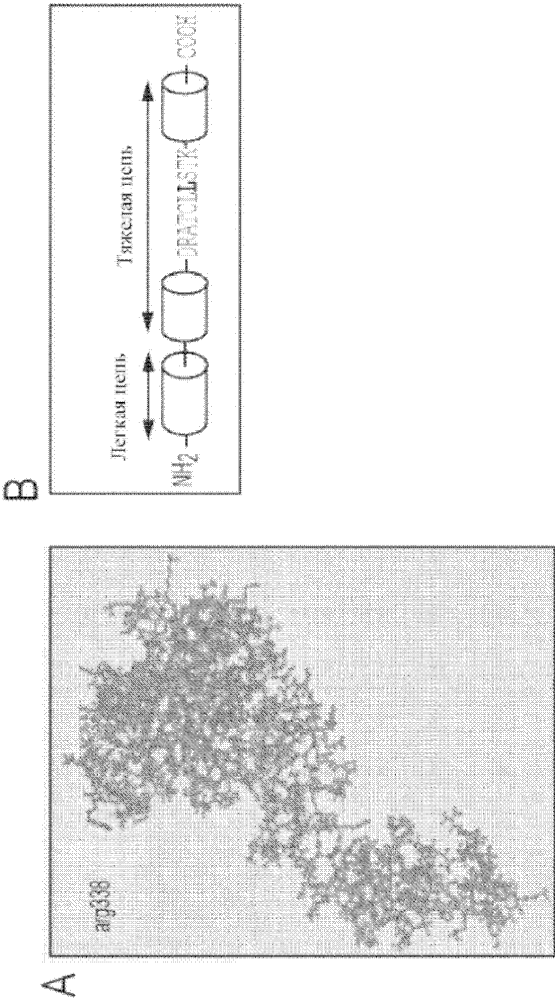
Фиг. 19

20/32

Схематическая структура очищенных миниантител
(бивалентные Fab)

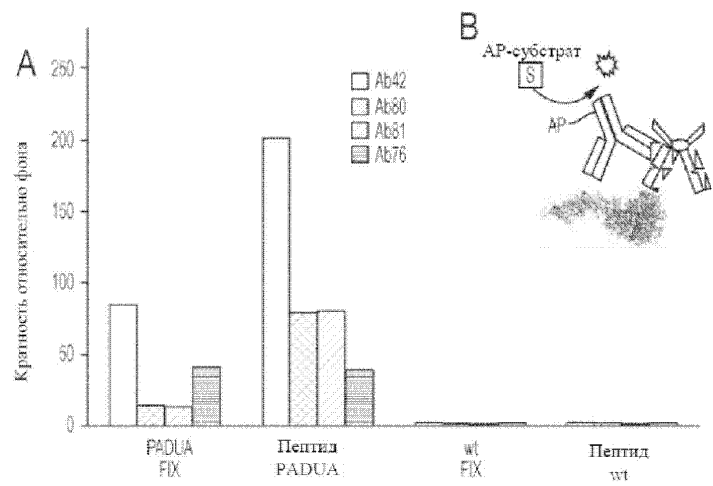


Фиг. 20



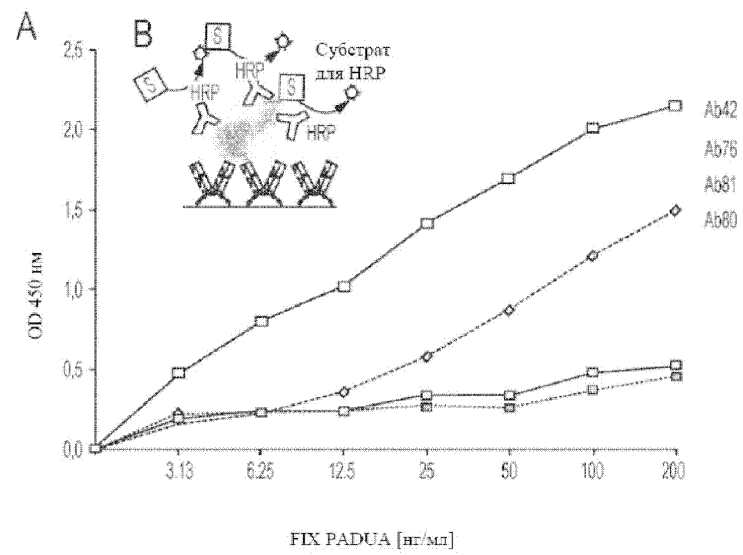
Фиг. 21

22/32



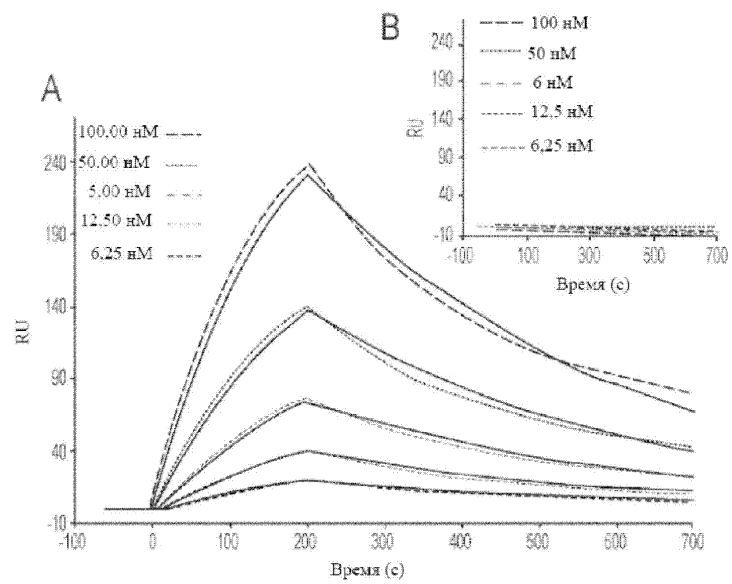
Фиг. 22

23/32



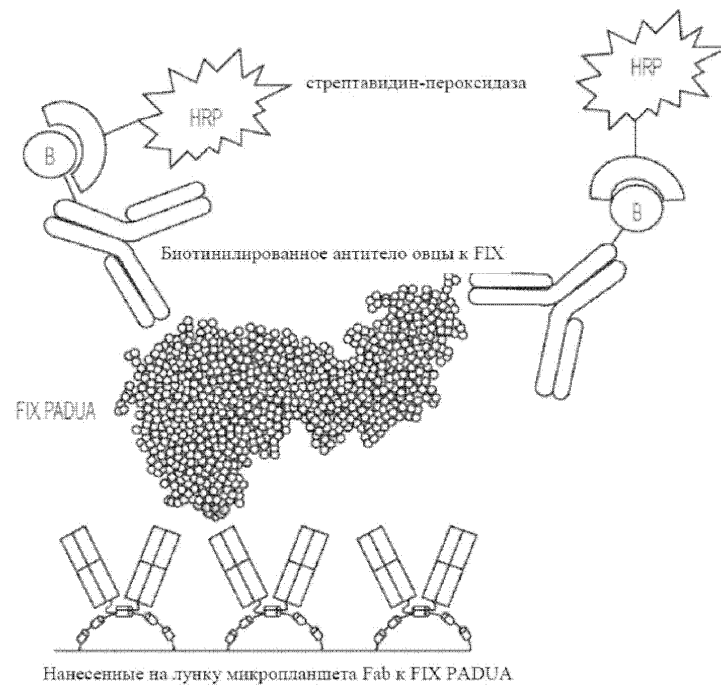
Фиг. 23

24/32

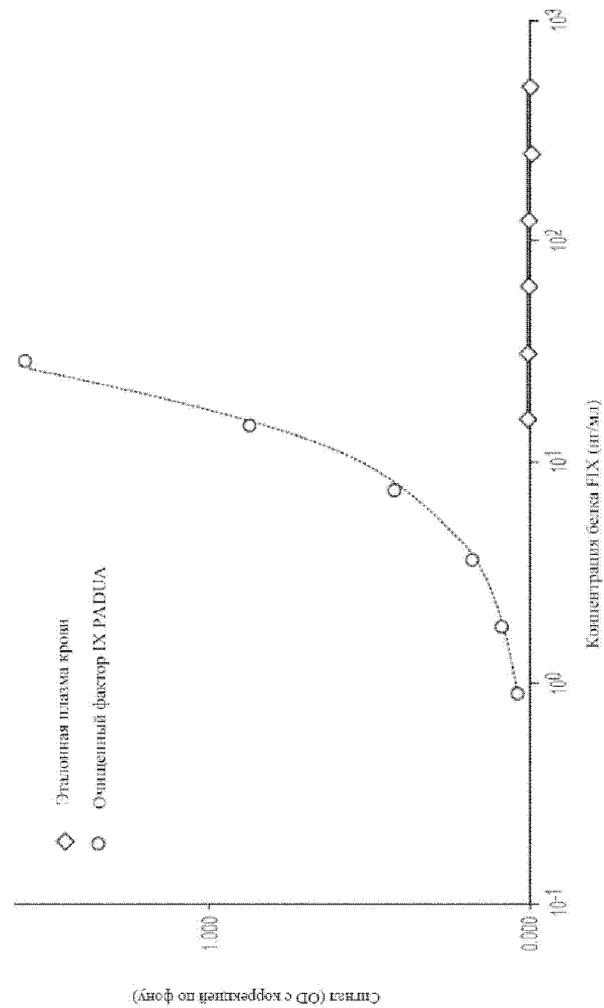


Фиг. 24

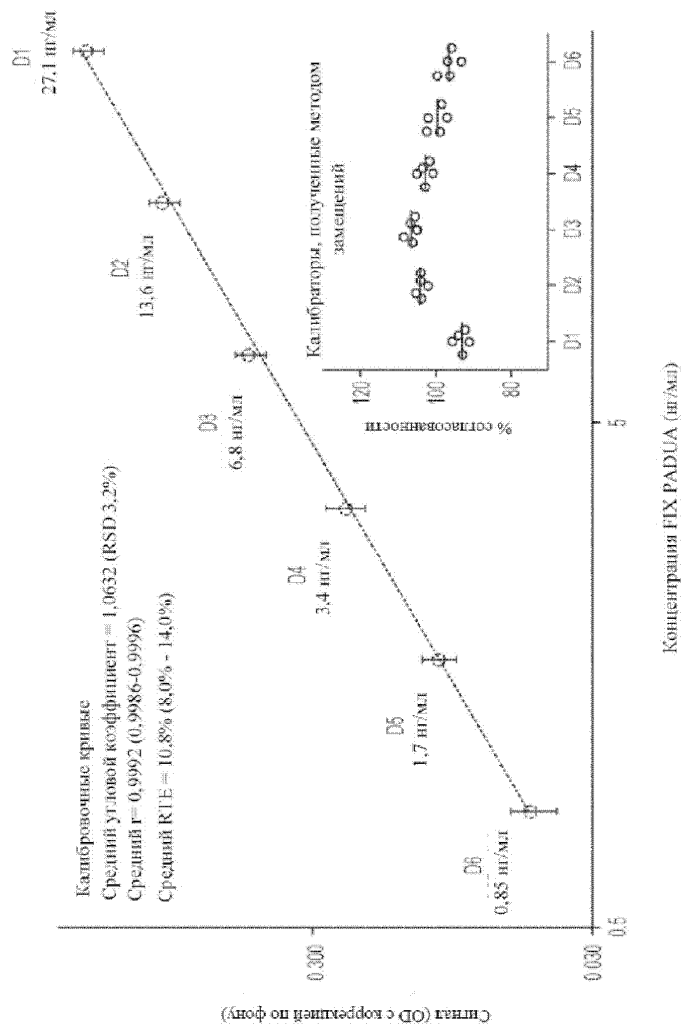
25/32



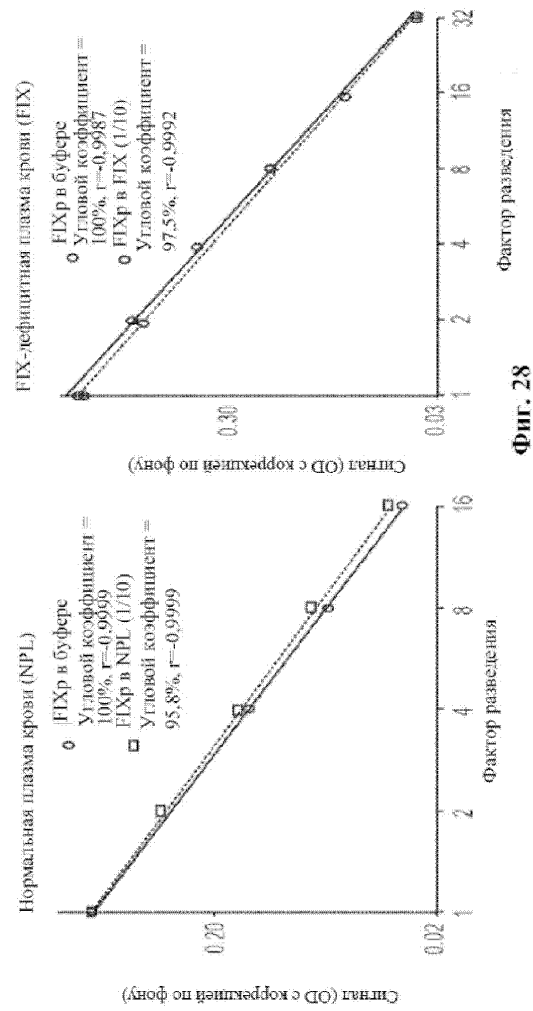
Фиг. 25



Фиг. 26

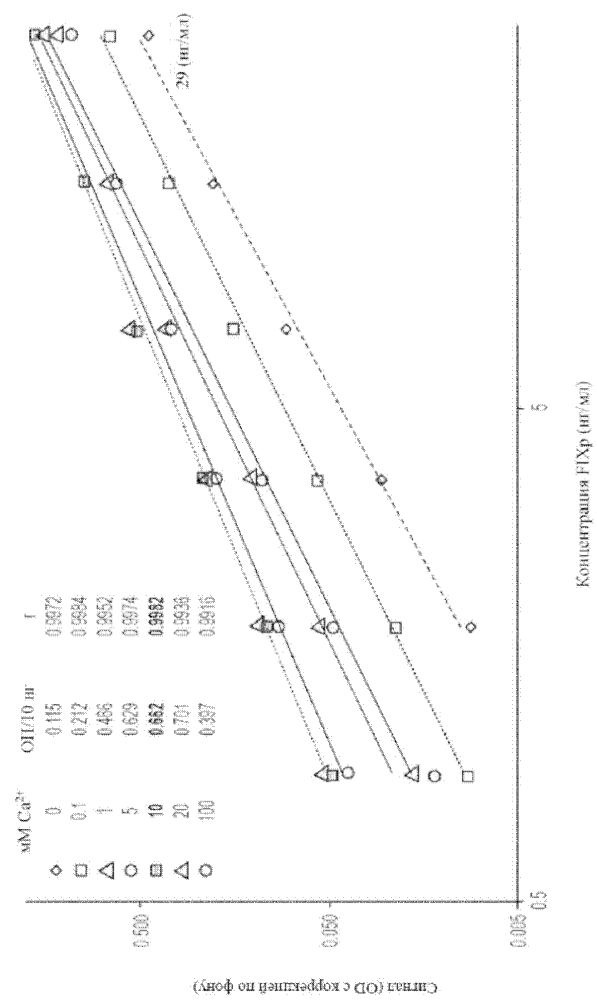


Фиг. 27



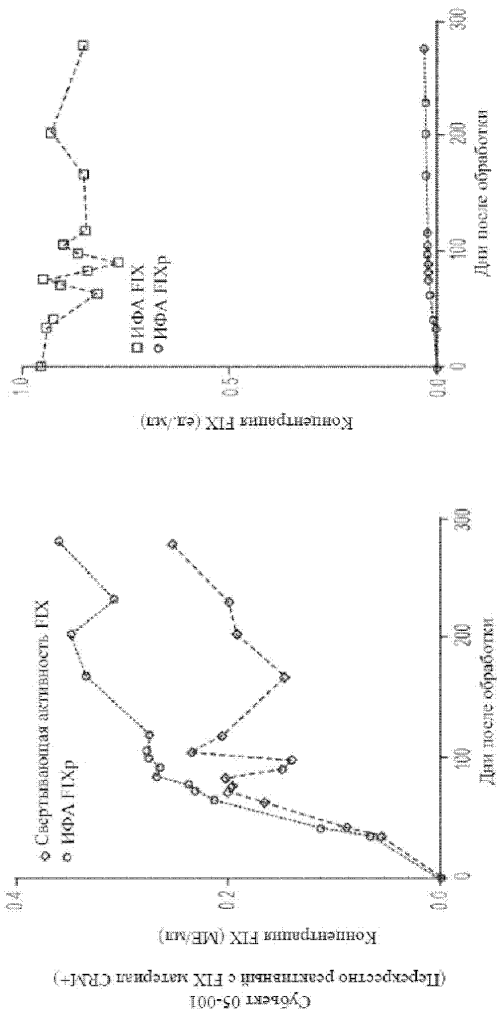
Фиг. 28

29/32



Фиг. 29

30/32



Фиг. 30

31/32

