

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ(12) ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

(21)(22) Заявка: 2011127198/10, 04.12.2009

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
04.12.2008 US 61/200,877
07.04.2009 US 61/212,071

(43) Дата публикации заявки: 10.01.2013 Бюл. № 1

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 04.07.2011(86) Заявка РСТ:
US 2009/066815 (04.12.2009)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2010/065882 (10.06.2010)Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"(71) Заявитель(и):
ЭББОТТ ЛЭБОРЭТРИЗ (US)(72) Автор(ы):
ЯКОБ Кларисса Г. (US),
ВУ Ченбин (US),
УОЛТЕР Карл А. (US),
ГХАЮР Тарик (US)**(54) ИММУНОГЛОБУЛИНЫ С ДВОЙНЫМИ ВАРИАБЕЛЬНЫМИ ДОМЕНАМИ И ИХ
ПРИМЕНЕНИЕ****(57) Формула изобретения**

1. Связывающий белок, содержащий

(i) полипептидную цепь, где указанная полипептидная цепь содержит VD1-(X1)n-
VD2-C-(X2)n, где:

VD1 является первым вариабельным доменом тяжелой цепи;

VD2 является вторым вариабельным доменом тяжелой цепи;

С является константным доменом тяжелой цепи;

X1 является линкером при условии, что он не является CH1;

X2 является Fc-областью;

(X1)n является (X1)0 или (X1)1;

(X2)n является (X2)0 или (X2)1;

где тяжелая цепь содержит сайт расщепления;

(ii) полипептидную цепь, где указанная полипептидная цепь содержит VD1-(X1)n-
VD2-C-(X2)n, где:

VD1 является первым вариабельным доменом легкой цепи;

VD2 является вторым вариабельным доменом легкой цепи;

С является константным доменом легкой цепи;

RU 2011127198 A

RU 2011127198 A

X1 является линкером при условии, что он не является CL;
 X2 не содержит Fc-область;
 (X1)n является (X1)0 или (X1)1;
 (X2)n является (X2)0 или (X2)1; b
 где легкая цепь содержит сайт расщепления,
 (iii) первую и вторую полипептидные цепи, где указанная первая полипептидная
 цепь содержит первый VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, где[^]
 VD1 является первым вариабельным доменом тяжелой цепи;
 VD2 является вторым вариабельным доменом тяжелой цепи;
 С является константным доменом тяжелой цепи;
 X1 является первым линкером; и
 X2 является Fc-областью; и
 где указанная вторая полипептидная цепь содержит второй VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n,
 где:
 VD1 является первым вариабельным доменом легкой цепи;
 VD2 является вторым вариабельным доменом легкой цепи;
 С является константным доменом легкой цепи;
 X1 является вторым линкером;
 X2 не содержит Fc-область;
 где (X1)n независимо является (X1)0 или (X1)1 и (X2)n независимо является (X2)0
 или (X2)1,
 где первый и второй линкер X1 являются одинаковыми или различными;
 где первый линкер X1 не является CH1 и/или второй линкер X1 не является CH1; и
 где по меньшей мере одна из тяжелой цепи и легкой цепи содержит сайт
 расщепления, или
 (iv) четыре полипептидные цепи, где две полипептидные цепи содержат VD1-(X1)n-
 VD2-C-(X2)n, где
 VD1 является первым вариабельным доменом тяжелой цепи;
 VD2 является вторым вариабельным доменом тяжелой цепи;
 С является константным доменом тяжелой цепи;
 X1 является первым линкером; и
 X2 является Fc-областью; и
 где две полипептидные цепи содержат VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, где
 VD1 является первым вариабельным доменом легкой цепи;
 VD2 является вторым вариабельным доменом легкой цепи;
 С является константным доменом легкой цепи;
 X1 является вторым линкером;
 X2 не содержит Fc-область;
 где (X1)n независимо является (X1)0 или (X1)1 и (X2)n независимо является (X2)0
 или (X2)1,
 где первый и второй линкер X1 являются одинаковыми или различными;
 где первый линкер X1 не является CH1 и/или второй линкер X1 не является CH1; и
 где по меньшей мере одна из тяжелой цепи и легкой цепи содержит сайт
 расщепления, и где связывающий белок способен связываться с двумя антигенами.

2. Связывающий белок по п.1, где

(i) n является 0; и/или

(ii) X1 или X2 является любым из SEQ ID NO:1-62, TVA и AS.

3. Связывающий белок по п.1, где

(i) связывающий белок расщепляют таким образом, что связывание с по меньшей
 мере одним из VD1 и VD2 усиливается;

- (ii) сайт расщепления находится между по меньшей мере одним VD1 и VD2;
- (iii) сайт расщепления находится в по меньшей мере одном линкере;
- (iv) по меньшей мере один из VD1 или VD2 не связывается со своей мишенью до расщепления между VD1 и VD2;
- (v) линкер связывающего белка избирательно расщепляется ферментом;
- (vi) линкер связывающего белка избирательно расщепляется ферментом при производстве;
- (vii) линкер связывающего белка избирательно расщепляется ферментом, когда связывающий белок примыкает к по меньшей мере одной мишени;
- (viii) связывающий белок избирательно расщепляется ферментом, когда связывающий белок связывается с по меньшей мере одной мишенью.

4. Связывающий белок по п.1, где связывающий белок расщепляется энтерокиназой, тромбином; PreScission, протеазой вируса гравировки табака (TEV); тканевым активатором плазминогена (tPA) + Пролин, цинкзависимой эндопептидазой, матричной металлопротеиназой (MMP); серрализином; астацином; адамализином; MMP-1; MMP-2; MMP-3; MMP-7; MMP-8; MMP-9; MMP-10; MMP-11; MMP-12; MMP-13; MMP-14; MMP-15; MMP-16; MMP-17; MMP-18; MMP-19; MMP-20; MMP-21; MMP-22; MMP-23A; MMP-23B; MMP-24; MMP-25; MMP-26; MMP-27; MMP-28; дизинтегрином и металлопротеиназой (ADAM); ADAM17; ADAMTS1; ADAM1; ADAM10; ADAMS; ADAMTS4; ADAMTS13; ADAM12; ADAM15; ADAM9; ADAMTS5; ADAM33; ADAM11; ADAM2; ADAMTS2; ADAMTS9; ADAMTS3; ADAMTS7; ADAM22; ADAM28; ADAMTS12; ADAM19; ADAMTS8; ADAM29; ADAM23; ADAM3A; ADAM18; ADAMTS6; ADAM7; ADAMDES1; ADAM20; ADAM6; ADAM21; ADAM3B; ADAMTSL3; ADAMTSL4; ADAM30; ADAMTS20; ADAMTSL2; каспазой; каспазами 1-12, каспазой 14; катепсином; катепсином G; катепсином B; катепсином D; катепсином LI; катепсином C; катепсином K; катепсином S; катепсином H; катепсином A; катепсином E; катепсином L; катепсином Z; катепсином F; катепсин G-подобной протеазой 2; катепсин L-подобной протеазой 1; катепсином W; катепсин L-подобной протеазой 2; катепсин L-подобной протеазой 3; катепсин L-подобной протеазой 4; катепсин L-подобной протеазой 5; катепсин L-подобной протеазой 6; катепсин L-подобной протеазой 7; катепсином O; кальпаином; кальпаином 3; кальпаином 10; большой субъединицей кальпаина 1 (μ g/1); малой субъединицей кальпаина 1; большой субъединицей кальпаина 2 (μ g/1); кальпаином 9; кальпаином 11; кальпаином 5; кальпаином 6; кальпаином 13; кальпаином 8; малой субъединицей кальпаина 2; кальпаином 15; кальпаином 12; кальпаином 7 или кальпаином 8.

5. Связывающий белок по п.1, где Fc-область является

- (i) вариантом последовательности Fc-области; и/или
- (ii) Fc-областью из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE или IgD.

6. Связывающий белок по п.1, где указанный связывающий белок

(i) обладает константой скорости прямой реакции (Kon) к указанной одной или нескольким мишениям по меньшей мере приблизительно $10^2 M^{-1} s^{-1}$; по меньшей мере приблизительно $10^3 M^{-1} s^{-1}$; по меньшей мере приблизительно $10^4 M^{-1} s^{-1}$; по меньшей мере приблизительно $10^5 M^{-1} s^{-1}$; или по меньшей мере приблизительно $10^6 M^{-1} s^{-1}$, как измеряют посредством поверхностного плазменного резонанса;

(ii) обладает константой скорости обратной реакции (Koff) к указанной одной или нескольким мишениям, не более приблизительно $10^{-3} s^{-1}$, не более приблизительно $10^{-4} s^{-1}$; не более приблизительно $10^{-5} s^{-1}$; или не более приблизительно $10^{-6} s^{-1}$, как измеряют посредством поверхностного плазменного резонанса; и/или

(iii) обладает константой диссоциации (K_D) к указанной одной или нескольким

мишеням, не более приблизительно 10^{-7} М; не более приблизительно 10^{-8} М; не более приблизительно 10^{-9} М; не более приблизительно 10^{-10} М; не более приблизительно 10^{-11} М; не более приблизительно 10^{-12} М или не более 10^{-13} М.

7. Конъюгат связывающего белка, содержащий связывающий белок по п.1, указанный конъюгат связывающего белка дополнительно содержащий средство, где указанное средство является молекулой иммуноадгезии, средством визуализации, терапевтическим средством, цитотоксическим средством, радиоактивной меткой, ферментом, флуоресцентной меткой, люминесцентной меткой, биолюминесцентной меткой, магнитной меткой, биотином, ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , ^{153}Sm , антиметаболитом, алкилирующим средством, антибиотиком, фактором роста, цитокином, антиангиогенным средством, антимитотическим средством, антрациклином, токсином или апоптотическим средством.

8. Связывающий белок по п.1, где указанный связывающий белок является кристаллизованным связывающим белком, и где указанный кристалл, необязательно, является фармацевтическим кристаллом с контролируемым высвобождением без носителя.

9. Выделенная нукleinовая кислота, кодирующая аминокислотную последовательность связывающего белка по любому из пп.1-8.

10. Вектор, содержащий выделенную нукleinовую кислоту по п.9, где указанный вектор, необязательно, является pcDNA, pTT, pTT3, pEFBOS, pBV, pJV, pcDNA3.1 TOPO, pEF6 TOPO, pHbE или pBJ.

11. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.10, где указанная клетка-хозяин, необязательно, является прокариотической клеткой, эукариотической клеткой, клеткой простейшего, клеткой животного, растительной клеткой, клеткой грибов, клеткой млекопитающего, клеткой птицы, клеткой насекомого, клеткой CHO, клеткой COS, клеткой Sf9, дрожжевой клеткой, Escherichia coli и/или Saccharomyces cerevisiae.

12. Способ получения связывающего белка, включающий культивирование клетки-хозяина по п.11 в среде для культивирования в условиях, достаточных для продукции связывающего белка.

13. Способ по п.12, где 50-75%, 75-90%, 90-95% получаемого связывающего белка является двойным специфичным тетравалентным связывающим белком.

14. Белок, получаемый способом по п.12.

15. Фармацевтическая композиция, содержащая связывающий белок по любому из пп.1-8 и 14 и фармацевтически приемлемый носитель,

где указанная композиция, необязательно, содержит по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, и

где указанное дополнительное терапевтическое средство, необязательно, является средством визуализации, цитотоксическим средством, ингибитором ангиогенеза, ингибитором киназ, блокатором молекул костимуляции, блокатором молекул адгезии, антителом против цитокина или его функционального фрагмента, метотрексатом, циклоспорином, рапамицином, FK506, детектируемой меткой или репортером, антагонистом TNF, противоревматическим средством, миорелаксантом, наркотическим средством, нестероидным противовоспалительным лекарственным средством (NSAID), анальгетиком, анестетиком, седативным средством, местным анестетиком, блокатором нервно-мышечного проведения, противомикробным средством, противопсориазным средством, кортикостероидом, анаболическим стероидом, эритропоэтином, вакциной, иммуноглобулином, иммуносупрессором, гормоном роста, замещающим гормональным лекарственным средством,

радиофармацевтическим средством, антидепрессантом, антипсихотическим средством, стимулирующим, противоастматическим средством, бета-агонистом, ингаляционным стероидом, эpineфрином или его аналогом, цитокином и антагонистом цитокина.

16. Способ лечения индивидуума от заболевания или нарушения посредством введения индивидууму связывающего белка по любому из пп.1-8 и 14 таким образом, что достигают лечения,

где указанное заболевание или нарушение, необязательно, является ревматоидным артритом, остеоартритом, хроническим ювенильным артритом, септическим артритом, артритом Лайма, псoriатическим артритом, реактивным артритом, спондилоартропатией, системной красной волчанкой, болезнью Крона, язвенным колитом, воспалительным заболеванием кишечника, инсулинозависимым сахарным диабетом, тиреоидитом, астмой, аллергическими заболеваниями, psoriазом, дерматитом, склеродермии, реакцией "трансплантат-против-хозяина", отторжением трансплантата органа, острым или хроническим иммунным заболеванием, ассоциированным с трансплантацией органа, саркоидозом, атеросклерозом, диссеминированным внутрисосудистым свертыванием, синдромом Кавасаки, болезнью Грейвса, нефротическим синдромом, синдромом хронической усталости, гранулематозом Вегенера, болезнью Шенлейн-Геноха, микроскопическим васкулитом почек, хроническим активным гепатитом, увеитом, септическим шоком, синдромом токсического шока, септическим синдромом, кахексией, инфекционными заболеваниями, паразитарными заболеваниями, синдромом приобретенного иммунодефицита, острым поперечным миелитом, хореей Гентингтона, болезнью Паркинсона, болезнью Альцгеймера, инсультом, первичным биллиарным циррозом, гемолитической анемией, злокачественными новообразованиями, сердечной недостаточностью, инфарктом миокарда, болезнью Аддисона, спорадической плюригландулярной недостаточностью типа I и плюригландулярной недостаточностью типа II, синдромом Шмидта, (острым) респираторным дистресс-синдромом взрослых, алопецией, гнездной алопецией, сероотрицательной артропатией, артропатией, болезнью Рейтера, psoriатической артропатией, артропатией при язвенном колите, энтеропатическим синовитом, артропатией, ассоциированной с хламидиозной, иерсиниозной и сальмонеллезной инфекцией, спондилоартропатией, атероматозным заболеванием/артериосклерозом, атопической аллергией, аутоиммунным буллезным заболеванием, обыкновенной пузырчаткой, эксфолиативной пузырчаткой, пемфигоидом, IgA-зависимым линейным дерматозом, аутоиммунной гемолитической анемией, Кумбс-позитивной гемолитической анемией, приобретенной пернициозной анемией, ювенильной пернициозной анемией, миалгическим энцефаломиелитом/синдромом хронической усталости, хроническим кожно-слизистым кандидозом, гигантоклеточным артериитом, первичным склерозирующим гепатитом, криптогенным аутоиммунным гепатитом, синдромом приобретенного иммунодефицита, заболеваниями, связанными с синдромом приобретенного иммунодефицита, гепатитом B, гепатитом C, общим транзиторным иммунодефицитом (общей вариабельной гипогаммаглобулинемией), дилатационной кардиомиопатией, женским бесплодием, нарушением овуляции, преждевременным нарушением овуляции, легочным фиброзом, криптогенным фиброзирующим альвеолитом, поствоспалительным интерстициальным легочным склерозом, интерстициальным пневмонитом, интерстициальным заболеванием легких, ассоциированным с болезнями соединительной ткани, заболеванием легких, ассоциированным со смешанным поражением соединительной ткани, интерстициальным заболеванием легких, ассоциированным с системным склерозом, интерстициальным заболеванием легких, ассоциированным с ревматоидным

артритом, заболеванием легких, ассоциированным с системной красной волчанкой, заболеванием легких, ассоциированным с дерматомиозитом/полимиозитом, заболеванием легких, ассоциированным с синдромом Шегрена, заболеванием легких, ассоциированным с анкилозирующим спондилитом, васкулитным диффузным заболеванием легких, заболеванием легких, ассоциированным с гемосидерозом, интерстициальным заболеванием легких, индуцированным лекарственными средствами, фиброзом, радиационным фиброзом, облитерирующими бронхиолитом, хронической эозинофильной пневмонией, лимфоцитарным инфильтративным заболеванием легких, постинфекционным интерстициальным заболеванием легких подагрическим артритом, аутоиммунным гепатитом, аутоиммунным гепатитом типа 1 (классическим аутоиммунным или волчаночным гепатитом), аутоиммунным гепатитом типа 2 (гепатитом с антителами против LKM), аутоиммунно-опосредованной гипогликемией, инсулинерезистентностью типа В с папиллярно-пигментной дистрофией кожи, гипопаратиреозом, острым иммунным заболеванием, ассоциированным с трансплантацией органа, хроническим иммунным заболеванием, ассоциированным с трансплантацией органа, остеоартрозом, первичным склерозирующим холангитом, псориазом типа 1, псориазом типа 2, идиопатической лейкопенией, аутоиммунной нейтропенией, заболеванием почек NOS, гломерулонефритом, микроскопическим васкулитом почек, болезнью Лайма, дискоидной красной волчанкой, мужским бесплодием идиопатическим или NOS, аутоиммунностью спермы, рассеянным склерозом (все подтипы), симпатической офтальмиией, легочной гипертензией, вторичной относительно заболевания соединительной ткани, синдромом Гудпасчера, легочной манифестацией нодозного полиартерита, острой ревматической лихорадкой, ревматоидным спондилитом, болезнью Стилла, склеродермией, синдромом Шегрена, болезнью Такаясу/артериитом, аутоиммунной тромбоцитопенией, идиопатической тромбоцитопенией, аутоиммунным заболеванием щитовидной железы, гипертиреозом, зобным аутоиммунным гипотиреозом (болезнью Хашimoto), атрофическим аутоиммунным гипотиреозом, первичной микседемой, факогенным увеитом, первичным васкулитом, витилиго, острым заболеванием печени, хроническим заболеванием печени, алкогольным циррозом, индуцированным алкоголем повреждением печени, холестазом, идиосинкретической болезнью печени, гепатитом, индуцированным лекарственными средствами, неалкогольным стеатогепатитом, аллергией и астмой, стрептококковой инфекцией группы В (GBS), психическими расстройствами (например, депрессией и шизофренией), Th типа 2- и Th типа 1-опосредованными заболеваниями, острой и хронической болью, и раками легкого, молочной железы, желудка, мочевого пузыря, толстой кишки, поджелудочной железы, яичников, предстательной железы и прямой кишки, гемопоэтическими злокачественными новообразованиями (лейкозом и лимфомой), абеталипопротеинемией, акроцианозом, острыми и хроническими паразитарными или инфекционными процессами, острым лейкозом, острым лимфобластным лейкозом (ALL), острым миелолейкозом (AML), острой или хронической бактериальной инфекцией, острым панкреатитом, острой почечной недостаточностью, аденорактиномой, предсердными эктопическими систолами, комплексом СПИД-деменция, индуцированным алкоголем гепатитом, аллергическим конъюнктивитом, аллергическим контактным дерматитом, аллергическим ринитом, отторжением аллотрансплантата, недостаточностью альфа-1-антитрипсина, боковым амиотрофическим склерозом, анемией, стенокардией, дегенерацией клеток переднего рога спинного мозга, анти-cd3-терапией, антифосфолипидным синдромом, аллергическими реакциями на противорецепторные антитела, аневризмами аорты и

периферических сосудов, расслоением аорты, артериальной гипертензией, артериосклерозом, атриовентрикулярной fistулой, атаксией, фибрилляцией предсердий (стойкой или пароксизмальной), трепетанием предсердий, атриовентрикулярной блокадой, В-клеточной лимфомой, отторжением костного трансплантата, отторжением трансплантата костного мозга (ВМТ), блокадой ножки пучка Гиса, лимфомой Беркитта, ожогами, сердечными аритмиями, синдромом временной остановки сердца, опухолями сердца, кардиомиопатией, воспалительной реакцией при искусственном кровообращении, отторжением трансплантата хряща, дегенерациями коры мозжечка, церебеллярными нарушениями, хаотической или мультиочаговой предсердной тахикардией, ассоциированными с химиотерапией нарушениями, хроническим миелоцитарным лейкозом (CML), хроническим алкоголизмом, хроническими воспалительными патологиями, хроническим лимфоцитарным лейкозом (CLL), хронической обструктивной болезнью легких (COPD), хронической интоксикацией салицилатом, колоректальной карциномой, застойной сердечной недостаточностью, конъюнктивитом, контактным дерматитом, легочным сердцем, болезнью коронарных артерий, болезнью Крейтцфельдта-Якоба, отрицательным в культуре сепсисом, кистозным фиброзом, нарушениями, ассоциированными с терапией цитокинами, боксерской деменцией, демиелинизирующими заболеваниями, геморрагической формой лихорадки денге, дерматитом, дерматологическими состояниями, диабетом, сахарным диабетом, диабетическим атеросклеротическим заболеванием, заболеванием с диффузными тельцами Леви, дилатационной застойной кардиомиопатией, нарушениями базальных ядер головного мозга, синдромом Дауна в среднем возрасте, нарушениями движения, индуцированными лекарственными средствами, нарушениями, индуцированными лекарственными средствами, блокирующими допаминовые рецепторы ЦНС, чувствительностью к лекарственным средствам, экземой, энцефаломиелитом, эндокардитом, эндокринопатией, эпиглоттитом, инфекцией вирусом Эпштейна-Барр, эритромелалгией, экстрапирамидными и церебеллярными нарушениями, семейным гематофагоцитарным лимфоцитарным гистиоцитозом, отторжением имплантата фетального тимуса, атаксией Фридрайха, функциональными нарушениями периферических артерий, грибковым сепсисом, газовой гангреной, язвой желудка, гломерулонефритом, отторжением трансплантата любого органа или ткани, грамотрицательным сепсисом, грамположительным сепсисом, гранулемами, вызываемыми внутриклеточными организмами, волосатоклеточным лейкозом, болезнью Халлервортена-Шпатца, тиреоидитом Хашимото, сенной лихорадкой, отторжением трансплантата сердца, гемохроматозом, гемодиализом, гемолитическим уремическим синдромом/тромболитической тромбоцитопенической пурпурой, геморрагией, гепатитом (A), аритмии пучка Гиса, ВИЧ-инфекцией/ВИЧ-нейропатией, болезнью Ходжкина, гиперкинетическими нарушениями движения, реакциями гиперчувствительности, аллергическим пневмонитом, гипертензией, гипокинетическими нарушениями движения, диагностикой гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, идиопатической болезнью Аддисона, идиопатическим легочным фиброзом, антитело-опосредованной цитотоксичностью, астенией, спинально-мышечной атрофией детского возраста, воспалением аорты, гриппом A, воздействием ионизирующего излучения, иридоциклитом/uveитом/невритом зрительного нерва, повреждением вследствие ишемии-реперфузии, ишемическим инсультом, ювенильным ревматоидным артритом, ювенильной спинально-мышечной атрофией, саркомой Капоши, отторжением трансплантата почек, инфекцией микобактериями *Legionella*, лейшманиозом, проказой, повреждениями кортикоспинальной системы, жировым отеком, отторжение трансплантата печени,

лимфедемой, малярией, злокачественной лимфомой, злокачественным гистиоцитозом, злокачественной меланомой, менингитом, менингококкемией, метаболическими/идиопатическими заболеваниями, мигреню, митохондриальным мультисистемным нарушением, смешанным заболеванием соединительной ткани, моноклональной гаммопатией, множественной миеломой, множественными дегенерациями систем (болезнью Менцеля, болезнью Дежерина-Тома, синдромом Ши-Драгера и болезнью Мачадо-Жозефа), миастенией gravis, инфекцией *Mycobacterium avium intracellulare*, *Mycobacterium tuberculosis*, миелодиспластическим синдромом, инфарктом миокарда, ишемическими нарушениями миокарда, назофарингеальной карциномой, хроническим заболеванием легких новорожденных, нефритом, нефрозом, нейродегенеративными заболеваниями, нейрогенными мышечными атрофиями типа I, нейтропенической лихорадкой, неходжкинской лимфомой, окклюзией брюшной аорты и ее ветвей, окклюзивными артериальными нарушениями, okt3-терапией, орхитом/эпидидимитом, процедурами после орхита/вазэктомии, органомегалией, остеопорозом, отторжением трансплантата поджелудочной железы, карциномой поджелудочной железы, паранеопластическим синдромом/гиперкальциемией при злокачественных новообразованиях, отторжением трансплантата паразитовидной железы, воспалительным заболеванием органов таза, круглогодичным ринитом, заболеванием перикарда, атеросклеротическим заболеванием периферических сосудов, нарушениями периферических сосудов, перитонитом, пернициозной анемией, пневмоцистной пневмонией, пневмонией, синдромом POEMS (полинейропатией, органомегалией, эндокринопатией, моноклональной гаммопатией и синдромом изменения кожи), постперфузионным синдромом, постгемодиализным синдромом, синдромом постинфарктной кардиомиопатии, презклампсией, прогрессирующим супрануклеарным параличом, первичной легочной гипертензией, лучевой терапией, феноменом и болезнью Рейно, болезнью Рейно, болезнью Рефсума, регулярной тахикардией с узкими QRS, реноваскулярной гипертензией, повреждением при реперфузии, рестриктивной кардиомиопатией, саркомами, склеродермией, сенильной хореей, сенильной деменцией, ассоциированной с тельцами Леви, сероотрицательными артропатиями, шоком, серповидно-клеточной анемией, отторжением аллотрансплантата кожи, синдромом изменения кожи, отторжением трансплантата тонкой кишки, солидными опухолями, специфическими аритмиями, спинальной атаксией, спиноцеребеллярными дегенерациями, стрептококковым миозитом, структурными повреждениями мозжечка, подострым склерозирующими панэнцефалитом, обмороком, сифилисом сердечнососудистой системы, системной анафилаксией, синдромом системной воспалительной реакции, системным ювенильным ревматоидным артритом, Т-клеточным или FAB ALL, телеангиектазией, облитерирующими тромбангитом, тромбоцитопенией, токсичностью, трансплантатами, травмой/геморрагией, реакциями гиперчувствительности типа III, гиперчувствительности типа IV, нестабильной стенокардией, уремией, уросепсисом, крапивницей, пороками сердца, варикозным расширением вен, васкулитом, заболеваниями вен, тромбозом вен, фибрillяцией желудочек, вирусными и грибковыми инфекциями, энцефалитом с высоким риском смертельного исхода/асептическим менингитом, гематофагоцитарным синдромом, ассоциированным с высоким риском смертельного исхода, синдромом Вернике-Корсакова, болезнью Вильсона, отторжением ксенотрансплантата любого органа или ткани, острыми коронарными синдромами, острым идиопатическим полиневритом, острой воспалительной демиелинизирующей полирадикулонейропатией, острой ишемией, болезнью Стилла взрослых, гнездной алопецией, анафилаксией, синдромом антифосфолипидных антител, апластической анемией, артериосклерозом, атопической

экземой, атопическим дерматитом, аутоиммунным дерматитом, аутоиммунным нарушением, ассоциированным со стрептококковой инфекцией, аутоиммунной энтеропатией, аутоиммунной потерей слуха, аутоиммунным лимфопролиферативным синдромом (ALPS), аутоиммунным миокардитом, аутоиммунным преждевременным нарушением овуляции, блефаритом, бронхэкстазией, буллезным пемфигоидом, сердечно-сосудистым заболеванием, катастрофическим антифосфолипидным синдромом, глютеновой болезнью, шейным спондилезом, хронической ишемией, рубцующимся пемфигоидом, клинически изолированным синдромом (*cis*) с риском рассеянного склероза, конъюнктивитом, психиатрическим расстройством детского возраста, хронической обструктивной болезнью легких (COPD), дакриоциститом, дерматомиозитом, диабетической ретинопатией, сахарным диабетом, грыжей межпозвоночного диска, дисковым пролапсом, иммунной гемолитической анемией, индуцированной лекарственными средствами, эндокардитом, эндометриозом, эндофталмитом, эпиклеритом, полиморфной эритемой, большой полиморфной эритемой, гестационным пемфигоидом, синдромом Гийома-Барр (GBS), сенной лихорадкой, синдромом Хьюза, идиопатической болезнью Паркинсона, идиопатической интерстициальной пневмонией, IgE-опосредованной аллергией, иммунной гемолитической анемией, миозитом с тельцами включения, инфекционным воспалительным заболеванием глаз, воспалительным демиелинизирующим заболеванием, воспалительным заболеванием сердца, воспалительным заболеванием почек, IPF/UIP, иритом, кератитом, сухим кератоконъюнктивитом, болезнью Куссмауля или болезнью Куссмауля-Майера, параличом Ландри, гистиоцитозом из клеток Лангерганса, грозевидной кожей, дегенерацией желтого пятна, микроскопическим полиангиитом, болезнью Бехтерева, нарушениями моторного нейрона, пемфигоидом слизистой оболочки, полиорганной недостаточностью, миастенией *gravis*, миелодиспластическим синдромом, миокардитом, поражениями корешков нервов, нейропатией, не-А не-В гепатитом, невритом зрительного нерва, остеолизом, раком яичников, полиартрикулярным JRA, окклюзирующими заболеванием перipherических артерий (PAOD), заболеванием перipherических сосудов (PWD), заболеванием перipherических артерий (PAD), флебитом, нодозным полиартериитом (или нодозным периартериитом), полихондрией, ревматической полимиалгией, полиозом, полиартрикулярным JRA, синдромом полиэндокринной недостаточности, полимиозитом, ревматической полимиалгией (PMR), постперфузионным синдромом, первичным паркинсонизмом, раком предстательной железы и прямой кишки и гемопоэтическими злокачественными новообразованиями (лейкозом и лимфомой), простатитом, истинной эритроцитарной аплазией, первичной недостаточностью надпочечников, рецидивирующими оптикомиелитом, рестенозом, ревматическим заболеванием сердца, sapho (синовитом, акне, пустулезом, гиперостозом и остилом), склеродермиеи, вторичным амилоидозом, шоковым легким, склеритом, ишиасом, вторичной недостаточностью надпочечников, заболеванием соединительной ткани, ассоциированным с силиконом, дерматозом Снеддона-Уилкинсона, анкилозирующим спондилитом, синдромом Стивена-Джонсона (SJS), синдромом системной воспалительной реакции, височным артериитом, токсоплазмозным ретинитом, токсикологическим эпидермальным некролизом, поперечным миелитом, TRAPS (рецептор фактора некроза опухоли), аллергической реакцией типа 1, диабетом типа II, крапивницей, синдромом Хаммена-Рича (UIP), весенним конъюнктивитом, вирусным ретинитом, синдромом Фогта-Коянаги-Гарада (синдром VKH), влажной формой дегенерации желтого пятна, заживлением ран, ассоциированным с иерсиниозной и сальмонеллезной инфекцией,

где указанное введение индивидууму необязательно является парентеральным,

подкожным, внутримышечным, внутривенным, внутрисуставным, внутрибронхиальным, внутрибрюшным, внутрикапсулярным, внутрихрящевым, внутриполостным, интрацелиальным, интрацеребеллярным, интрацерровентрикулярным, введения внутрь толстой/ободочной кишки, интрацервикальным, внутрижелудочным, внутрипеченочным, интрамиокардиальным, внутрикостным, внутритазовым, интраперикардиальным, интраперитонеальным, внутриплевральным, внутрипростатического, внутрилегочным, интракретальным, интраненальным, интраперитональным, интраспинальным, интрасиновиальным, внутригрудным, внутриматочным, интравезикулярным, болюсным, вагинальным, буккальным, сублингвальным, интраназальным или трансдермальным.

17. Способ получения связывающего белка, способного связывать два антигена, включающий стадии

- а) получения первого родительского антитела или его антигенсвязывающей части, способной связывать первый антиген;
 - б) получения второго родительского антитела или его антигенсвязывающей части, способного связывать второй антиген;
 - в) конструирования полипептидной цепи или цепей по п.1; и
 - г) экспрессию полипептидной цепи или цепей;
- таким образом, что получают иммуноглобулин с двойными вариабельными доменами, способный связывать указанный первый и указанный второй антиген.

18. Способ по п.17, где Fc-область является

- (i) вариантом последовательности Fc-области; и/или
- (ii) Fc-областью из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE или IgD.

19. Способ улучшения свойства связывающего белка по п.1, где способ включает стадии

- (а) определения свойства связывающего белка до изменения;
- (б) изменения
 - (i) длины и/или последовательность $(X_1)_1$ тяжелой и/или легкой цепи, таким образом, предоставления измененной тяжелой и/или легкой цепи;
 - (ii) первой и второй полипептидных цепей, если присутствуют, таким образом, что $VD1-(X_1)n-VD2-C-(X_2)n$ изменяют на $VD2-(X_1)n-VD1-C-(X_2)n$; или
 - (iii) первой и/или второй полипептидных цепей таким образом, что изменяют последовательность только одного VD1 или VD2 тяжелой и/или легкой цепи; и
- (с) определения улучшенного свойства измененного связывающего белка, содержащего измененные тяжелые и легкие цепи; где по меньшей мере одна из тяжелой и легкой цепи содержит сайт расщепления.

20. Способ по п.19, где

- (i) свойство является связыванием с антигеном-мишенью, выходом экспрессии в клетке-хозяине, временем полужизни *in vitro*, временем полужизни *in vivo*, стабильностью, растворимостью, аффинностью, авидностью или улучшенной эффекторной функцией;
- (ii) повышают длину линкера измененной тяжелой и/или легкой цепи;
- (iii) снижают длину линкера измененной тяжелой и/или легкой цепи;
- (iv) сайт расщепления находится между по меньшей мере одним VD1 и VD2; и/или
- (v) сайт расщепления находится в по меньшей мере одном линкере.

21. Способ лечения индивидуума от заболевания или нарушения посредством введения индивидууму связывающего белка определенного в п.19 или 20, таким образом, что достигают лечения, где

- (i) по меньшей мере один из VD1 или VD2, необязательно, не связывается со своей мишенью до расщепления связывающего белка;

(ii) VD2, необязательно, не связывается со своей мишенью до расщепления связывающего белка;

(iii) VD1, необязательно, высвобождается, когда расщепляют связывающий белок; и/или

(iv) VD1 высвобождается, когда VD2 связывается со своей мишенью.

22. Связывающий белок по любому из пп.1-8 и 14, где вариабельные домены VD1 и VD2 тяжелой цепи, если присутствуют, независимо содержат три CDR из SEQ ID NO: 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76 или 78 и где вариабельные домены VD1 и VD2 легкой цепи, если присутствуют, независимо содержат три CDR из SEQ ID NO: 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77 или 79.

23. Способ определения наличия по меньшей мере одного антигена или его фрагмента в тестовом образце посредством иммунологического анализа, где иммунологический анализ включает контакт тестового образца с по меньшей мере одним связывающим белком и по меньшей мере одной детектируемой меткой, где по меньшей мере один связывающий белок содержит связывающий белок по любому из пп.1-8, 14 и 22.

24. Способ по п.23, дополнительно включающий

(i) контакт тестового образца с по меньшей мере одним связывающим белком, где связывающий белок связывается с эпитопом на антигене или его фрагменте таким образом, что образуется первый комплекс;

(ii) контакт комплекса с по меньшей мере одной детектируемой меткой, где детектируемая метка связывается со связывающим белком или эпитопом на антигене или его фрагменте, несвязанным связывающим белком, для образования второго комплекса; и

(iii) определение наличия антигена или его фрагмента в тестовом образце на основе сигнала, генерируемого детектируемой меткой во втором комплексе, где наличие антигена или его фрагмента напрямую коррелирует с сигналом, генерируемым детектируемой меткой.

25. Способ по п.23, дополнительно включающий

(i) контакт тестового образца с по меньшей мере одним связывающим белком, где связывающий белок связывается с эпитопом на антигене или его фрагменте таким образом, что образуется первый комплекс;

(ii) контакт комплекса с по меньшей мере одной детектируемой меткой, где детектируемая метка конкурирует с антигеном или его фрагментом за связывание со связывающим белком для образования второго комплекса; и

(iii) определение наличия антигена или его фрагмента в тестовом образце на основе сигнала, генерируемого детектируемой меткой во втором комплексе, где наличие антигена или его фрагмента косвенно коррелирует с сигналом, генерируемым детектируемой меткой.

26. Способ по п.23, где тестовый образец является образцом от пациента, и способ дополнительно включает диагностику, прогнозирование или оценку эффективности терапевтического/профилактического лечения пациента, и

где если способ дополнительно включает оценку эффективности терапевтического/профилактического лечения пациента, способ, необязательно, дополнительно включает модификацию терапевтического/профилактического лечения пациента, в случае необходимости улучшать эффективность.

27. Способ по п.23, где способ адаптирован для применения в автоматизированной системе или полуавтоматизированной системе.

28. Способ по п.23, где способом определяют наличие двух или более антигенов в образце.

29. Способ определения количества или концентрации антигена или его фрагмента в тестовом образце посредством иммуноанализа,

где в иммуноанализе (а) применяют по меньшей мере один связывающий белок и по меньшей мере одну детектируемую метку, и (б) иммуноанализ включает сравнение сигнала, генерируемого детектируемой меткой с контролем или калибратором, содержащим антиген или его фрагмент,

где калибратор, необязательно, является частью серии калибраторов, в которой каждый калибратор отличается от других калибраторов в серии по концентрации антигена или его фрагмента,

и где по меньшей мере один связывающий белок содержит связывающий белок по пп.1-8, 14 или 22.

30. Способ по п.29, дополнительно включающий

(i) контакт тестового образца с по меньшей мере одним связывающим белком, где связывающий белок связывается с эпитопом на антигене или его фрагменте таким образом, что образуется первый комплекс;

(ii) контакт комплекса с по меньшей мере одной детектируемой меткой, где детектируемая метка связывается со связывающим белком или эпитопом на антигене или его фрагменте, несвязанным связывающим белком, для образования второго комплекса; и

(iii) определение количества или концентрации антигена или его фрагмента в тестовом образце на основе сигнала, генерируемого детектируемой меткой во втором комплексе, где количество или концентрация антигена или его фрагмента является прямо пропорциональной сигналу, генерируемому детектируемой меткой.

31. Способ по п.29, дополнительно включающий

(i) контакт тестового образца с по меньшей мере одним связывающим белком, где связывающий белок связывается с эпитопом на антигене или его фрагменте таким образом, что образуется первый комплекс;

(ii) контакт комплекса с по меньшей мере одной детектируемой меткой, где детектируемая метка конкурирует с антигеном или его фрагментом за связывание со связывающим белком для образования второго комплекса; и

(iii) определение количества или концентрации антигена или его фрагмента в тестовом образце на основе сигнала, генерируемого детектируемой меткой во втором комплексе, где наличие антигена или его фрагмента является косвенно пропорциональным сигналу, генерируемому детектируемой меткой.

32. Способ по п.29, где тестовый образец является образцом от пациента, и способ дополнительно включает диагностику, прогнозирование или оценку эффективности терапевтического/профилактического лечения пациента, и где, если способ дополнительно включает оценку эффективности терапевтического/профилактического лечения пациента, способ, необязательно, дополнительно включает модификацию терапевтического/профилактического лечения пациента, в случае необходимости улучшать эффективность.

33. Способ по п.29, где способ адаптирован для применения в автоматической или полуавтоматической системе.

34. Способ по п.29, где способом определяют количество или концентрацию двух или более антигенов в образце.

35. Набор для анализа тестового образца на наличие, количество или концентрацию антигена или его фрагмента, указанный набор, содержащий (а) инструкции для анализа тестового образца на антиген или его фрагмент и (б) по меньшей мере один связывающий белок, содержащий связывающий белок по пп.1-8, 14 или 22.

36. Связывающий белок по п.22, где вариабельные домены VD1 и VD2 тяжелой цепи,

если присутствуют, независимо содержат SEQ ID NO: 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76 или 78, и где вариабельные домены VD1 и VD2 легкой цепи, если присутствуют, независимо содержат SEQ ID NO: 65, 67 69, 71, 73, 75, 77 или 79.

R U 2 0 1 1 1 2 7 1 9 8 A

R U 2 0 1 1 1 2 7 1 9 8 A