



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118833** (13) **C2**
(51) МПК (2019.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/00

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2014 01344**

(22) Дата подання заявки: **13.08.2012**

(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **25.03.2019**

(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **61/524,488, 1121226.3, 1121233.9, 1121236.2, PCT/EP2012/064632**

(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **17.08.2011, 12.12.2011, 12.12.2011, 12.12.2011, 25.07.2012**

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

(41) Публікація відомостей про заяву: **25.06.2014, Бюл.№ 12**

(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.03.2019, Бюл.№ 6**

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/EP2012/065782, 13.08.2012**

(72) Винахідник(и): **Ешмен Клер (GB), Берчлер Мері (US), де Вілдт Рудолф М Т (GB), Холланд Клер (US), Люїс Елан Пітер (GB), Морлі Пітер (GB), Сендел Томас (GB), Стюард Майкл (GB)**

(73) Власник(и): **ГЛАКСО ГРУП ЛІМІТЕД, 980 Great West Road, Brentford, Middlesex TW8 9GS, United Kingdom (GB)**

(74) Представник: **Крилова Надія Іванівна, реєстр. №30**

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
WO 2006129843 A2, 07.12.2006
WO 2008076257 A2, 26.06.2008
WO 2007063311 A2, 07.06.2007
WO 2009068627 A2, 04.06.2009
WO 2007063308 A2, 07.06.2007
WO 2012042026 A1, 05.04.2012
Diagnostic evaluation of a nanobody with picomolar affinity toward the protease RgpB from / Peter durand Skottrup, Paul Leonard, Jakub Zbigniew Kaczmarek et al. // Analytical biochemistry. - 2011. - Vol. 415. - No. 2. - P. 158-167
WO 2008149143 A2, 11.12.2008
Domain antibodies: proteins for therapy / Lucy J. Holt, Chris Herring, Laurent S. Jespers et al. // Trends in biotechnology. - 2003. - Vol. 21. - No. 11. - P. 484-490
WO 0029004 A1, 25.05.2000
WO 2006030220 A1, 23.03.2006
WO 2006003388 A2, 12.01.2006
WO 2007085814 A1, 02.08.2007
The immunogenicity of humanized fully human antibodies. Residual immunogenicity resides in the CDR regions / Fiona A. Harding, Marcia M. Stickler, Jennifer Razo et al. // MABS. - 2010. - Vol. 2. - No. 3. - P. 256-265
Generation of human antibody fragments against Streptococcus mutants using a phase display chain shuffling approach / Michael B. Kupper, Michael Huhn, Holger Spiegel et al. // BMC biotechnology. - 2005. - Vol. 5. - No. 1. - P. 4
Reshaping antibodies for therapy - 5. Prospects for producing non-immunogenic monoclonal antibodies / Edward G. Routledge, Scott D. Gorman, Mike Clark // Retrieved from the internet, URL: <http://www.path.cam.ac.uk/~mrc7/reshaping/index.html>, [retrieved on 12.10.2012]
Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from Escherichia coli / E. Salty Ward, Detlef Gussow, Andrew D. Griffiths et al. // Nature. - 1989. - Vol. 341. - No. 6242. - P. 544-546
Monoclonal anti-VH antibodies recognize a common VH determinant expressed on immunoglobulin heavy chains from various species / Zelig Eshhar, Orit Gigi, David Givol et al. // Eur J Immunol. - 1983. - Vol. 13. - No. 7. - P. 533-540

UA 118833 C2

(54) ОДИНИЧНИЙ ВАРІАБЕЛЬНИЙ ДОМЕН ІМУНОГЛОБУЛІНУ, ЯКИЙ ЗВ'ЯЗУЄТЬСЯ З TNFR1

(57) Реферат:

Винахід стосується одиничного варіабельного домену імуноглобуліну, який зв'язується з TNFR1 та який є вибраним з групи, що включає: одиничний варіабельний домен VH імуноглобуліну, що зв'язується з TNFR1 та має амінокислотну послідовність SEQ ID NO 1, або являє собою амінокислотну послідовність, яка є на 99,5 %, 99 %, 98 % ідентичною амінокислотній послідовності SEQ ID NO 1, та яка додатково включає модифікацію, що являє собою С-термінальне подовження, яке є амінокислотним подовженням від 1 до 5 амінокислот; та де вказане С-термінальне подовження складається з амінокислотного подовження, вибраного з (a) A (b) AS, (c) AST (d) ASTK, (e) ASTKG. Винахід також стосується рекомбінантної нуклеїнової кислоти, вектора, клітини-хазяїна, фармацевтичної композиції та пристрою для доставки, що включає зазначений одиничний варіабельний домен імуноглобуліну.

Представлений винахід стосується модифікованих протеїнів та пептидів, такі мають знижену здатність зв'язувати вже існуючі антитіла. Такі модифіковані протеїн/пептидні молекули можуть містити С-термінальні додавання, подовження або маркери та/або певні амінокислотні заміщення. Такі модифіковані протеїн/пептидні молекули (включаючи їх злиття та кон'югати)

5 можуть містити молекули, що зв'язують антиген, такі як антитіла, фрагменти антитіл, та одиничні варіабельні домени, наприклад, одиничні варіабельні домени імуноглобуліну людини (антитіло), та також одиничні варіабельні домени, що походять з нелюдських джерел, таких як лама або верблюд, наприклад, VHH, включаючи Nanobody™ (наприклад, як описано в WO 94/04678 та WO 95/04079 в тому числі). Винахід, крім того, стосується застосувань, препаратів, композицій,

10 які містять такі модифіковані С-термінально подовжені та/або амінокислотно заміщені молекули та, крім того, способів одержання та експресування даних молекул.

передумови створення винаходу:

Аутоантитіла, що зустрічаються в природі, існують у людей, які можуть зв'язуватись з протеїнами, наприклад, імуноглобулінами носія або фрагментами імуноглобуліну, наприклад,

15 ревматоїдний фактор (який зв'язує епітопи в Fc ділянці антитіл), анти-ідіотипічні аутоантитіла (які зв'язують варіабельні/CDR ділянки антитіла) та анти-шарнірні аутоантитіла (які зв'язують шарнірну ділянку константного домену Ig в Fab фрагментах).

Дані аутоантитіла можуть бути частиною поліклонального набору аутоантитіла анти-імуноглобуліну (Ig) зі специфічністю до епітопів через Ig молекулу, яка є присутньою як у людей,

20 так і у нелюдоподібних приматів. На додаток до анти-IgG аутоантитіл, які зв'язують епітопи в інтактному Fc домені (тобто ревматоїдні фактори (RF)), також спостерігалась присутність анти-ідіотипічних аутоантитіл, що зв'язуються з варіабельними CDR ділянками IgG, та анти-шарнірних антитіл, що реагують з криптичними епітопами в С-термінальних шарнірних ділянках Fab або F("Ab")₂ фрагментах. Функціональна роль даних різних анти-IgG аутоантитіл залишається невизначеною. Ревматоїдний фактор та анти-шарнірні аутоантитіла є пов'язаними з певними патологічними станами, такими як аутоімунність та певні інфекції, тоді як анти-ідіотипічні антитіла можуть надавати захист від аутоантитіл при певних аутоімунних захворюваннях. Більш того, була запропонована імунорегуляторна роль для анти-IgG аутоантитіла, де дані аутоантитіла контролюють стимуляцію аутореактивних В-клітин та

25 регулюють імунні відповіді на чужорідні антигени. Анти-шарнірні антитіла є анти-IgG аутоантитілами, які реагують з розщепленою, але не інтактною IgG. Їх висока поширеність в нормальній людській популяції є органічно пов'язаною з попереднім на IgG фрагменти, можливо, як результат розщеплення IgG бактеріальними або ендегенними протеазами.

Разом зі зв'язуванням з ендегенними протеїнами (присутніми в нативних суб'єктах)

35 аутоантитіла також можуть зв'язуватись з протеїнами або пептидами, які вводять суб'єкту для лікування. Вже існуючі антитіла, які зв'язуються з молекулами, такими як терапевтичні протеїни та пептиди, які вводять суб'єкту, можуть впливати на їх ефективність та в результаті можуть призвести до реакцій введення, гіперчутливості, зміненої клінічної відповіді при лікуванні пацієнтів, а також до зміненої біодоступності за рахунок утримання, виведення або нейтралізації молекули. Однак, в деяких випадках наявність даних антитіл може бути менш значною протягом

40 лікування лікарським засобом, ніж в інших випадках.

аутоантитіла, що зв'язують терапевтичний протеїн, та антитіла, що по-новому утворюються у відповідь на лікування лікарським засобом (таке як введення терапевтичного протеїну або пептиду) ізагальнено називають анти-медикаментозні антитіла (ADAs). Коли ADAs описуються

45 по всьому даному документу, ми посилаємось на вже існуючі ADAs, якщо спеціально не вказане інше.

VH и VL домен антитіла одержують з повних людських каркасних послідовностей та, хоча, in silico попередні оцінки описують суттєво низьку кількість потенційно імуногенних пептидів, існує можливість, що дані доменні антитіла можуть бути імуногенними у людей, тобто вони могли б

50 виявляти ADAs, та вони могли б зв'язуватися з вже існуючими ADAs в залежності від факторів, як залежних від послідовності, так і незалежних від послідовності.

Аналогічним чином, ряд одиничних dAbs, що походять з важкого ланцюга верблюда (VHH), піддають дослідженню в клінічних і, в той же час, повідомлялось, що залишається можливість зв'язування з вже існуючими ADAs без гіперчутливості або інших імунно-опосередкованих

55 побічних ефектів.

Таким чином переважним може бути забезпечення молекул для терапії, які включають протеїни або пептиди, наприклад, молекули, що зв'язують антиген, які мають знижену здатність зв'язуватися з вже існуючими ADAs, коли вводять суб'єкту, зокрема суб'єкту – людині.

Суть винаходу:

Ми продемонстрували, як описано в даному документі, що в сироватці деяких здорових нативних суб'єктів-людей є присутніми вже існуючі анти-VH аутоантитіла, які можуть зв'язувати, як VH домен антитіла, так і VHH молекули, а також анти-VL (наприклад, V каппа (VK)) аутоантитіла, які можуть зв'язувати VL молекули. Вже існуючі ADAs, які зв'язують VH dAbs є

5 подібними до анти-шарнірних антитіл тим, що вони зв'язують IgG фрагменти, але не такі самі послідовності знайдені *in situ* на інтактному IgG.

Розроблено та валідовано, як показано в даному документі, специфічний імуноаналіз для детектування анти-медикаментозного антитіла до VH dAb DOM1H-131-206 (амінокислотна послідовність показана в SEQ ID NO 1) у людей. Панель зразків сироватки від 60 здорових

10 людей - донорів скринінгували на фонову реактивність в аналізі. Визначено, що приблизно 45 % зразків сироватки від даних суб'єктів мали антитіла, що здатні бути виявленими, які були здатні зв'язуватися з DOM1H-131-206. Дана реактивність виникає специфічною до нео-епітопу, або епітопів, в VH dAb каркасній послідовності, оскільки відповідь була перехресно-реактивною з VH каркасами dAbs зв'язування різних мішенних антигенів, але не з повним IgG людини. Вже

15 існуючі ADA з VL dAbs також спостерігались в зразках сироватки від здорових людей-донорів, але менш поширені, ніж VH.

Приймаючи мутагенезний підхід, ми визначили, що модифікації до VH каркасу могли б зменшити зв'язування з даними вже існуючими ADAs. Застосовуючи даний підхід, ми картували епітоп до С-кінця VH dAb каркасу, та ми продемонстрували на прикладах ряд підходів, які

20 можуть застосовувати, щоб знизити або усунути зв'язування вже існуючі антитіла з VL, VH та VHH молекулами. Зокрема, ми показали, що важливими є модифікації, які змінюють тривимірну конформацію С-кінця dAb, зокрема С-термінального серинового залишку (тобто в Кабат положенні 113) в VH та VHH dAbs. До того ж, тривимірна конформація С-кінця dAb може бути змінена шляхом додавання додаткових амінокислотних залишків (С-термінальне подовження)

25 та/або шляхом заміщення амінокислотних залишків, присутніх в одному або більше положеннях 14, 41, 108, 110 та 112 в VH dAbs.

Представлений винахід, таким чином, передбачає модифіковані молекули, що мають знижену здатність зв'язуватися з (вже існуючими) ADAs в порівнянні з немодифікованою молекулою та є прийнятними для введення суб'єкту, наприклад, суб'єкту людини, для лікування

30 або профілактики. Під зниженою здатністю зв'язуватися мають на увазі те, що молекула зв'язується зі зниженою афінністю або зниженою авідністю з вже існуючим ADA. Такі молекули містять протеїни або пептиди, наприклад, антиген-зв'язуючі протеїни, наприклад, антитіла, фрагменти антитіл та одиничні варіабельні домени, наприклад, одиничні варіабельні домени (VH або VL) імуноглобуліну людини (антитіло), та також одиничні варіабельні домени, які походять з нелюдських джерел, таких як лама або верблюд, наприклад, VHH верблюда, включаючи Nanobody™ (описаний, наприклад, в WO 94/04678 та WO 95/04079 в тому числі). Зазначені молекули містять одну або більше модифікацій, вибраних з: (a) С-термінального додавання, подовження, делеції або мітки, та/або (b) одного або більше заміщень в амінокислотному каркасі.

35

Крім того, модифіковані молекули, описані в даному документі, та фармацевтичні композиції, що містять дані модифіковані молекули, можуть мати підвищений профіль безпеки та меншу кількість побічних ефектів, ніж немодифіковані молекули, наприклад, немодифіковані dAbs, які не містять С-термінальне подовження, додавання, делецію або мітку та/або іншу модифікацію каркасу, щоб знизити зв'язування вже існуючих ADA. Подібним чином, введення

45 модифікованих молекул, описаних в даному документі, або фармацевтичних композицій, що містять дані модифіковані молекули (які мають знижену здатність зв'язуватися зі вже існуючими ADA), може призводити до модифікованої імуногенності та може також в результаті призвести до покращення ефективності та покращення профілю безпеки, та, наприклад, може переважно застосовуватись для повторення дозування пацієнтам, у кого могли виявити аутоантитіла до немодифікованих молекул, наприклад, dAbs.

50

Таким чином, в першому аспекті винаходу передбачається:

одиничний варіабельний домен імуноглобуліну (dAb), який містить одну або більше модифікацій, вибрану з: (a) С-термінального подовження, яке включає амінокислотне подовження від однієї амінокислоти до 5 амінокислот; або (b) одного або більше заміщень в амінокислотному каркасі, де, щонайменше, одне заміщення є заміщенням, вибраним з: P14A заміщення, P41A заміщення та L108A заміщення.

55

В одному втіленні, передбачається С-термінальне подовження від одного до 4 амінокислот. В іншому втіленні зазначене С-термінальне подовження містить амінокислоту, яка є аланіном, та має знижене зв'язування зі вже існуючими ADAs в порівнянні з немодифікованим одиничним варіабельним доменом імуноглобуліну (dAb).

60

В іншому аспекті С-термінальне подовження може бути подовженням з 1-15 амінокислот, наприклад, 1-8 амінокислот або 1, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7 амінокислот. Зокрема, подовження з від 1 до 8 амінокислот, або 1, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7 амінокислот, яке містить аланіновий залишок, наприклад, одиничне аланінове подовження, або AS, AST, ASTK, ASTKG, ASTKGP

подовження. Зокрема, передбачається подовження з 1-5 амінокислот або подовження з 1-4 амінокислот. Модифікований одиничний варіабельний домен імуноглобуліну також може містити делецію амінокислоти. Одиничний варіабельний домен імуноглобуліну (dAb) може бути вибраний з VH людини, або VL dAb людини, або VHH верблюда. С-термінальне подовження може бути присутнім як безпосереднє злиття або кон'югація з С кінцем dAb.

В іншому аспекті, винахід передбачає одиничний варіабельний домен імуноглобуліну (dAb), де (i) зазначений dAb є VH людини або VHH верблюда, та зазначене С-термінальне подовження включає амінокислотне подовження, вибране з (a) A (b) AS, (c) AST (d) ASTK, (e) ASTKG (f) AAA або (g) T; та де (ii) зазначений dAb є VL людини (таке як V каппа), та зазначене С-термінальне подовження включає амінокислотне подовження, вибране з (a) AAA, (b) A (c) TV (d) T.

Винахід, крім того, передбачає одиничний варіабельний домен імуноглобуліну (dAb), який моновалентно зв'язується з мішенним антигеном, що містить:

a) три комплементарності, які визначають (CDR) ділянки специфічні для зазначеного мішенного антигену; таким чином, що зазначений dAb зв'язує зазначений антиген з КД в діапазоні від 5 мікомоль до 1 пікомоль

b) чотири каркасних (FW) ділянки; та

c) С-термінальну послідовність, що складається з послідовності VTVS(S)nX або VEIKpRqX; та необов'язково

d) одне або більше амінокислотних заміщень в положеннях 14, 41, 108, 110 або 112 в порівнянні із зародковою каркасною послідовністю людини,

де:

n представляє собою ціле число, незалежно вибране з 0 або 1;

p та q кожен представляє собою 0 або 1, таким чином, що коли p представляє собою 1, q може бути 0 або 1, та таким чином, що коли p представляє собою 0, q також представляє собою 0;

X може бути присутнім або відсутнім, та якщо присутній, то представляє собою амінокислотне подовження з від 1 до 8 амінокислотних залишків;

за додаткової умови, що якщо X відсутній;

i) n є 0 та/або dAb кінець в VTVS(S)n містить одне або більше із зазначених амінокислотних заміщень;

ii) p та/або q є 0, та/або dAb кінець в VEIKpRqX містить одне або більше із зазначених амінокислотних заміщень.

KD стосується константи рівноваги дисоціації. Кваліфікованому фахівцю буде зрозуміло, що чим менше чисельне значення КД, тим сильніше зв'язування.

В одному втіленні даного аспекту зазначений dAb зв'язує зазначений антиген з КД в діапазоні від приблизно 10 pM до приблизно 50 nM.

В одному втіленні даного аспекту, зазначений одиничний варіабельний домен імуноглобуліну (dAb) має нижчу афінність та/або авідність зв'язування для анти-медикаментозного антитіла (ADA), ніж еквівалентний dAb, де зазначений еквівалентний dAb має таку саму послідовність як i зазначений одиничний варіабельний домен імуноглобуліну, за виключенням того, що X є відсутнім, n, p та q є 1 та не існує амінокислотних заміщень.

В наступному втіленні, зазначений одиничний варіабельний домен імуноглобуліну є таким, де зазначена С-термінальна послідовність складається з послідовності VTVSSX.

В іншому втіленні зазначений одиничний варіабельний домен імуноглобуліну є таким, де зазначена С-термінальна послідовність складається з послідовності VEIKRX.

В наступному втіленні, зазначений одиничний варіабельний домен імуноглобуліну має одне або більше амінокислотних заміщень, вибраних з групи, що складається з: P14A заміщення, P41A заміщення, L108A заміщення, T110A заміщення та S112A заміщення.

В втіленні, X є присутнім, та є подовження з 1-8 амінокислот або 1, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7 амінокислот, зокрема подовження з 1-8 амінокислот, або 1, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7 амінокислот, що включає аланіновий залишок, наприклад, одиничне аланінове подовження, або AS, AST, ASTK, ASTKG, ASTKGP подовження.

В наступному втіленні, зазначений dAb є VH, або VL dAb або VHH верблюда.

В ще наступному аспекті винахід також передбачає амінокислотну послідовність, яка є будь-якоюодною з немодифікованих послідовностей одиничного варіабельного домену

імуноглобуліну (dAb), описану в даному документі (наприклад, SEQ ID NO: 1-6, 10-13), яку потім модифікують для зниження зв'язування з ADAs, як показано в даному документі, наприклад, немодифікована послідовність одиничного варіабельного домену імуноглобуліну, описана в даному документі, яку модифікують таким чином, що X є присутнім, та існує подовження з 1-8 амінокислот, зокрема подовження з 1-8 амінокислот, яке включає аланіновий залишок, наприклад, одиничне аланінове подовження, або AS, AST, ASTK, ASTKG, ASTKGP подовження, та/або зазначений одиничний варіабельний домен імуноглобуліну має одне або більше амінокислотних заміщень, де зазначене одне або більше амінокислотних заміщень вибирають з групи, що складається з P14A заміщення, P41A заміщення, L108A заміщення, T110A заміщення та S112A заміщення.

В одному втіленні винахід передбачає одиничний варіабельний домен імуноглобуліну, який є VH людини або VHH верблюда, та зазначене С-термінальне подовження включає амінокислотне подовження, вибране з: (a) AS, (b) AST (c) ASTK, (d) ASTKG, (e) AAA або (f) T, або (g) ASTKGP, та/або де існує амінокислотна делеція з dAb кінця в VTVS(S)_n та зазначена делеція є –S делецією.

В іншому втіленні винахід передбачає одиничний варіабельний домен імуноглобуліну, який є VL людини, наприклад, V каппа, та де зазначене С-термінальне подовження включає амінокислотне подовження, вибране з: (a) AAA (b) A (c) TV та (d) T, та/або де існує амінокислотна делеція з dAb кінця в VEIKR, та зазначена делеція є –R делецією.

В одному альтернативному втіленні попередніх аспектів винаходу, коли С-термінальна послідовність для VL dAb є VEIKRAAA або VEIKRT, конструктами зв'язування антигену, що містить два dAb, розділені Fc ділянкою одинарного ланцюга антитіла, де кожен dAb є здатним до зв'язування з VEGF, є виключеними.

В одному аспекті dAbs, модифікований, щоб знизити зв'язування з ADA як показано в даному документі (наприклад, VH, VL, такі як V каппа та VHH) мають КД зв'язування з ADA, яка становить 150 % або більше (наприклад, 200 %, 250 %, 300 %, 350 %, 400 %, 450 %, 500 %, 550 %, 600 %, 650 % або більше) від КД еквівалентного, але немодифікованої послідовності одиничного варіабельного домену імуноглобуліну (dAb). Крім того, передбаченим за винаходом є dAb, модифікований як показано в даному документі, щоб мати знижене ADA зв'язування, та який має знижене зв'язування з ADAs, як визначено, застосовуючи аналіз підтвердження, як описано в прикладі 2, та де зазначений модифікований dAb має середній % пригнічення сигналу, який становить менше, ніж 90 %, наприклад, менше, ніж 80 %, наприклад, менше, ніж 70 %, наприклад, менше, ніж 60 %, наприклад, менше, ніж 50 %, наприклад, менше, ніж 40 %, наприклад, менше, ніж 30 %, наприклад, менше, ніж 20 %, наприклад, менше, ніж 10 %, в порівнянні з контрольним dAb, який має приблизно 98 %-100 % пригнічення сигналу, зазначений контроль (немодифікований) dAb має таку саму або подібну послідовність, але не є модифікованим для зниження ADA зв'язування.

Представлений винахід, крім того, передбачає одиничний варіабельний домен імуноглобуліну (dAb) винаходу для застосування в способі лікування, наприклад, для застосування в способі попередження побічних ефектів. Дане застосування може бути особливо корисним, коли dAb є антагоністом мішені, наприклад, мішень вибрана з TNF α , TNF рецептору, TNF рецептору 1 (TNFR1), VEGF, IL-1R, IL-6R, IL-4, IL-5, IL-13, DC-SIGN, ASGPR, альбуміну та TGF β R2. В одному втіленні мішень є рецептором або, зокрема, рецептором, який є полімерним, або рецептором, який димеризується при активації, наприклад, TNF рецептором. В іншому втіленні dAb, модифікований як показано в даному документі таким чином, що він зменшив зв'язування з ADAs, є таким, що застосовується в режимі лікування, який включає повторне дозування.

Винахід передбачає одиничний варіабельний домен імуноглобуліну (dAb), в якому мішенню є TNFR1, та який є dAb, вибраним з будь-якої наступної амінокислотної послідовності, яку ідентифіковано як: (a) DOM1h-131-206 dAb з подовженням одиничного аланіну на С-кінці (SEQ ID NO 16); (b) DOM1h-131-206 dAb з подовженням одиничного аланіну на С-кінці та мутацією P14A каркасу (SEQ ID NO 17); (c) DOM1h-131-206 dAb з мутацією P14A каркасу (SEQ ID NO 18); (d) DOM1h-131-206 dAb з ASTKG С-термінальним подовженням (SEQ ID NO 19); та (e) DOM1h-131-206 dAb з ASTKG С-термінальним подовженням та мутацією P14A амінокислотного каркасу (SEQ ID NO 20). Винахід, крім того, передбачає (немодифікований) dAb, який є вибраним з послідовності, що є на 100 %, 99,5 %, 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 90 %, 85 % або 80 % ідентичною до будь-якої однієї з амінокислотних послідовностей, ідентифікованих як: DOM1h-131-206 (SEQ ID NO 1), DOM 1h-131-511 (SEQ ID NO 2), DOM 1h-131-202 (SEQ ID NO 3), та який додатково містить будь-яку, в тому числі, наприклад, будь-яку з модифікацій, описаних в

даному документі, яка знижує зв'язування з ADAs, наприклад, одиничне аланінове С-термінальне подовження.

dAbs за винаходом включає будь-яку одну з dAb амінокислотних послідовностей, описаних в даному документі, або що є частиною молекули, описаною в даному документі (або амінокислотною послідовністю, що є на 100 %, 99,5 %, 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 90 %, 85 % або 80 % ідентичною до такої dAb послідовності), наприклад будь-яку одну з dAbs, описаних в будь-якому з прикладів в даному документі та, яка, наприклад, містить будь-яку з модифікацій, описаних в даному документі, що знижують зв'язування з ADAs, таку як С-термінальне аланінове подовження. Винахід, крім того, охоплює будь-яку одну з молекул, описаних в даному документі (наприклад, в прикладах), що містить dAb послідовність, як описано вище, яка містить будь-яку з модифікацій, описаних в даному документі, що знижує зв'язування з ADAs, такими молекулами може бути, наприклад, будь-яка одна з Vh-Vk dAb-Fc-dAbs в прикладі 12, або будь-яка з mAbdAbs, описаних в даному документі, наприклад, в прикладах даного документу.

Таким чином, винахід передбачає анти-IL13 dAb, наприклад, dAb з амінокислотною послідовністю, що є на 100 %, 99,5 %, 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 90 %, 85 % або 80 % ідентичною до будь-якої однієї з амінокислотних послідовностей, ідентифікованих як: (a) DOM10h-53-567 (SEQ ID NO 13) або (b) DT04-H-033 (SEQ ID NO 12); та де амінокислотна послідовність додатково містить будь-яку з модифікацій, описаних в даному документі, які знижують зв'язування з ADAs, наприклад, одиничне аланінове С-термінальне подовження.

Винахід, крім того, передбачає анти-TNFR1dAb, наприклад, dAb з амінокислотною послідовністю, що є на 100 %, 99,5 %, 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 90 %, 85 % або 80 % ідентичною до будь-якої однієї з амінокислотних послідовностей, ідентифікованих як: DOM1h-574-208 (SEQ ID NO 10); та яка додатково містить будь-яку з модифікацій, описаних в даному документі, яка знижує зв'язування з ADAs, наприклад, одиничне аланінове С-термінальне подовження.

Винахід, крім того, передбачає анти-TNFR1dAb-VL злиття, наприклад з амінокислотною послідовністю, що є на 100 %, 99,5 %, 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 90 %, 85 % або 80 % ідентичною до будь-якої однієї з амінокислотних послідовностей, ідентифікованих як: DOM1h-574-208-VL злиття (SEQ ID NO 11); та яка додатково містить будь-яку з модифікацій, описаних в даному документі, яка знижує зв'язування з ADAs, наприклад, одиничне (або потрібне) аланінове подовження, присутнє на С-кінці злитої молекули.

Винахід, крім того, передбачає mAbdAb який є анти-IL13mAb: IL-4 V каппа dAb, що додатково містить будь-яку з модифікацій, описаних в даному документі, яка знижує зв'язування з ADAs; наприклад, mAbdAb може містити послідовність важкого ланцюга з амінокислотною послідовністю, що є на 100 %, 99,5 %, 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 90 %, 85 % або 80 % ідентичною до будь-якої однієї з амінокислотних послідовностей, ідентифікованих як: mAb-VL "735 молекула важкого ланцюга SEQ ID NO 30; послідовність легкого ланцюга, ідентифікована як "735 послідовність легкого ланцюга SEQ ID NO 31; та яка додатково містить будь-яку з модифікацій, описаних в даному документі, яка знижує зв'язування з ADAs, наприклад, одиничне (або потрібне) аланінове подовження.

Винахід, крім того, передбачає mAbdAb, який є анти-IL13mAb: IL-4 V каппа dAb, позначений mAb-VL 15014 модифікований, що знижує зв'язування з ADAs, як показано в даному документі, де mAbdAb містить (a) важкий ланцюг-лінкер-V каппа послідовність з амінокислотною послідовністю, що є на 100 %, 99,5 %, 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 90 %, 85 % або 80 % ідентичною до будь-якої однієї з амінокислотних послідовностей, ідентифікованих як SEQ ID NO 32; та (b) послідовність легкого ланцюга з амінокислотною послідовністю, що є на 100 %, 99,5 %, 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 90 %, 85 % або 80 % ідентичною до будь-якої однієї з амінокислотних послідовностей, ідентифікованих як SEQ ID NO 33.

Винахід, крім того, передбачає mAbdAb, який є анти-IL13mAb: IL-4 V каппа dAb, позначений mAb-VL 15019 модифікований, що знижує зв'язування з ADAs, як показано в даному документі, де mAbdAb містить (a) важкий ланцюг-лінкер-V каппа послідовність з амінокислотною послідовністю, що є на 100 %, 99,5 %, 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 90 %, 85 % або 80 % ідентичною до будь-якої однієї з амінокислотних послідовностей, ідентифікованих як SEQ ID NO 34; та (b) послідовність легкого ланцюга з амінокислотною послідовністю, що є на 100 %, 99,5 %, 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 90 %, 85 % або 80 % ідентичною до будь-якої однієї з амінокислотних послідовностей, ідентифікованих як SEQ ID NO 35.

Винахід, крім того, передбачає mAbdAb, який є анти-IL13mAb: IL-4 V каппа dAb, позначений mAb-VL 15020 модифікований, що знижує зв'язування з ADAs, як показано в даному документі, де mAbdAb містить (a) важкий ланцюг-лінкер-V каппа послідовність з амінокислотною послідовністю, що є на 100 %, 99,5 %, 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 90 %, 85 % або 80 %

ідентичною до будь-якої однієї з амінокислотних послідовностей, ідентифікованих як SEQ ID NO 36; та (b) послідовність легкого ланцюга з амінокислотною послідовністю, що є на 100 %, 99,5 %, 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 90 %, 85 % або 80 % ідентичною до будь-якої однієї з амінокислотних послідовностей, ідентифікованих як SEQ ID NO 37.

5 Винахід, крім того, передбачає mAbdAb, який є анти-IL13mAb: IL-4 V каппа dAb, позначений mAb-VL 15021 модифікований, що знижує зв'язування з ADAs, як показано в даному документі, де mAbdAb містить (a) важкий ланцюг-лінкер-V каппа послідовність з амінокислотною послідовністю, що є на 100 %, 99,5 %, 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 90 %, 85 % або 80 % ідентичною до будь-якої однієї з амінокислотних послідовностей, ідентифікованих як SEQ ID NO 10 38; та (b) послідовність легкого ланцюга з амінокислотною послідовністю, що є на 100 %, 99,5 %, 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 90 %, 85 % або 80 % ідентичною до будь-якої однієї з амінокислотних послідовностей, ідентифікованих як SEQ ID NO 39.

Винахід, крім того, передбачає VHH послідовність з будь-якою однією з модифікацій, описаних в даному документі, що знижує зв'язування з ADAs, наприклад, VHH з амінокислотною послідовністю, що є на 100 %, 99,5 %, 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 90 %, 85 % або 80 % ідентичною до будь-якої однієї з амінокислотних послідовностей, ідентифікованих як SEQ ID NO 15 7-9.

Винахід, крім того, передбачає нуклеїнові кислоти, що кодують будь-яку одну з dAbs за винаходом, наприклад, будь-яку одну з нуклеїнових кислот, описаних в даному документі, наприклад, будь-яку одну з послідовностей нуклеїнової кислоти, показану на фігурі 9 (SEQ ID NO 21-23) або фігурі 10 (SEQ ID NO 24-29). В одному втіленні винахід передбачає нуклеїнову кислоту (SEQ ID NO 22), яка кодує DOM1h-131-206 dAb з подовженням одиничного аланіну на С-кінці, вектор, що містить нуклеїнову кислоту (SEQ ID NO 22), та, крім того, передбачає клітину-господаря, наприклад, E.coli клітину-господаря, що експресує нуклеїнову кислоту (SEQ ID NO 22), або вектор, такий як Pave011 (від Fujifilm Diosynth), що експресує SEQ ID NO 22. Крім того, передбаченим є спосіб одержання DOM1h-131-206 dAb з подовженням одиничного аланіну на С-кінці, який включає збереження клітини-господаря, такої як E.coli, що містить вектор, такий як Pave011 (або нуклеїнову кислоту), що кодує нуклеїнову кислоту (SEQ ID NO 22) в умовах прийнятних для експресії подовженого dAb, тим самим продукуванню поліпептиду.

30 До того ж, dAbs за винаходом можуть бути присутніми як злиття або кон'югати з іншими молекулами.

В інших втіленнях за винаходом, описаних протягом даного розкриття, замість застосування "dAb" в злитті за винаходом, очікується, що кваліфікований отримувач може застосовувати домен, що містить CDR з dAb, що зв'язує його мішень, та каркас якого містить модифікації, як показано в даному документі, що знижують зв'язування з ADAs.

35 Крім того, передбаченими є фармацевтичні композиції, що містять dAb відповідно до будь-якого аспекту або втілення за винаходом, наприклад, в комбінації з фармацевтично або фізіологічно прийнятним носієм(ями), наповнювачем(ами) або розріджувачем(ами).

Винахід, крім того, передбачає застосування dAbs за винаходом для терапії або медицини та застосування, щоб лікувати або попереджувати захворювання або розлади. Наприклад, анти-TNFR1 dAbs зі зниженим ADA зв'язуванням, наприклад, DOM1h-131-206 dAb модифікований як показано в даному документі, щоб зменшити ADA зв'язування (наприклад, ті з амінокислотних послідовностей, що показані на фігурі 8a-8e: SEQ ID NO 16-20).

В одному аспекті винахід передбачає застосування DOM1h-131-206 dAb з С-термінальним аланіновим подовженням (SEQ ID NO 16) для використання в терапії або медицині, або як лікарський засіб, наприклад, для лікування або попередження запального захворювання або розладу, або респіраторного або пульмонального захворювання або розладу, такого як гостре пошкодження легень (ALI) та синдром гострої дихальної недостатності (ARDS) та їх ускладнень.

Винахід, крім того, передбачає нуклеїнові кислоти, що кодують dAbs за винаходом зі зниженим ADA зв'язуванням, та вектори та клітини-господарі, що містять дані нуклеїнові кислоти. Крім того, передбаченими є способи одержання dAbs за винаходом, які включають експресування кодуючих векторів та нуклеїнових кислот в клітинах-господарях, наприклад, мікробних клітинах-господарях, таких як E.coli.

55 В наступному аспекті, винахід передбачає препарати, що містять dAbs за винаходом, зі зниженим ADA зв'язування, наприклад, небулізовані препарати для пульмональної доставки. Крім того, передбаченими є небулайзери або інгаляційні пристрої, які містять dAbs за винаходом, наприклад, будь-який один з анти-TNFR1 dAbs, наприклад, той, що з амінокислотними послідовностями, показаними на фігурі 8a-8e: SEQ ID NO 16-20, наприклад DOM1h-131-206 dAb з С-термінальним аланіновим подовженням (SEQ ID NO 16).

В іншому аспекті, винахід передбачає немодифікований DOM1h-131-206 dAb (SEQ ID NO1) або DOM1h-131-206 dAb модифікований будь-якими способами, описаними в даному документі, щоб зменшити ADA зв'язування, наприклад, DOM1h-131-206 dAb з подовженням одиничного аланіну на С-кінці (SEQ ID NO 16), щоб лікувати запальний шкірний розлад, наприклад, псоріаз.

Інший аспект розкриття представляє собою спосіб лікування псоріазу у людей, що включає стадії а) виявлення людини з псоріазом; та б) введення терапевтично ефективної кількості домену антитіла (наприклад, немодифікованого DOM1h-131-206 dAb (SEQ ID NO1) або DOM1h-131-206 dAb, модифікованого будь-яким шляхом, описаним в даному документі, щоб зменшити ADA зв'язування, наприклад, DOM1h-131-206 dAb з подовженням одиничного аланіну на С-кінці (SEQ ID NO 16) з псоріатичною плямою у людей з псоріазом; за умови, що псоріаз лікують.

Інший аспект розкриття представляє собою домен антитіла для застосування в лікуванні псоріазу та також режим дозування у випадку використання домену антитіла для застосування в лікуванні псоріазу. Домен антитіла може бути немодифікованим DOM1h-131-206 dAb (SEQ ID NO1) або DOM1h-131-206 dAb, модифікованим будь-яким зі способів, описаних в даному документі, щоб зменшити ADA зв'язування, наприклад, DOM1h-131-206 dAb з подовженням одиничного аланіну на С-кінці (SEQ ID NO 16).

В наступному аспекті винахід, крім того, передбачає зонд mAb (наприклад, зонд mAb, як описано в прикладі 19 та з амінокислотною послідовністю, наведеною на фігурі 6: SEQ ID NO 14 та 15). Зонд mAb була згенерована, застосовуючи стандартну технологію мишачого моноклонального антитіла, тобто мишей імунізували DOM 1H-131-206 (SEQ ID NO1), збтрали селезінки, та генерували гібридомні клітинні лінії, гібридами, що експресують антитіло, потім клонували, та одержане в результаті антитіло виділяли та секвенсували, використовуючи стандартні способи. Зонд mAb є однією з тих, що зв'язується з VH dAb каркасом та, та таким чином, знижує зв'язування VH dAbs з ADAs. Таким чином, зонд mAb виникає, щоб зв'язати подібний епітоп на VH каркас з людським анти-VH ADA. Таким чином, зонд mAb може бути корисним, наприклад, його застосовують для випробовування модифікованого dAbs (VH, VHH,) та для визначення, які модифікації dAb попереджують або зменшують зв'язування dAb з зондом mAb. модифікації VH dAbs, які попереджують зв'язування із зондом mAb також будуть попереджувати або зменшувати зв'язування VH dAbs з ADAs. Таким чином, винахід передбачає будь-які dAbs, які є модифікованими (наприклад, будь-яку з модифікацій, описаних в даному документі), щоб попередити або зменшити зв'язування з зондом mAb. Винахід, крім того, передбачає спосіб застосування зонду mAb (наприклад, зонду mAb, описаної в прикладі 19, та з амінокислотною послідовністю, наданою в прикладі 19 та також на фігурі 6: SEQ ID NO 14 15) в аналізі дослідження dAbs, наприклад, модифікованого dAbs (наприклад (VH, VHH), наприклад, будь-які з тих, що описані в даному документі, наприклад, TNFR1 dAbs, такі як ті, що описані в даному документі) та для визначення тих, що зі зниженням зв'язування з ADAs, наприклад, в одному аспекті dAbs (наприклад (VH, VHH) є модифікованими так, що знижують зв'язування із зондом mAb, як показано в даному документі, та мають КД зв'язування із зондом mAb, який становить 150 % або більша (наприклад, 200 %, 250 %, 300 %, 350 %, 400 %, 450 %, 500 %, 550 %, 600 %, 650 % або більше) від КД еквівалентної dAb послідовності, яка не була модифікованою. Винахід, крім того, передбачає будь-які dAbs, визначені за допомогою даного скрінінг аналізу.

В наступному аспекті винахід, крім того, передбачає застосування зонду mAb (наприклад, зонду mAb, описаної в прикладі 19, та з амінокислотною послідовністю, наданою на фігурі 6: SEQ ID NO 14 та 15) в способі аналізу для кількісного визначення скільки dAb (наприклад, VH, VHH) є присутніми в зразку тканини або зразку плазми.

Короткий опис креслень:

Фігура 1: показує концентрацію вже існуючих анти-медикаментозних антитіл в сироватках панелі від здорових суб'єктів людей.

Фігура 2: показує амінокислотні послідовності немодифікованих анти-TNFR1 dAbs, визначених як (а) (немодифікований) DOM 1H-131-206 (SEQ ID NO 1) (b) (немодифікований) DOM 1H-131-511 (SEQ ID NO 2) (c) (немодифікований) DOM 1H-131-202 (SEQ ID NO 3); та VHH послідовності, визначені як (d) які є біспецифічного формату, що мають IL6R зв'язуючий модуль, зв'язаний за рахунок GGGGSGGGS зі зв'язуючим модулем альбуміну сироватки людини, як описано в WO2010100135 (SEQ ID NO 4), (e) є біспецифічного формату, що мають TNF зв'язуючий модуль, зв'язаний зі зв'язуючим модулем альбуміну сироватки, який в свою чергу, зв'язаний з TNF зв'язуючим модулем, використовуючи GGGGSGGGS як лінкер, як описано в WO2010077422 (SEQ ID NO 5), (f) є бівалентного моноспецифічного формату, що містить дві ідентичні молекули, зв'язані за рахунок Ala-Ala-Ala лінкеру, кожна молекула є dAb, який може зв'язувати A1 домен фактору фон Віллебранда, як показано в WO2009115614A2 (SEQ ID NO 6),

(g) клон VHH2(d) є біспецифічного формату, що має IL6R зв'язуючий модуль, зв'язаний за рахунок GGGGSGGGS зі зв'язуючим модулем альбуміну сироватки людини, як описано в WO2010100135, з аланіновим подовженням (SEQ ID NO 7), (h) біспецифічний формат, що має TNF зв'язуючий модуль, зв'язаний зі зв'язуючим модулем альбуміну сироватки, який в свою чергу, зв'язаний з TNF зв'язуючим модулем, використовуючи GGGGSGGGS як лінкер, як описано в WO2010077422, з аланіновим подовженням (SEQ ID NO 8), (i) бівалентний моноспецифічний формат, що містить дві ідентичні молекули, зв'язані за рахунок Ala-Ala-Ala лінкеру, кожна молекула є dAb, який може зв'язувати A1 домен фактору фон Віллебранда, як показано в WO2009115614A2, з аланіновим подовженням (SEQ ID NO 9), (j) DOM 1H-574-208 (SEQ ID NO 10), (k) DOM 1H-574-208 – VL злиття (SEQ ID NO 11), (l) DT04-H-033 (SEQ ID NO 12); (m) Dom10h-53-567 (SEQ ID NO 13).

Фігура 3: показує модель кристалічної структури DOM1H-131-206 із залишками, які підкреслюють, що впливає на ADA зв'язування під час мутування. Виконували моделювання залишків на поверхні та одержані в результаті мутації сортували в ADA аналізі щодо зв'язування зі вже існуючими ADAs (наприклад, як описано в прикладі 2). Знайдено, що залишки, позначені як 14 і "С-кінець", мають сильний вплив на ADA зв'язування під час мутування, знайдено, що залишки, позначені як 112, 110, 108 та 41 мають помірний вплив на ADA зв'язування під час мутування, та знайдено, що залишки, позначені як 13, 11, 91, 43, 44, 83 та 84 мають слабкий вплив на ADA зв'язування під час мутування.

Фігура 4: показує аброгацію зв'язування з ADAs, викликану додаванням одиничного аланінового амінокислотного залишку подовження до VHH клонів 2(d), 2(e) та 2(f).

Фігура 5: показує рівні зв'язування з ADAs та V_H dAbs або V_L dAbs, або молекулами, які містять дані dAbs.

Фігура 6a та 6b: показує амінокислотні послідовності зонду mAb (M2.3G10.1G06), фігура 6a показує послідовність легкого ланцюга (SEQ ID NO 14); та фігура 6b показує послідовність важкого ланцюга. CDRs показані підкресленими на фігурі (SEQ ID NO 15).

Фігура 7: показує сигнал конкурентного аналізу (х-вісь) в присутності зразків сироватки від суб'єктів з цілим рядом вже існуючого анти-VH ADA сигналу. Сироватка від ряду людей-донорів з вже існуючими анти-VH ada конкурує з анти-VH mAb M2.3G10.1G06 щодо зв'язування з DOM 1H-131-206, що в результаті призводить до інгібування сигналу конкурентного аналізу.

Фігура 8: показує амінокислотні послідовності модифікованих TNFR1 dAbs, ідентифікованих як: (a) DOM1h-131-206 dAb з подовженням одиничного аланіну (SEQ ID NO 16); (b) DOM1h-131-206 dAb з подовженням одиничного аланіну та P14A каркасною мутацією (SEQ ID NO 17); (c) DOM1h-131-206 dAb з P14A каркасною мутацією (SEQ ID NO 18); (d) DOM1h-131-206 dAb з ASTKG С-термінальним подовженням (SEQ ID NO 19); та (e) DOM1h-131-206 dAb з ASTKG С-термінальним подовженням та P14A каркасною мутацією (SEQ ID NO 20).

Фігура 9: показує послідовності нуклеїнової кислоти TNFR1 dAbs (a) DOM1h-131-206 dAb (SEQ ID NO 21), (b) DOM1h-131-206 dAb з подовженням одиничного аланіну на С-кінці (SEQ ID NO 22), (c) DOM1h-131-206 dAb з С-термінальним подовженням ASTKG (SEQ ID NO 23).

Фігура 10: показує послідовності нуклеїнової кислоти, що кодують (a) VHH послідовність, що має амінокислотну послідовність, показану на фігурі 2d (SEQ ID NO 24); (b) VHH послідовність, що має амінокислотну послідовність, показану на фігурі 2e (SEQ ID NO 25); (c) VHH послідовність, що має амінокислотну послідовність, показану на фігурі 2f (SEQ ID NO 26), (d) VHH послідовність, яка є біспецифічного формату, що має IL6R зв'язуючий модуль, зв'язаний за рахунок GGGGSGGGS зі зв'язуючим модулем альбуміну сироватки людини з подовженням одиничного аланіну (SEQ ID NO 27), (e) VHH послідовність з амінокислотною послідовністю, показаною в 2e, що додатково містить подовження одиничного аланіну (SEQ ID NO 28), (f) VHH послідовність з амінокислотною послідовністю, показаною в 2f, що додатково містить подовження одиничного аланіну (SEQ ID NO 29).

Фігура 11: показує амінокислотні послідовності mAb:VL dAbs (IL-13mAb: IL-4Vкаппа dAb молекули): (a) mAb-VL "735 молекула (IL-13mAb: IL-4Vкаппа dAb) (SEQ ID NO 30 та 31), (b) mAb-VL 150154 (SEQ ID NO 32 та 33), (c) mAb-VL 15019 (SEQ ID NO 34 та 35), (d) mAb-VL 15020 (SEQ ID NO 36 та 37), (e) mAb-VL 15021 (SEQ ID NO 38 та 39).

Фігура 12: показує амінокислотні послідовності (a) DMS30045: DOM15-26-597 dAb N-(VEPKSSDK лінкер) та С-термінальний K-044-085 dAb ((TGLDSP)x4) (SEQ ID NO 40), (b) DMS30046: DMS1576 з С-термінальним K-044-085 dAb ((TGLDSP)x4) (SEQ ID NO 41), (c) DMS30047 (містить модифікований С-кінець): DOM15-26-597 dAb N-(VEPKSSDK лінкер) та С-термінальний K-044-085 dAb мінус С-термінальний R ((TGLDSP)x4) (SEQ ID NO 42), (d) DMS30048 (містить модифікований С-кінець): DOM15-26-597 dAb N-(VEPKSSDK лінкер) та С-термінальний K-044-085 dAb+A ((TGLDSP)x4) (SEQ ID NO 43), (e) DMS30049 (містить

модифікований С-кінець): DOM15-26-597 dAb N-(VEPKSSDK лінкер) та С-термінальний K-044-085 dAb+AAA ((TGLDSP)x4) (SEQ ID NO 44), (f) DMS30050 (містить модифікований С-кінець): DOM15-26-597 dAb N-(VEPKSSDK лінкер) та С-термінальний K-044-085 dAb+T ((TGLDSP)x4) (SEQ ID NO 45), (g) DMS30051 (містить модифікований С-кінець): DMS1576 з С-термінальним K-044-085 dAb мінус С-термінальний R ((TGLDSP)x4) (SEQ ID NO 46), (h) DMS30052 (містить модифікований С-кінець): DMS1576 з С-термінальним K-044-085 dAb+A ((TGLDSP)x4) (SEQ ID NO 47), (i) DMS30053 (містить модифікований С-кінець): DMS1576 з С-термінальним K-044-085 dAb+AAA ((TGLDSP)x4) (SEQ ID NO 48), (j) DMS30054 (містить модифікований С-кінець): DMS1576 з С-термінальним K-044-085 dAb+T ((TGLDSP)x4) (SEQ ID NO 49).

Детальний опис ВІНАХОДу:

В межах даного опису винахід описується з посиланням на варіанти втілення, в певному сенсі, що забезпечує можливість чіткого та конкретного викладення опису. Мається на увазі та слід приймати до уваги, що варіанти втілення можуть по-різному поєднуватись або розмежовуватись без відокремлення від винаходу.

Якщо не зазначене інше, всі технічні та наукові терміни, які використовують в даному документі, мають ті самі значення, як зазвичай розуміється кваліфікованим фахівцем в даній галузі (наприклад, в клітинних культурах, молекулярній генетиці, хімії нуклеїнових кислот, способах гібридизації та біохімії). Стандартні методики застосовують для молекулярних, генетичних та біохімічних способів (дивись в основному, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. та Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology (1999) 4th Ed, John Wiley & Sons, Inc. які є включеними в даний документ у вигляді посилання) та хімічних способів.

Афінність представляє собою силу зв'язування однієї молекули, наприклад, антиген-зв'язуючого протеїну за винаходом, з іншою, наприклад, його мішенним антигеном, в одиничному сайті зв'язування. Афінність зв'язування антиген-зв'язуючого протеїну з його мішеннями може бути визначена, використовуючи стандартні рівноважні способи (наприклад, твердофазний імуоферментний аналіз (ELISA) або радіоімуноаналіз (RIA)), або кінетики (наприклад, BIACORE™ аналіз).

Термін "епітоп", як використовується в даному документі, має на увазі, що частина антигену, яка встановлює контакт з конкретним доменом зв'язування антиген-зв'язуючого протеїну, наприклад, dAb. Епітоп може бути лінійним або конформаційним/переривчастим. Конформаційний або переривчастий епітоп містить амінокислотні залишки, які є відокремленими іншими послідовностями, тобто не в безперервній послідовності в первинній послідовності антигену. Хоча залишки можуть бути з різних ділянок пептидного ланцюга, вони знаходяться в безпосередній близькості в тривимірній структурі антигену. У випадку мультимерних антигенів, конформаційний або переривчастий епітоп може включати залишки з різних пептидних ланцюгів. Конкретні залишки, включені в епітоп, можуть визначатись, використовуючи програми комп'ютерного моделювання або через тривимірні структури, одержані за допомогою способів, відомих в даній галузі з рівня техніки, таких як рентгенівська кристалографія.

Кон'югат dAb стосується композиції, яка містить dAb, з яким додаткова молекула є хімічно кон'югованою за рахунок ковалентного або нековалентного зв'язку, переважно ковалентного зв'язку. Такий ковалентний зв'язок міг бути безпосереднім пептидним зв'язком або іншими способами, такими як із застосуванням модифікованого бічного ланцюга. Нековалентне зв'язування може бути прямим (наприклад, електростатична взаємодія, гідрофобна взаємодія) або непрямим (наприклад, через нековалентне зв'язування комплементарних зв'язуючих партнерів (наприклад, біотин та авідин), де один партнер є ковалентно зв'язаним з лікарським засобом, та комплементарний зв'язуючий партнер є ковалентно зв'язаним з dAb™). Коли застосовують комплементарні зв'язуючі партнери, один з партнерів зв'язування може бути ковалентно зв'язаним безпосередньо з лікарським засобом або через прийнятний лінкерний фрагмент, та комплементарний зв'язуючий партнер може бути ковалентно зв'язаним з dAb™ безпосередньо або через прийнятний лінкерний фрагмент.

Як використовується в даному документі, dAb злиття стосується злитого протеїну, який містить dAb та поліпептидний лікарський засіб. dAb та поліпептидний лікарський засіб є присутніми як дискретні частини (фрагменти) одиничного безперервного поліпептидного ланцюга.

Як використовується в даному документі "фрагмент, " коли використовується по відношенню до поліпептиду, є поліпептидом, що має амінокислотну послідовність, яка є такою ж як частина, але не вся амінокислотна послідовність всього поліпептиду, що зустрічається в природі. Фрагменти можуть бути "самостійними" або включеними в більший поліпептид, з якого вони

утворюють частину або ділянку, як одиничну безперервну ділянку в одиничному більшому поліпептиді.

Як використовується в даному документі, термін mAbdAb стосується моноклонального антитіла, зв'язаного з додатковим доменом зв'язування, зокрема одиничним варіабельним доменом, таким як домен антитіла. mAbdAb має, щонайменше, два антиген-зв'язуючих сайти, щонайменше, один з яких є з домену антитіла, та щонайменше, один зі спареного VH/VL домену. Такі mAbdAbs описані, наприклад, в WO 2009/068649.

Як використовується в даному документі, "пептид" стосується від приблизно двох до приблизно 50 амінокислот, які є зв'язаними разом за рахунок пептидних зв'язків. Як використовується в даному документі, "поліпептид" або "протеїн" стосується, щонайменше, приблизно 50 амінокислот, які є зв'язаними разом пептидними зв'язками. Поліпептиди та протеїни, як правило, містять четвиртинну структуру та згини в функціональних доменах.

Як використовується в даному документі, термін "Fc ділянка одинарного ланцюга антитіла" стосується Fc ділянки одинарного важкого ланцюга IgG, такого як IgG1, IgG2, IgG3, iGG4 або IgG4PE, або IgA антитіла. Fc ділянка одинарного важкого ланцюга може містити один або більше з CH1, CH2 та CH3 доменів константної ділянки антитіла, наприклад, всі три домени константні ділянки антитіла або тільки CH2 та CH3 домени. На додаток до включення одного або більше з CH1, CH2 та CH3 доменів константної ділянки антитіла, Fc ділянка одинарного важкого ланцюга антитіла може додатково містити шарнірну ділянку антитіла (таку ділянку, як правило, знаходять між CH1 та CH2 доменами).

Як використовується в даному документі, "функціональний" описує поліпептид або пептид, який має біологічну активність, таку як активність специфічного зв'язування. Наприклад, термін "функціональний поліпептид" включає антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент, що зв'язує мішенний антиген за рахунок його антиген-зв'язуючого сайту.

Як використовується в даному документі, "мішенний ліганд" стосується ліганду, який специфічно або селективно зв'язується поліпептидом або пептидом. Наприклад, коли поліпептид є антитілом, його антиген-зв'язуючим фрагментом або одиничним варіабельним доменом імуноглобуліну, мішенний ліганд може бути будь-яким потрібним антигеном або епітопом. Зв'язування з мішенним антигеном залежить від поліпептиду або пептиду, який є функціональним.

Як використовується в даному документі антитіло стосується IgG, IgM, IgA, IgD або IgE або фрагменту (такого як Fab, F(ab')₂, Fv, дисульфідний зв'язаний Fv, scFv, замкнуте конформаційне мультиспецифічне антитіло, дисульфід-зв'язаний scFv, діатіло), який або отриманий з будь-яких видів антитіла, що продукується в природі, або створені за ДНК рекомбінантною технологією; або виділений з сироватки, В-клітин, гібридом, трансфектом, дріжджів або бактерій.

Вираз "одиничний варіабельний домен імуноглобуліну" стосується варіабельного домену антитіла (VH, VHH, VL), що специфічно зв'язує антиген або епітоп незалежно від інших V ділянок або доменів. одиничний варіабельний домен імуноглобуліну може бути присутнім в форматі (наприклад, гомо- або гетеро-мультимер) з іншими варіабельними ділянками або варіабельними доменами, де інші ділянки або домени не вимагають зв'язування антигену за рахунок одиничного варіабельного домену імуноглобуліну (тобто, де одиничний варіабельний домен імуноглобуліну зв'язує антиген незалежно від додаткових варіабельних доменів). "домен антитіла" або "dAb" є тим самим, що й "одиничний варіабельний домен імуноглобуліну" як термін, що використовують в даному документі. "одиничний варіабельний домен імуноглобуліну" є тим самим, що й "варіабельний одиничний домен імуноглобуліну" як термін, що використовують в даному документі. "одиничний варіабельний домен антитіла" є тим самим, що й "одиничний варіабельний домен імуноглобуліну" як термін, що використовують в даному документі. Одиничний варіабельний домен імуноглобуліну є, в одному втіленні, варіабельним доменом антитіла людини, але також включає одиничний варіабельний домен антитіл з інших видів, таких як VHH dAbs гризуна (наприклад, як розкрито в WO 00/29004, зміст якого є включеним в даний документ у вигляді посилання в повному об'ємі), вусатої акули-няньки та верблюда. VHH верблюда є одиничним варіабельним доменом імуноглобуліну поліпептидів, що походять з видів, включаючи верблюда, лам, альпака, дромадера та гуанако, який продукує важкий ланцюг антитіла природно позбавлений легких ланцюгів. VHH може бути гуманізованим. Крім того, в межах представленого винаходу знаходяться dAbs людини, які були модифікованими таким чином, що є не повністю людськими, наприклад, содифікації, які зроблені, щоб зменшити агрегацію, включаючи мутацію тих самих залишків, які є мотивами верблюда.

Немодифікований одиничний варіабельний домен імуноглобуліну (тобто немодифікований dAb), наприклад, dAb, що зв'язує мішень, містить три ділянки, які визначають комплементарність (CDRs), в каркасній структурі. Приймаючи до уваги той факт, що в генетиці V ділянка імуноглобулінових ланцюгів, що зустрічаються в природі, обмежує на початку CDR3, із залишком CDR3, який забезпечується D та J ділянками (призводячі в результаті до V-D-J злиття), за призначенням представленого винаходу dAb включає всі CDR3 та завершує в каркасі 4 залишок на його С-кінці. VH dAb завершує в залишках LVTVSS на його С-кінці. VHH dAb завершує в залишках VTVSS на його С-кінці. VL dAb завершує в VEIKR на його С-кінці.

"модифікований dAb" є dAb, як показано в даному документі, який додатково має модифікацію, яка змінює тривимірну конформацію dAb С-кінця. модифікований dAb включає dAb, який містить С-термінальні додавання, подовження або мітки та/або певні амінокислотні заміщення, як розкрито в даному документі.

Представлений винахід, крім того, передбачає одиничний варіабельний домен імуноглобуліну (або молекули, що містять dAb, наприклад, mAbdAb), як описано вище, який має нижчу афінність та/або авідність зв'язування (наприклад, який має КД зв'язування з ADA, що становить 150 % або більше (наприклад, 200 %, 250 %, 300 %, 350 %, 400 %, 450 %, 500 %, 550 %, 600 %, 650 % або більше КД еквівалентної послідовності) для анти-медикаментозного антитіла, ніж еквівалентного dAb (або молекули, що містить dAb), де еквівалентний dAb має таку саму послідовність за виключенням того, що X є відсутнім, n, p та q є 1, та не існує мутацій каркасу. Під цим мається на увазі, що dAb, наприклад, DOM 1H-131-206 (SEQ ID NO 1), коли потім модифікований таким чином, що подовжується, щоб містити X, наприклад, С-термінальне одиничне аланінове подовження, або модифікують, щоб видалити С-термінальний серин, або модифікують шляхом заміщення в каркасі одного або більше залишків 14, 41, 108, 110 та/або 112 (або будь-яка комбінація з таких модифікацій), зв'язується з анти-медикаментозним антитілом (ADA) з нижчою афінністю та/або авідністю зв'язування, ніж DOM 1H-131-206 (SEQ ID NO 1) без будь-яких таких модифікацій. Це може бути визначено, використовуючи поверхневий плазмонний резонанс, наприклад, на Biacore TM, використовуючи стандартні методики. Кваліфікованому фахівцю буде зрозуміло, що чим нижче значення КД, тим сильніше зв'язування.

Крім того, передбаченими за винаходом є dAb, модифікований як показано в даному документі, щоб мати знижений ADA зв'язування, та який має знижене зв'язування з ADAs як визначено, використовуючи аналіз підтвердження, як описано в прикладі 2, та де зазначений модифікований dAb має середній % інгібування сигналу, який становить менше, ніж 90 %, наприклад, менше ніж 80 %, наприклад, менше ніж 70 %, наприклад, менше ніж 60 %, наприклад, менше ніж 50 %, наприклад, менше ніж 40 %, наприклад, менше ніж 30 %, наприклад, менше ніж 20 %, наприклад, менше ніж 10 %, в порівнянні з контрольним dAb, який має приблизно 98 %-100 % інгібування сигналу, зазначений контрольний (немодифікований) dAb має таку саму або подібну послідовність, але не є модифікованим для зниження ADA зв'язування.

Вже існуючий ADA є ADA, вже присутнім у суб'єкта, якому слід вводити лікарський засіб. Вже існуючий ADA може бути присутнім у "наївного" суб'єкта (тобто суб'єкта, якому ніколи раніше не вводили лікарський засіб).

"домен" є протеїном складчастої структури, який має третинну структура незалежно від решти протеїну. Як правило, домени несуть відповідальність за дискретні функціональні властивості протеїнів, та в багатьох випадках можуть бути доданими, видаленими або перенесеними іншим протеїнам без втрати функції залишка протеїну та/або домену. "одиничний варіабельний домен антитіла" є складчатим поліпептидним доменом, що містить характеристичні послідовності варіабельних доменів антитіл. Внаслідок цього, він включає повний варіабельний домен антитіл та модифіковані варіабельні домени, наприклад, в яких один або більше петльових фрагментів заміщені на послідовності, які не є характеристичними варіабельного домену антитіл, або варіабельний домен антитіл, які є усіченими або містять N- або С-термінальні подовження, а також складчасті фрагменти варіабельних доменів, які зберігають, щонайменше активність зв'язування та специфічність повнодовжинного домену.

Як використовується в даному документі, термін "доза" стосується кількості злиття або кон'югату, який вводять суб'єкту всю в один час (одинична доза), або в два або більше введення протягом визначеного інтервалу часу. Наприклад, доза може стосуватися кількості злиття або кон'югату, введеного суб'єкту протягом курсу одного дня (24 годин) (денна доза), двох днів, одного тижня, двох тижнів, трьох тижнів або одного, або більше місяців (наприклад, шляхом одноразового введення, або шляхом двох або більше введення). Інтервал між дозами може становити будь-яку потрібну кількість часу.

"Моновалентний" означає зв'язування з одним епітопом.

Вираз, "період напіввиведення, " стосується часу потрібного для зниження на 50 % концентрації злиття або кон'югату в сироватці або плазмі, *in vivo*, наприклад, завдяки розкладанню та/або кліренсу, або секвестрації за природними механізмами. Композиції за винаходом стабілізують *in vivo* та їх період напіввиведення зростає за рахунок зв'язування з молекулами альбуміну сироватки, наприклад, альбуміну сироватки людини (HSA), що протидіє розкладанню та/або кліренсу, або секвестрації. Дані молекули альбуміну сироватки є протеїнами, що зустрічаються в природі, які самі по собі мають довгий період напіввиведення *in vivo*. Період напіввиведення молекули підвищується, якщо її функціональна активність зберігається, *in vivo*, протягом більш довгого періоду, ніж подібної молекули, яка не є специфічною протягом періоду напіввиведення збільшення молекули.

Як використовується в даному документі, "гідродинамічний розмір" стосується видимого розміру молекули (наприклад, молекули протеїну, ліганду), ґрунтуючись на дифузії молекули крізь водний розчин. Дифузію, або рух, протеїну крізь розчин можуть піддавати процесу, щоб одержати видимий розмір протеїну, де розмір надають в "радіусах Стокса" або "гідродинамічних радіусах" частинки протеїну. "Гідродинамічний розмір" протеїну залежить як від маси, так і від форми (конформації), таким чином, що два протеїни, які мають однакову молекулярну масу, можуть мати різні гідродинамічні розміри, ґрунтуючись на загальній конформації протеїну.

Розрахунки "гомологічності", або "ідентичності", або "подібності" між двома послідовностями (в даному документі терміни використовують взаємозамінно) виконують як наводиться далі. Послідовності вирівнюють з метою оптимального порівняння (наприклад, гепи можуть бути введені в один або обидва з першої та другої амінокислотної послідовності або послідовності нуклеїнової кислоти для оптимального вирівнювання та негомологічні послідовності можуть не прийматися до уваги для цілей порівняння). У варіанті втілення, довжина еталонної послідовності, яку вирівнюють для цілей порівняння, становить, щонайменше 30 %, або щонайменше 40 %, або щонайменше 50 %, або щонайменше 60 %, або щонайменше 70 %, 80 %, 90 %, 100 % довжини еталонної послідовності. Потім порівнюють амінокислотні залишки або нуклеотиди у відповідних амінокислотних положеннях або нуклеотидних положеннях. Коли положення в першій послідовності займає той самий амінокислотний залишок або нуклеотид, як і відповідне положення в другій послідовності, тоді молекули є ідентичними в такому положенні (як використовується в даному документі "гомологічність" амінокислоти або нуклеїнової кислоти є еквівалентною "ідентичності" амінокислоти або нуклеїнової кислоти). Відсоток ідентичності між двома послідовностями є функцією кількості ідентичних положень, що приймають участь в послідовності, приймаючи до уваги кількість гепів, та довжину кожного гепу, який необхідно ввести для оптимального вирівнювання двох послідовностей. Вирівнювання та гомологічність, подібність або ідентичність амінокислотної та нуклеотидної послідовності, як визначено в даному документі, може бути отримана та визначена, використовуючи алгоритм BLAST 2 послідовності, використовуючи значення параметрів за замовчуванням (Tatusova, T. A. et al., FEMS Microbiol Lett, 174:187-188 (1999)).

Винахід стосується виділених та/або рекомбінантних нуклеїнових кислот, що кодують композиції за винаходом, які є описаними в даному документі.

Нуклеїнові кислоти, які в даному документі називають як "виділений", є нуклеїновими кислотами, які відокремили від іншого матеріалу (наприклад, інші нуклеїнові кислоти, такі як геномна ДНК, кДНК та/або РНК) в його вихідному навколишньому середовищі (наприклад, в клітинах або в суміші нуклеїнових кислот, таких як бібліотека). Виділена нуклеїнова кислота може бути виділена, як частина вектору (наприклад, плазмід).

Нуклеїнові кислоти, які в даному документі називають як "рекомбінантні", є нуклеїновими кислотами, які одержували, використовуючи рекомбінантну ДНК методологію, включаючи способи, які ґрунтуються на штучній рекомбінації, такий як клонування в вектор або хромосому, використовуючи, наприклад, реструкційні ферменти, гомологічну рекомбінацію, віруси та подібне, та нуклеїнові кислоти одержують, використовуючи полімеразну ланцюгову реакцію (PCR).

Винахід, крім того, стосується рекомбінантної клітини-господаря, наприклад, ссавців або мікробної, яка містить (одну або більше) рекомбінантну нуклеїнову кислоту або конструкт експресії, що містить нуклеїнову(і) кислоту(и), що кодують композицію за винаходом, як показано в даному документі, наприклад, dAb модифікований щодо зниження зв'язування з ADAs. Крім того, передбачається спосіб одержання композиції за винаходом, як показано в даному документі, який включає збереження рекомбінантної клітини-господаря, наприклад, ссавців або мікробної, за винаходом в умовах прийнятних для експресії злитого поліпептиду. Спосіб додатково може включати стадію виділення або відновлення злиття, якщо потрібно.

Наприклад, молекула нуклеїнової кислоти (тобто, одна або більше молекул нуклеїнової кислоти), що кодує молекулу за винаходом, може бути введеною в прийнятну клітину-господар, щоб створити рекомбінантну клітину-господар, використовуючи будь-який спосіб, прийнятний для вибраної клітини-господаря (наприклад, трансформація, трансфекція, електропорація, інфекція), таким чином, що молекула(и) нуклеїнової кислоти є функціонально зв'язаними з одним або більше контрольними елементами експресії (наприклад, в векторі, в створеному конструкті, використовуючи процеси в клітині, інтегрованій в геном клітини-господаря). Одержану в результаті рекомбінантну клітину-господар можуть зберігати в умовах прийнятних для експресії (наприклад, в присутності індуктора, в прийнятній тварині, в прийнятному культуральному середовищі, доповненому прийнятними солями, факторами росту, антибіотиками, поживними добавками, тощо), тим самим одержують кодований пептид або поліпептид. Якщо потрібно, кодований пептид або поліпептид може бути виділений або відновленим (наприклад, з тварини, клітини-господаря, середовища, молока). Даний процес охоплює експресію в клітині-господарі трансгенної тварини (дивись, наприклад, WO 92/03918, GenPharm International).

Молекули за винаходом, як показано в даному документі, також можуть одержувати в прийнятній *in vitro* експресійній системі, наприклад, шляхом хімічного синтезу або, використовуючи будь-який інший прийнятний спосіб.

Як описано та проілюстровано в даному документі, молекули за винаходом, як правило, зв'язуються з їх мішенними лігандами з високою афінністю.

Молекули за винаходом, наприклад, модифікований dAbs зі зниженим зв'язуванням з ADAs, можуть бути експресовані в *E. coli* або в *Pichia species* (наприклад, *P. pastoris*). В одному втіленні, dAb секретуються в *E. coli* або в *Pichia species* (наприклад, *P. pastoris*); або в клітинній культурі ссавців (наприклад CHO, або HEK 293 клітинах). Хоча, молекули, описані в даному документі, можуть бути секретованими, коли експресовані в *E. coli*, або в *Pichia species*, або клітинах ссавців, їх можуть отримувати, використовуючи будь-який прийнятний спосіб, такий як способи хімічного синтезу або способи біологічного продукування, які не застосовують види *E. coli* або *Pichia*. У варіанті втілення нуклеїнова кислота, що кодує dAbs за винаходом, наприклад, TNFR1 dAbs, описані в даному документі, може бути клонована в прийнятному векторі експресії, наприклад, Pave011 (від Fujifilm Diosynth) та потім експресована в мікробному векторі, такому як *E. coli*.

В одному втіленні винаходу dAb, наприклад, VH, VL або VHH, може бути модифікованим, щоб попередити зв'язування з ADAs, таким чином, що модифікація включає присутність тегу на C-кінці. Даний тег може бути присутнім, як злиття або кон'югат з молекулою. Тег може бути будь-яким тегом, відомим в даній галузі з рівня техніки, наприклад, тегами афінності, такими як тус-теги, FLAG-теги, his-теги, хімічною модифікацією, такою як ПЕГ, або доменами протеїну, такими як Fc домен антитіла. Зокрема, представлений винахід передбачає молекулу за винаходом, подовжену тегом, хімічною модифікацією або доменом протеїну для застосування в способі зниження побічних ефектів, як додатково визначено в даному документі.

В іншому втіленні винахід, крім того, передбачає молекулу, наприклад, dAb (такий як VH, або VL, або VHH), що містить модифікований каркас, що зменшує вже існуючі ADA зв'язування, наприклад, dAb (такі як VHH, VH або VL), що містить амінокислотне заміщення в будь-якому одному з положень 14, 41, 108, 110 або 112. Наприклад, дані заміщення можуть бути однією або більше модифікаціями, вибраними з: P14A, P14K, P14Q, P14T, P41A, L108A, L108 Q, T110A та S112A.

В одному аспекті даного втілення dAb (наприклад, VHH, VH або VL) містить одну або більше модифікацій, вибрану з: P14A, P14K, P14Q, P14T, P41A, L108A, T110A та S112A; та може додатково містити будь-яке з C-термінальних подовжень, додавань, делецій або тегів, як описано вище.

В одному втіленні dAb (наприклад, VHH, VH або VL), який містить одну або більше модифікацій, вибрану з: P14A, P14K, P14Q, P14T P41A, L108A, T110A та S112A, також містить амінокислотне подовження на C-кінці dAb, який вибирають з: (a) аланіну, або (b) амінокислотної послідовності, що містить або складається з подовження, вибраного з: AS, AST, ASTK, ASTKG або ASTKGP. Додатково, dAb молекули, описані в даному документі, та фармацевтичні композиції, які містять дані молекули, можуть бути корисними в попередженні або зниженні побічних ефектів. Зв'язування анти-медикаментозного антитіла з dAb може призвести до двох dAbs, які є реалізованими. За деяких обставин, це може призвести до проблем безпеки. Наприклад, якщо мішень dAb є рецептором або полімерною мішенню, реалізація разом двох dAbs може вводити в дію дві мішені разом. Це може призвести до неочікуваних фармакологічних ефектів, наприклад, агонізм замість антагонізму, наприклад, за рахунок

димеризації рецептору. Таким чином, представлений винахід передбачає застосування молекули за винаходом в способі попередження побічних ефектів. Під попередженням розуміють, що застосування молекули за винаходом повністю або частково анулює зв'язування вже існуючих анти-медикаментозних антитіл у порівнянні з еквівалентною молекулою, яка не була модифікованою. Зниження зв'язування ADAs призводить до зниження рівня небажаних фармакологічних ефектів. Таким чином, молекули за винаходом можуть мати підвищений профіль безпеки та менші побічні ефекти, ніж немодифіковані молекули, наприклад, немодифіковані dAbs, які не містять С-термінальне подовження, додавання, делецію або тег та/або іншу каркасну модифікацію, щоб знизити вже існуючі ADA зв'язування. Аналогічним чином, введення модифікованих молекул, описаних в даному документі, або фармацевтичних композицій, що містять дані модифіковані молекули (які знизили здатність зв'язуватися з вже існуючим ADA), може призвести до модифікованої імуногенності, це відбувається тому що, коли немодифіковані молекули зв'язуються з ADAs, вони утворюють імунні комплекси, та такі імунні комплекси потім могли б генерувати імунну відповідь. Крім того, введення модифікованих молекул, описаних в даному документі, або фармацевтичних композицій, що містять дані модифіковані молекули, також можуть призвести в результаті до покращеної ефективності та покращеного профілю безпеки та, наприклад, можуть бути переважно застосовані для повторного дозування пацієнтам, у кого могли бути виявлені аутоантитіла до немодифікованих молекул. До того ж, dAb молекули за винаходом є здатними до того, щоб бути введені контингенту пацієнтів без необхідності проведення попереднього скринінгу щодо титрів ADA, щоб виявити суб'єктів ризику небажаної реакції. В контексті застосування молекул щодо попередження побічних ефектів, представлений винахід передбачає також застосування одиничного варіабельного домену імуноглобуліну, як визначено в даному документі, в якому X заміщують на Y, де Y вибирають з групи, що складається з: тегу, такого як тег афінності, тус-тег, FLAG-тег або his-тег, хімічної модифікації, такої як ПЕГ-група, або протеїну, такого як Fc частина антитіла.

Представлений винахід, крім того, передбачає спосіб попередження або зниження побічних ефектів в режимі лікування шляхом введення молекул за винаходом, або молекул за винаходом, в яких X заміщений на Y, як визначено вище. Крім того, передбаченим є спосіб модифікування молекули, як показано в даному документі, щоб зменшити її зв'язування з ADAs та зменшити побічні ефекти.

Винахід, крім того, передбачає композиції, які містять модифіковані молекули, як показано в даному документі, наприклад, композиції, що містять модифікований VHH, VH або VL. Такі композиції можуть містити модифіковані молекули, присутні як злиття або кон'югат з іншими молекулами, наприклад, іншими протеїнами, молекулами антитіла або фрагментами антитіл. Наприклад, dAb може бути присутнім, як форматований dAb (наприклад, dAb може бути присутнім як dAb-fc злиття або кон'югат, як описано в, наприклад, WO 2008/149148) або він може бути присутнім як mAbdAb (як описано в WO 2009/068649) або dAb є присутнім як злиття або кон'югат з протеїнами або поліпептидами з подовженим періодом напіввиведення, наприклад, наступний dAb, наприклад, dAb, який зв'язується з альбуміном сироватки (AlbudAb™) або, наприклад, з поліетиленгліколем ПЕГ або додатковими терапевтичними або активними молекулами. В даному варіанті втілення терапевтична(і) молекула(и), коли присутні як злиття або кон'югат з dAb (наприклад, VHH, VH або VL) можуть бути зв'язані з або С-термінальним подовженням dAb або N-кінцем dAb. В одному втіленні одна або більше терапевтичних молекул є присутніми як злиття (або кон'югат) на N-кінці dAb.

В одному втіленні, dAbs за винаходом (та також молекули, що містять dAbs, такі як mAbdAbs, які також є частиною винаходу), які зменшують здатність зв'язувати ADAs зв'язування з мішенним лігандом з високою афінністю, наприклад, вони можуть мати КД як виміряно за допомогою поверхневого плазмонного резонансу, використовуючи Biacore™ від приблизно 5 мікромолей до приблизно 1 пМ, наприклад від приблизно 500 нМ до приблизно 10 пМ, наприклад, приблизно 200 нМ до приблизно 10рМ, наприклад 50нМ до приблизно 10 пМ, наприклад, приблизно 10 нМ до приблизно 10-30 пМ, наприклад, вона можуть бути TNFR1 dAb зі зниженим зв'язування з ADAs, та та яка має КД приблизно 10-30 пМ, наприклад, приблизно 20 пМ.

У варіанті втілення dAbs за винаходом (та також молекули, які містять dAbs, такі як mAbdAbs, які також є частиною винаходу), які мають знижену здатність щодо зв'язування ADAs, можуть мати рівні експресії, які становлять, щонайменше, 3 %, наприклад, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % з тих що показані dAb такої самої або подібної амінокислотної послідовності, які не є модифікованими, як показано в даному документі, що

знижує зв'язування з ADAs. В наступному втіленні молекули за винаходом (наприклад dAbs та молекули, що містять dAbs, такі як mAbdAbs), які мають знижену здатність щодо зв'язування ADAs, можуть мати рівні експресії, щонайменше, 0,1 г/літр.

У варіанті втілення dAbs за винаходом (та також молекули, які містять dAbs, такі як mAbdAbs, які також є частиною винаходу), які мають знижену здатність щодо зв'язування ADAs, мають КД зв'язування з їх мішенним антигеном, яка є приблизно в 50 разів вищою (або більше) (тобто dAbs є в 50 разів менш сильним), наприклад, в приблизно 40 разів вищою, приблизно 30 разів вищою, приблизно 20 разів вищою, приблизно 10 разів вищою, приблизно 5 разів вищою, приблизно 4 разів вищою, ніж КД dAb тієї самої або подібної амінокислотної послідовності, яка не є модифікованою, як показано в даному документі, що знижує зв'язування з ADAs. У варіанті втілення dAbs за винаходом (та також молекули, які містять dAbs, такі як mAbdAbs, які також є частиною винаходу), які мають знижену здатність щодо зв'язування ADAs, мають КД з їх мішенним антигеном, яка є по суті такою ж (наприклад, від приблизно в 2 рази вищою до 2 рази нижчою) або більше, ніж в 2 рази нижчою, ніж КД dAb тієї самої або подібної амінокислотної послідовності, яка не є модифікованою, як показано в даному документі, що знижує зв'язування з ADAs.

Винахід, крім того, стосується застосування, формуляції, композицій, які містять такі С-термінально подовжені та/або модифіковані молекули, та також способів одержання та експресії даних молекул.

У варіанті втілення винахід передбачає dAb (VH, VL, або VHH), який має будь-яку з С-термінальних модифікацій, як описано вище, та який зв'язується з мішенню, що вибирають з: TNF α , TNFR1, VEGF, IL-1R, IL-6R, IL-4, IL-5, IL-13, DC-SIGN, ASGPR, альбуміну та TGF β R2.

В одному втіленні винахід передбачає dAb, який є описаним або розкритим в будь-якому одному з: WO 2007/049017 (наприклад, анти-TNFR1 dAb, що називається 2H-131-511, або dAb, який є, щонайменше, на 80 % ідентичним до даного (наприклад, на 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 % ідентичний), WO 2008/149144 (наприклад, анти-TNFR1 dAb, вибраний з: 1h-131-201, 1h-131-202, 1h-131-203, 1h-131-204, 1h-131-205, або dAb, який є, щонайменше на 80 % ідентичним до даного (наприклад на 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 % ідентичний) та WO 2008/149148 (зміст яких є однозначно включеними в даний документ як посилання), наприклад будь-який один з анти-TNFR1 dAbs, зазначених там; та де dAb додатково містить, щонайменше, одну з модифікацій, описаних в даному документі, щоб зменшити афінність та/або авідність зв'язування з ADAs, наприклад, будь-яку одну з С-термінальних модифікацій, як описано вище, та/або будь-яке одне з амінокислотних заміщень та/або делецій, як описано вище.

В іншому втіленні винахід передбачає немодифікований dAb, який є описаним або розкритим в будь-якому одному з WO 2007/049017, WO 2008/149144 та WO 2008/149148 (наприклад, будь-який один з dAb послідовностей, описаних вище), та де dAb потім модифікують, щоб включити одну або більше каркасних модифікацій, наприклад, вибраних з: P14A, P14K, P14Q, P14T P41A, L108A, T110A та S112A каркасних мутацій, та які можуть також додатково необов'язково містити будь-яку з С-термінальних модифікацій, описаних в даному документі. В одному прикладі немодифікований dAb може бути будь-якою однією з анти-TNFR1dAb послідовностей, описаних або розкритих в будь-якому одному з WO 2007/049017, WO 2008/149144 та WO 2008/149148. У варіанті втілення немодифікована анти-TNFR1 dAb послідовність може бути однією з тих, що є, щонайменше, на 80 % (наприклад, на 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 %) ідентичною до dAb послідовності, визначеної як або DOM1h-131-206 (розкрита в WO 2008/149148), DOM 1h-131-511 (розкрита в WO 2007/049017 та 2008/149144) та DOM 1h-131-202 (розкрита в WO 2008/149144).

В іншому втіленні винахід передбачає VEGF dAb, який є описаним або розкритим в WO 2008/149147, наприклад, dAb, який називається 15-26-593 (амінокислотна послідовність показана на фігурі 5 WO 2008/149147), (зміст яких є однозначно включеними в даний документ як посилання), та де dAb додатково містить будь-яку одну з модифікацій, описаних в даному документі, щоб зменшити афінність та/або авідність зв'язування з ADAs, наприклад, будь-яку одну з С-термінальних модифікацій, як описано вище, та/або будь-яке одне з амінокислотних заміщень та/або делецій, як описано вище.

Немодифіковані dAb амінокислотні послідовності є наступними:

(a) DOM 1H-131-206 EVQLLES GGG L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F A H E T M V W V R Q A P G K G L E W V S H I P P D G Q D P F Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y H C A L L P K R G P W F D Y W G Q G T L V T V S S
(SEQ ID NO 1)

(b) DOM 1H-131-511 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAHETMVWVRQAPGKGLE
WVSHIPPDGQDPFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCALLPKRGPWFDYWGGQ
TLVTVSS

(SEQ ID NO 2)

5 (c) DOM 1H-131-202 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAHETMVWVRQAPGKGLEWV
SHIPPDGQDPFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCALLPKRGPWFDYWGGQTL
VTVSS

(SEQ ID NO 3)

(d) VHH клон 2(d):

10 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSVFKINVMWYRQAPGKGRELVAGIISGGSTSYADSVK
GRFTISRДHKKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAFITTESDYDLGRRYWGGQTLVTVSSGGGGSGGGG
EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVK
GRFTISRДHKKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSSQGTLVTVSS

(SEQ ID NO 4)

15 (e) VHH клон 2(e):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDS
VKGRFTISRДHKKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCARSPSGFNRGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLV
ESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTIS
РДHKKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSSQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQ
20 PGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTISRДHKKNTLY
LQMNSLRPEDTAVYYCARSPSGFNRGQGTTLVTVSS

(SEQ ID NO 5)

(f) VHH клон 2(f)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA AISRTGGSTYYPDS
25 VEGRTISRДHKKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSSA
AAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA AISRTGGSTYYPDS
VEGRTISRДHKKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQGTQVTVSS

(SEQ ID NO 6)

30 В іншому втіленні винахід передбачає модифікований VHH dAb, вибраний з наступних
послідовностей:

(a) VHH клон 2(d)+A:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSVFKINVMWYRQAPGKGRELVAGIISGGSTS
YADSVKGRFTISRДHKKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAFITTESDYDLGRRYWGGQTLVTVSSGGGG
SGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLY
35 ADSVKGRFTISRДHKKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSSQGTLVTVSSA

(SEQ ID NO 7)

(b) VHH клон 2(e)+A:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSEINTN
GLITKYPDSVKGRFTISRДHKKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCARSPSGFNRGQGTTLVTVSSGGGGSG
40 GGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYAD
SVKGRFTISRДHKKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSSQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLV
ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYPDSVKGRFTIS
РДHKKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCARSPSGFNRGQGTTLVTVSSA

(SEQ ID NO 8)

45 (c) VHH клон 2(f)+A

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA AISRTG
GSTYYPDSVEGRTISRДHKKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQ
TQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA AISRTG
GSTYYPDSVEGRTISRДHKKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQ
50 TQVTVSSA

(SEQ ID NO 9)

В іншому втіленні винахід передбачає модифікований DOM1h-131-206 dAb, який зв'язується
з TNFR1 та який є вибраним з наступних амінокислотних послідовностей:

(a) DOM1h-131-206 dAb з подовженням одиничного аланіну на C-кінці:

55 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAHETMVWVRQAPGKGLEWVSHIPPDGQDPFYADS
VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYHCALLPKRGPWFDYWGGQGTTLVTVSSA

(SEQ ID NO 16)

(b) DOM1h-131-206 dAb з подовженням одиничного аланіну та P14A каркасною мутацією:

60 EVQLLESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFAHETMVWVRQAPGKGLEWVSHIPPDGQDPFYADS
VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYHCALLPKRGPWFDYWGGQGTTLVTVSSA

(SEQ ID NO 17)

(c) DOM1h-131-206 dAb з P14A каркасною мутацією:

EVQLLESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFAHETMVWVRQAPGKGLEWVSHIPPDGQDPFYADS
VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYHCALLPKRGPWFDYWGQGTLVTVSS

5 (SEQ ID NO 18)

(d) DOM1h-131-206 dAb з ASTKG C-термінальним подовженням

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAHETMVWVRQAPGKGLEWVSHIPPDGQDPFYADS
VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYHCALLPKRGPWFDYWGQGTLVTVSSASTKG

(SEQ ID NO 19)

10 (e) DOM1h-131-206 dAb з ASTKG C-термінальним подовженням та P14A каркасною мутацією

EVQLLESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFAHETMVWVRQAPGKGLEWVSHIPPDGQDPFYADS
VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYHCALLPKRGPWFDYWGQGTLVTVSSASTKG

(SEQ ID NO 20)

15 Винахід, крім того, передбачає нуклеїнові кислоти, що кодують молекули, описані в даному документі, наприклад, нуклеїнові кислоти, що кодують анти-TNFR1 dAbs, описаний вище. Крім того, передбаченими є клітини-господарі, наприклад, неембріональні клітини-господарі, наприклад, прокаріотичні або еукаріотичні клітини-господарі, такий як *E. coli* або дріжджові клітини-господарі або клітини ссавців, що містять дані нуклеїнові кислоти.

20 Винахід додатково передбачає dAb, який має знижене зв'язування з ADA в сироватках людини (наприклад не зв'язується з вже існуючими ADA в сироватках людини), та де епітоп на dAb, з якими ADA зв'язується, маскується (тобто епітоп більше не є доступним до зв'язування з ADA як, наприклад, він є накритий або маскований іншою молекулою, таки чином попереджуючи зв'язування, або його стерична конформація є зміненою, таки чином попереджуючи зв'язування). Епітоп на dAb може бути маскований будь-якою з модифікацій, описаних в даному документі, щоб зменшити ADA зв'язування, наприклад, додаванням хімічної структури до C-кінця dAb або каркасними заміщеннями або делеціями, як показано в даному документі. хімічні структури, додані до C-кінця dAb, можуть бути подовженням (наприклад, амінокислотним подовженням), або тегом, або він може бути хімічною модифікацією, такою як

25 пегілюванням або амідуванням. Модифікація до C-кінця може бути, однією з тих, яка або безпосередньо, або опосередковано змінює конформацію епітопу на dAb, який зв'язується з ADAs, таким чином знижуючи здатність dAb зв'язуватися з ADAs.

Кваліфікованому фахівцю буде зрозуміло, що в результаті одержання молекули, як показано в даному документі, наприклад, dAb, зокрема, що залежить від клітинної лінії, яку застосовують, та конкретної амінокислотної послідовності молекули, наприклад, dAb, можуть відбуватися пост-трансляційні модифікації. Наприклад, це може включати розщеплення певних лідерних послідовностей, додавання різних цукрових фрагментів в різні системи глікозилювання та фосфорилування, деамідування, окиснення, скремблювання дисульфідного зв'язку, ізомеризацію, обрізання C-термінального лізину та циклізацію N-термінального глутаміну.

40 Представлений винахід охоплює застосування таких молекул, наприклад dAbs, які піддавали, або представляли, одній або більше пост-трансляційним модифікаціям. Таким чином, dAb за винаходом включає dAb, який піддавали пост-трансляційній модифікації, такий як описана далі: відомо, що глікозилювання антитіл в збережених положеннях в їх константних ділянках має сильний ефект на функцію антитіла, особливо на функціонування ефектору, дивись, наприклад, Boyd et al. (1996) Mol. Immunol. 32: 1311-1318. Розглядаються варіанти глікозилювання антиген-зв'язуючих протеїнів за винаходом, в яких додають, заміщують, видаляють або модифікують один або більше вуглеводневий фрагмент. Введення аспарагін-X-серин або аспарагін-X-треонін мотиву створює потенційний сайт для ферментного приєднання вуглеводневих фрагментів та може, в наслідок цього, застосовуватись, щоб маніпулювати глікозилюванням антитіла. У Raju et al. (2001) Biochemistry 40: 8868-8876 термінальне сіалювання TNFR-IgG імуноадгезину підвищувалось через процес регалактозилювання та/або ресіалілювання, використовуючи бета-1,4-галактозилтрансферазу та/або альфа, 2,3 сіалілтрансферазу. Вважається, що зростання термінального сіалілювання підвищує період напіввиведення імуноглобуліну. Антитіла, подібно до більшості глікопротеїнів, як правило, одержують як суміш глікоформ. Дана суміш, зокрема, є очевидною, коли антитіла одержують в еукаріотичних клітинах, а саме клітинах ссавців. Ряд способів розроблено для виробництва визначених глікоформ, дивись Zhang et al. (2004) Science 303: 371; Sears et al. (2001) Science 291: 2344; Wacker et al. (2002) Science 298: 1790; Davis et al. (2002) Chem. Rev. 102: 579; Hang et al. (2001) Acc. Chem. Res 34: 727. Антитіла (наприклад, IgG ізотипу, наприклад, IgG1) як описано в даному документі можуть містити визначену кількість

60 (наприклад, 7 або менше, наприклад, 5 або менше, стільки як дві або одну) глікоформ;

Деамідування є ферментативною реакцією, в першу чергу, перетворення аспарагіну (N) в ізо-аспарагінову кислоту та аспарагінову кислоту (D) у співвідношенні приблизно 3:1. У значно меншому ступені, деамідування може відбуватися з глутаміновими залишками за подібним способом. Деамідування в CDR в результаті призводить до зміни в заряді молекули, але, як правило, в результаті не призводить ні до зміни в антигенному зв'язування, ні не впливає на PK/PD; Окиснення може відбуватися під час одержання та зберігання (тобто в присутності окиснюючих умов) та в результаті призводить до ковалентної модифікації протеїну, викликаной або безпосередньо активними формами кисню, або опосередковано реакцією з вторинними побічними продуктами оксидативного стресу. Окиснення відбувається, в першу чергу, з метіоніновими залишками, але іноді можуть відбуватися в триптофані та вільних цистеїнових залишках; скремблювання дисульфідного зв'язку може відбуватися під час одержання та умов основного зберігання. За певних обставин, дисульфідні зв'язки можуть розриватися або утворюватися некоректно, одержуючі в результаті неспарені цистеїнові залишки (-SH). Дані вільні (неспарені) сульфгідрили (-SH) можуть сприяти перемішуванню; Ізомеризація, як правило, відбувається під час одержання, очистки та зберігання (при кислих pH) та, зазвичай, відбувається, коли аспарагінова кислота перетворюється в ізо-аспарагінову кислоту за рахунок хімічного процесу; є підстави вважати, що N-термінальний глутамін у важкому ланцюгу та/або легкому ланцюгу утворює піроглутамат (pGlu). Утворення більшості pGlu відбувається в біореакторі одержання, але він може утворюватися неферментним шляхом, в залежності від pH та температури процесу та умов зберігання. Утворення pGlu розглядається як один з принципових шляхів розкладання для рекомбінантного mAbs; обрізання C-термінального лізину є ферментативною реакцією, яка каталізується карбоксипептидазами, та, зазвичай, спостерігається у рекомбінантних mAbs. Варіанти даного процесу включають видалення лізину з одного або обох важких ланцюгів. Очевидно, що обрізання лізину не впливає на біоактивність та не впливає на функцію mAb ефектору.

Винахід, крім того, передбачає спосіб продукування молекули за представленим винаходом, що містить амінокислотне подовження, присутнє як безпосереднє злиття, де спосіб включає збереження клітини-господаря, такої як та, що описана вище, що містить рекомбінантну нуклеїнову кислоту та/або конструкт, що кодує злиття за винаходом за умов прийнятних до експресії зазначеної рекомбінантної нуклеїнової кислоти, за яким одержують злиття.

Винахід, крім того, передбачає фармацевтичні композиції, що містять модифіковані молекули за винаходом. Винахід, крім того, передбачає фармацевтичну композицію за винаходом для застосування в медицині, наприклад, для застосування в лікуванні або попередженні, наприклад, захворювання, або стану, або розладу, та яке включає введення зазначеному індивідууму терапевтично ефективної кількості фармацевтичної композиції за винаходом. Як правило, молекули за винаходом будуть застосовувати в очищеній формі разом з фармакологічно або фізіологічно прийнятними носіями. Зазвичай, дані носії можуть включати водні або спиртово-водні розчини, емульсії або суспензії, будь-які, включаючи сольові та/або буферні середовища. Парентеральні носії можуть включати розчин хлориду натрію, декстрозу Рінгера, декстрозу та хлорид натрію, та лактатний розчин Рінгера. Відповідні фізіологічно прийнятні ад'юванти, які, якщо необхідно, утримують поліпептидний комплекс в суспензії, можуть вибирати з загущувачів, таких як карбоксиметилцелюлоза, полі вінілпіролідон, желатин та альгірати. Внутрішньовенні носії включають рідину та поживні добавки та електролітні наповнювачі, такі як ті, що ґрунтуються на декстрозі Рінгера. Консерванти та добавки, такі як протимікробні речовини, антиоксиданти, хелатуючі агенти та інертні гази, також можуть бути присутніми (Mack (1982) Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Edition). Ряд прийнятних препаратів можуть застосовувати, включаючи препарати з подовженим вивільненням.

Винахід, крім того, передбачає спосіб лікування (терапевтично або профілактично) пацієнта або суб'єкта, який має захворювання або розлад, такий як той, що описаний в даному документі, та який включає введення зазначеному індивідууму терапевтично ефективної кількості фармацевтичної композиції за винаходом.

Фармацевтичні композиції за винаходом можуть вводити самостійно або в комбінації з іншими молекулами або фрагментами, наприклад, поліпептидами, терапевтичними протеїнами та/або молекулами (наприклад, іншими протеїнами (включаючи антитіла), пептидами або лікарськими засобами з малою молекулою).

Винахід, крім того, передбачає фармацевтичні композиції за винаходом, що містять анти-TNFR1 VH або VL dAbs, модифіковані як показано в даному документі, наприклад, ті анти-TNFR1 VH або VL dAbs, які описані в даному документі, або домени анти-TNFR1 VHH, модифіковані як показано в даному документі, для застосування в лікуванні запальних захворювань або розладів, наприклад, псоріазу, артрити, розсіяного склерозу, запального

захворювання кишечника, наприклад, захворювання Крона та неспецифічного виразкового коліту; або, наприклад, респіраторного або пульмонального захворювання або розлади, наприклад, вибраного з: хронічного обструктивного захворювання легень, хронічного бронхіту, хронічного обструктивного бронхіту та емфіземи, запалення легень, хронічного обструктивного захворювання легень, астми, пневмонії, гіперчутливого пневмоніту, інфільтрату легень, що супроводжується еозинофілією, захворювання легень, зумовленого умовами навколишнього середовища, пневмонії, бронхоектазу, фіброзно-кістозної дегенерації, інтерстиціального захворювання легень, первинної легеневої гіпертензії, легеневої тромбоемболії, розладів плеври, розладів середостіння, розладів діафрагми, гіповентиляції, гіпервентиляції, апное сну, синдрому гострої дихальної недостатності, мезотеліоми, саркоми, відторгнення трансплантата, реакції "трансплантат проти господаря", раку легень, алергічного риніту, алергії, асбестозу, аспергіломи, аспергільозу, бронхоектазу, хронічного бронхіту, емфіземи, еозинофільної пневмонії, ідіопатичного легеневого фіброзу, інвазивного пневмококового захворювання, грипу, нетуберкульозної мікобактерії, ексудативного плевриту, пневмоконіозу, пневмоцитозу, пневмонії, актиномікозу легень, легеневого альвеолярного протеїнозу, легеневої форми сибірської виразки, набряку легень, легеневої емболії, запалення легень, легеневого гістіоцитозу Х, легеневої гіпертензії, легеневого норкадіозу, сухот легень, легеневого оклюзійного захворювання вен, ревматоїдного захворювання легень, саркоїдозу та гранулематозу Вегенера та гострого пошкодження легень (ALI), та також синдрому гострої дихальної недостатності (ARDS), та їх ускладнень, таких як гостра ниркова недостатність. Винахід, крім того, передбачає застосування фармацевтичної композиції за винаходом, що містить анти-TNFR1 dAbs (VH, VL або VHH), модифікований як показано в даному документі, у виробництві лікарського засобу для лікування будь-яких конкретних захворювань або розладів, описаних вище.

Винахід, крім того, стосується застосування будь-якої з композицій, описаних в даному документі для застосування в терапії, діагностиці або профілактиці будь-якого із запальних захворювань, або розладів, або респіраторних або пульмональних захворювань або розладів, як описано вище. Винахід, крім того, стосується профілактичного застосування будь-якої з композицій, описаних в даному документі, що попереджують або полегшують будь-яке із запальних захворювань або розладів, або респіраторних або пульмональних захворювань або розладів, описаних вище.

Композиції, що містять анти-TNFR1 dAbs, як показано в даному документі, наприклад, DOM 1H-131-206 з С-термінальним аланіновим подовженням, можуть вводити для профілактичного та/або терапевтичного лікування та вводять як "терапевтично-ефективну дозу". Кількості необхідні для досягнення даного дозування будуть залежати від важкості захворювання та загального стану власної імунної системи пацієнта, але загалом діапазон становить від 0,005 до 5,0 мг dAb на кілограм маси, з дозами від 0,05 до 2,0 мг/кг/дозу, яку застосовують більш загалом. Для профілактичних застосувань, подібні або дещо нижчі дозування, що попереджують, інгібують або призупиняють початок захворювання (наприклад, для підтримання ремісії або неактивності, або щоб попередити активну фазу), можуть застосовувати. Кваліфікований клініцист буде здатний визначити відповідний інтервал дозування для лікування, пригнічення або попередження захворювання. Коли вводять анти- TNFR1 dAb, як показано в даному документі, для лікування, пригнічення або попередження хронічного запального захворювання, то його можуть вводити аж до чотирьох разів на день, двічі на тиждень, один раз на тиждень, один раз кожні два тижні, один раз на місяць або один раз кожні два місяці, в дозуванні, наприклад, від приблизно 10 мкг/кг до приблизно 80 мг/кг, від приблизно 100 мкг/кг до приблизно 80 мг/кг, від приблизно 1 мг/кг до приблизно 80 мг/кг, від приблизно 1 мг/кг до приблизно 70 мг/кг, від приблизно 1 мг/кг до приблизно 60 мг/кг, від приблизно 1 мг/кг до приблизно 50 мг/кг, від приблизно 1 мг/кг до приблизно 40 мг/кг, від приблизно 1 мг/кг до приблизно 30 мг/кг, від приблизно 1 мг/кг до приблизно 20 мг/кг, від приблизно 1 мг/кг до приблизно 10 мг/кг, від приблизно 10 мкг/кг до приблизно 10 мг/кг, від приблизно 10 мкг/кг до приблизно 5 мг/кг, від приблизно 10 мкг/кг до приблизно 2,5 мг/кг, приблизно 1 мг/кг, приблизно 2 мг/кг, приблизно 3 мг/кг, приблизно 4 мг/кг, приблизно 5 мг/кг, приблизно 6 мг/кг, приблизно 7 мг/кг, приблизно 8 мг/кг, приблизно 9 мг/кг або приблизно 10 мг/кг. В конкретних втіленнях, анти-TNFR1 dAb можуть вводити для лікування, пригнічення або попередження хронічного запального захворювання один раз кожні два тижні або один раз на місяць в дозі від приблизно 10 мкг/кг до приблизно 10 мг/кг (наприклад, приблизно 10 мкг/кг, приблизно 100 мкг/кг, приблизно 1 мг/кг, приблизно 2 мг/кг, приблизно 3 мг/кг, приблизно 4 мг/кг, приблизно 5 мг/кг, приблизно 6 мг/кг, приблизно 7 мг/кг, приблизно 8 мг/кг, приблизно 9 мг/кг або приблизно 10 мг/кг.)

Лікування або терапію, яку проводять, використовуючи композиції описані в даному документі, вважають "ефективним", якщо один або більше симптомів або ознак знижується або полегшується (наприклад, на, щонайменше, 10 % або, щонайменше, на одну точку по клінічній шкалі оцінці стану), в порівнянні з такими симптомами, присутніми до лікування, або в порівнянні з такими симптомами у індивідуума (людини або модельної тварини), якого не лікували такою композицією, або іншим прийнятним контролем. Симптоми будуть безумовно варіювати в залежності від точної природи цільового захворювання або розладу, але можуть визначатися звичайним кваліфікованим клініцистом або техніком.

Подібним чином, профілактика, яку проводять, використовуючи композицію, як показано в даному документі, є "ефективною", якщо початок або важкість одного або більше симптомів або ознак затримується, знижується або ліквідується по відношенню до таких симптомів у подібного індивідуума (людини або модельної тварини), якого не лікували такою композицією.

Молекули за винаходом можуть додатково формувати, щоб мати більший гідродинамічний розмір, щоб, крім того, подовжити період напіввиведення, наприклад, шляхом приєднання ПЕГ групи, альбуміну сироватки, трансферин, рецептору трансферину або, щонайменше, його трансферин-зв'язуючої частини, Fc ділянки антитіла, або шляхом кон'югації з доменом антитіла. Наприклад, dAb, який зв'язує альбумін сироватки, може бути форматований як більший антиген-зв'язуючий фрагмент антитіла (наприклад, форматований як Fab, Fab", F(ab)₂, F(ab")₂, IgG, scFv).

В певних втіленнях, винахід передбачає композицію відповідно до винаходу, яка містить подвійно-специфічний ліганд або мульти-специфічний ліганд, що містить перший dAb, який є модифікованим відповідно до винаходу, наприклад, шляхом C-термінального подовження та/або шляхом P14A каркасної мутації, та другий dAb, який має таку саму або відмінну специфічність зв'язування з першим dAb та, необов'язково, у випадку мульти-специфічних лігандів, додаткові dAbs. Другий dAb (або додаткові dAbs) можуть, необов'язково, зв'язувати різні мішені та можуть, необов'язково, крім того, містити C-термінальне подовження та/або P14A каркасну мутацію відповідно до винаходу.

В одному аспекті, винахід передбачає молекули та композиції за винаходом для доставки шляхом парентерального введення, наприклад, шляхом підшкірної, внутрішньом'язової або внутрішньовенної ін'єкції; інгаляційної, назальної доставки, трансмукозальної доставки, пероральної доставки, доставки до шлунково-кишкового тракту пацієнта, ректальної доставки або очної доставки. В одному аспекті, винахід передбачає застосування молекул та композицій за винаходом у виробництві лікарського засобу для доставки шляхом підшкірної ін'єкції, інгаляційної, внутрішньовенної доставки, назальної доставки, трансмукозальної доставки, пероральної доставки, доставки до шлунково-кишкового тракту пацієнта, ректальної доставки, трансдермальної або очної доставки.

В одному аспекті, винахід передбачає спосіб доставки пацієнту шляхом підшкірної ін'єкції, пульмональної доставки, внутрішньовенної доставки, назальної доставки, трансмукозальної доставки, пероральної доставки, доставки до шлунково-кишкового тракту пацієнта, ректальної або очної доставки, де спосіб включає введення пацієнту фармацевтично ефективної кількості молекули за винаходом.

В одному аспекті, винахід передбачає пероральний, ін'єкційний, інгаляційний, небулізований препарат, що містить молекулу за винаходом.

Препарат може бути в формі таблетки, драже, капсули, рідини або сиропу.

Термін "суб'єкт" або "індивідуум", як визначається в даному документі, включає тварини, такі як ссавці, включаючи, але не обмежуються цим, примати (наприклад, люди), корови, вівці, кози, коні, собаки, коти, кролики, морські свинки, щури, миші або інші жуйні тварини, овечі, кінські, собачі, котячі види, гризуни або мишині види.

Винахід, крім того, передбачає набір для застосування у введенні молекул та композицій відповідно до винаходу суб'єкту (наприклад, пацієнту людині), який включає молекулу або композицію за винаходом, пристрій для доставки лікарського засобу та, необов'язково, інструкцій для застосування. Композиція можуть бути передбаченими як препарат, такий як ліофілізований препарат або препарат уповільненого вивільнення. В певних втіленнях, пристрій для доставки лікарського засобу вибирають з групи, що складається з шприцу, інгалятора, пристрою для інтраназального або очного введення (наприклад, насадка для дрібнокрапельного введення, очна або назальна піпетка), та пристрій для безголкової ін'єкції.

Молекули та композиції за даним винаходом можуть бути ліофілізованими для зберігання та відновлення прийнятним носієм перед застосуванням. Будь-який прийнятний спосіб ліофілізації (наприклад, висушування при розпиленні, висушування осаду) та/або методики відновлення можуть бути застосовані. Кваліфікованому фахівцю в даній галузі буде зрозуміло, що

ліофілізація та відновлення може призвести до різного ступеню втрати активності антитіла, та що застосування рівнів може бути скорегованим для компенсації. В конкретному втіленні, винахід передбачає композицію, що містить ліофілізовану (висушену при заморозці) композицію, як показано в даному документі. Переважно, ліофілізована (висушена при заморозці) композиція втрачає не більше, ніж приблизно 20 %, або не більше, ніж приблизно 25 %, або не більше, ніж приблизно 30 %, або не більше, ніж приблизно 35 %, або не більше, ніж приблизно 40 %, або не більше, ніж приблизно 45 %, або не більше, ніж приблизно 50 % її активності (наприклад, активності зв'язування альбуміну сироватки) при розбавленні. Активність – це кількість композиції, необхідна для отримання ефекту композиції перед тим як вона була ліофілізованою. Активність композиції можуть визначати, використовуючи будь-який прийнятний спосіб перед ліофілізацією, та активність можуть визначати, використовуючи той самий спосіб після розбавлення, щоб визначити кількість втраченої активності.

Винахід, крім того, передбачає препарати з подовженим або уповільненим вивільненням, які містять молекули за винаходом, такі препарати з подовженим вивільненням можуть містити молекули за винаходом в комбінації з, наприклад, гіалуроновою кислотою, мікросферами або ліпосомами та іншими фармацевтично або фармакологічно прийнятними носіями, наповнювачами та/або розріджувачами.

В одному аспекті, винахід передбачає фармацевтичну композицію, що містить молекулу за винаходом, та фармацевтично або фізіологічно прийнятним носієм, наповнювачем або розріджувачем.

В одному втіленні винахід передбачає модифіковані TNFR1 dAbs за представленим винаходом, які мають знижене зв'язування з ADAs, наприклад, такі як модифікований DOM1h-131-206 dAb з модифікацією, як показано в даному документі, що знижує зв'язування з ADAs. Наприклад, винахід передбачає DOM1h-131-206 dAb з подовженням одиничного аланіну на С-кінці (SEQ ID NO 16), наприклад, як фармацевтичну композицію, наприклад, для застосування в лікуванні захворювання або розладу, наприклад, в лікуванні респіраторного захворювання або розладу, такого як ХОЗЛ, ALI або ARDS. DOM1h-131-206 dAb з подовженням одиничного аланіну на С-кінці (SEQ ID NO 16) (або фармацевтична композиція, що містить DOM1h-131-206 dAb з подовженням одиничного аланіну на С-кінці), для застосування в лікуванні респіраторного захворювання або розладу, такого як ХОЗЛ, ALI або ARDS, можуть вводити суб'єкту, наприклад, суб'єкту-людині, шляхом ін'єкції (наприклад, шляхом підшкірної, внутрішньовенної або внутрішньом'язової ін'єкції), або її, альтернативно, можуть давати суб'єкту, наприклад, суб'єкту-людині, шляхом пульмональної введення, наприклад, шляхом розпилення, використовуючи стандартний небулайзер, або шляхом інгаляції, наприклад, використовуючи стандартний інгаляційний пристрій. Винахід, крім того, передбачає препарати подовженого вивільнення та/або висушені при заморозці, що містять модифіковані TNFR1 dAbs за представленим винаходом зі зниженим ADA зв'язування, такі як DOM1h-131-206 dAb з подовженням одиничного аланіну на С-кінці (SEQ ID NO 16). Крім того, передбаченим є пристрій для доставки, наприклад, пристрій інгалятор або небулайзер, який містить модифіковані TNFR1 dAbs за представленим винаходом, такі як DOM1h-131-206 dAb з подовженням одиничного аланіну на С-кінці нуклеїнової кислоти (SEQ ID NO 22).

В аспекті винахід передбачає немодифікований DOM1h-131-206 dAb (SEQ ID NO 1) або DOM1h-131-206 dAb модифікований за будь-яким зі способів, описаних в даному документі, щоб зменшити ADA зв'язування, наприклад, DOM1h-131-206 dAb з подовженням одиничного аланіну на С-кінці (SEQ ID NO 16), для лікування запального шкірного розладу, наприклад, псоріазу, та, крім того, передбаченим є будь-який один з режимів дозування, як описано нижче, для застосування доменного антитіла в лікуванні псоріазу. Доменне антитіло корисне для лікування псоріазу селективно діє той самий домен TNFR1 людини, як природний TNF-альфа ліганд людини для даного рецептору, та є специфічним, конкуруючим антагоністом TNFR1, але не TNFR2, та попереджує зв'язування TNF-альфа з TNFR1, та активацію сигнального шляху даного ліганду через TNFR1. Таке доменне антитіло може містити будь-який анти-TNFR1 dAb, який є модифікованим так, що знижує зв'язування з ADAs як розкрито в даному документі. Зокрема, доменне антитіло може бути доменним антитілом людини, таким як DOM1h-131-206, що містить амінокислотну послідовність, показану в SEQ ID NO: 1, DOM1h-131-206 з С-термінальним аланіном, що має амінокислотні послідовності, показані в SEQ ID NO: 16, або DOM1h-131-206 dAb (SEQ ID NO 1), які потім був модифікованим, щоб зменшити ADA зв'язування, як показано в даному документі (тобто будь-яка модифікація, що знижує зв'язування з ADAs), як розкрито в даному документі. Доменне антитіло може передбачатись в флаконі, що містить, наприклад, 100 мг або, наприклад, 40 мг ліофілізату доменного антитіла. Ліофілізат може містити цукрозу, гліцин, дигідрофосфат натрію та полісорбат 80. Даний

ліофілізат доменного антитіла може бути спочатку відновлена в 5 мл стерильної води та потім розбавлена стерильною водою, або іншими фармацевтично прийнятними розріджувачами, щоб зробити фармацевтичні композиції, які містять 20 мг/мл, 5 мг/мл та 1 мг/мл доменного антитіла.

Доменне антитіло можуть застосовувати в лікуванні пацієнтів-людей, яких ідентифіковано як таких, що мають псоріаз. Зокрема, доменне антитіло можуть застосовувати в лікуванні пацієнтів-людей, яких ідентифіковано як таких, що мають хронічний легкий, помірний або важкий, стабільний псоріаз плямистого типу з однією або двома ділянками пліми. Відповідно до National Psoriasis Foundation, легкий плямистий тип псоріазу вражає менше, ніж 3 % площі поверхні тіла пацієнта людини, помірний плямистий тип псоріазу вражає від 3 % до 10 % площі поверхні тіла пацієнта людини, та важкий псоріаз вражає більше, ніж 10 відсотків площі поверхні тіла пацієнта людини. Дивись, наприклад, Krajacic, 6 (5) Supplement 6, Biotechnology Healthcare, December 2009 та National Psoriasis Foundation, About Psoriasis: Statistics. Як точка відліку, бляшка пацієнта людини повинна була б займати приблизно 1 % від площі поверхні тіла пацієнта. Важкість псоріазу, крім того, можуть визначати, як альтернативну, відповідно до площі псоріазу та індексу важкості за рахунок застосування системи оцінювання, описаної Фредріксоном (Fredrikson), яка ґрунтується на чотирьох критеріях: почервоніння, потовщення, лускатість та кількість ураження площі поверхні. Дивись, наприклад, Fredrickson, 157 Dermatologica 238 (1978). Псоріатичні плями, які лікуватимуть, можуть мати порівнянну товщину інфільтрату, щонайменше, 200 мкм, як оцінено за допомогою ультразвукових вимірювань, коли доменне антитіло вводять вперше. Пацієнти-люди можуть бути суб'єктами чоловічої або жіночої статі, що мають хронічний псоріаз плямистого типу зі стабільною(ими) бляшкою(ами) на верхніх кінцівках, стегнах або тулубі. Дані пацієнти-люди можуть бути віком від приблизно 18 до приблизно 70 років. Пацієнти-люди, крім того, може бути віком від 14 до 26 років, а також 14 років або старші.

доменне антитіло можуть вводити даним пацієнтам-людям шляхом ін'єкції в псоріатичну пляму. Зокрема, 100 мкл фармацевтичної композиції, що містить 20 мг/мл, 5 мг/мл або 1 мг/мл доменного антитіла можуть вводити шляхом ін'єкції в псоріатичну пляму в глибину, мішенню якої є епідерміс та поверхневі шари дерми в плямі.

Доменне антитіло можуть вводити пацієнту-людині з псоріатичною плямою відповідно до протоколу лікування, за яким 100 мкл фармацевтичної композиції, що містить 5 мг/мл доменного антитіла, ін'єкційно вводять в псоріатичну пляму один раз на тиждень протягом 28 денного періоду лікування. За таким протоколом лікування пацієнту будуть вводити фармацевтичну композицію чотири рази та пацієнт буде одержувати 0,5 мг доменного антитіла під час кожного введення, таким чином, що загальна доза 2 мг доменного антитіла отримується протягом 28 денного періоду лікування. Це означає, наприклад, що за протоколом лікування протягом 28 днів пацієнт повинен отримати перші 100 мкл ін'єкції, що містить 0,5 мг доменного антитіла, в перший день, другу таку ін'єкцію на восьмий день, третю таку ін'єкцію на п'ятнадцятий день, та четверту таку ін'єкцію на двадцять другий день. Дози доменного антитіла (наприклад, 100 мкл ін'єкції, що містить 0,5 мг доменного антитіла) в даному протоколі лікування вводять в мг на пацієнта.

Доменне антитіло також можуть вводити пацієнту-людині з псоріатичною плямою відповідно до протоколу лікування, за яким 100 мкл фармацевтичної композиції, що містить 20 мг/мл доменного антитіла, ін'єкційно вводять в псоріатичну пляму один раз на тиждень протягом 28 денного періоду лікування. За таким протоколом лікування пацієнту будуть вводити фармацевтичну композицію чотири рази та пацієнт буде одержувати 2 мг доменного антитіла під час кожного введення, таким чином, що загальна доза 8 мг доменного антитіла отримується протягом 28 денного періоду лікування. Це означає, наприклад, що за протоколом лікування протягом 28 днів пацієнт повинен отримати перші 100 мкл ін'єкції, що містить 2 мг доменного антитіла, в перший день, другу таку ін'єкцію на восьмий день, третю таку ін'єкцію на п'ятнадцятий день, та четверту таку ін'єкцію на двадцять другий день. Дози доменного антитіла (наприклад, 100 мкл ін'єкції, що містить 2 мг доменного антитіла) в даному протоколі лікування вводять в мг на пацієнта.

Доменне антитіло також можуть вводити пацієнту-людині з псоріатичною плямою відповідно до протоколу лікування, за яким 100 мкл фармацевтичної композиції, що містить 5 мг/мл доменного антитіла, ін'єкційно вводять в псоріатичну пляму два рази на тиждень протягом 28 денного періоду лікування. За таким протоколом лікування пацієнту будуть вводити фармацевтичну композицію вісім разів та пацієнт буде одержувати 0,5 мг доменного антитіла під час кожного введення, таким чином, що загальна доза 4 мг доменного антитіла отримується протягом 28 денного періоду лікування. Це означає, наприклад, що за протоколом лікування протягом 28 днів пацієнт повинен отримати перші 100 мкл ін'єкції, що містить 0,5 мг доменного

антитіла, в перший день, другу таку ін'єкцію на четвертий день, третю таку ін'єкцію на восьмий день, та четверту таку ін'єкцію на одинадцятий день, п'яту таку ін'єкцію на п'ятнадцятий день, шосту таку ін'єкцію на вісімнадцятий день, сьому таку ін'єкцію на двадцять другий день та восьму таку ін'єкцію на двадцять п'ятий день. Дози доменного антитіла (наприклад, 100 мкл ін'єкції, що містить 0,5 мг доменного антитіла) в даному протоколі лікування вводять в мг на пацієнта.

Доменне антитіло також можуть вводити пацієнту-людині з псоріатичною плямою відповідно до протоколу лікування, за яким 100 мкл фармацевтичної композиції, що містить 1 мг/мл доменного антитіла, ін'єкційно вводять в псоріатичну пляму два рази на тиждень протягом 28 денного періоду лікування. За таким протоколом лікування пацієнту будуть вводити фармацевтичну композицію чотири рази та пацієнт буде одержувати 0,1 мг доменного антитіла під час кожного введення, таким чином, що загальна доза 0,4 мг доменного антитіла отримується протягом 28 денного періоду лікування. Це означає, наприклад, що за протоколом лікування протягом 28 днів пацієнт повинен отримати перші 100 мкл ін'єкції, що містить 0,1 мг доменного антитіла, в перший день, другу таку ін'єкцію на восьмий день, третю таку ін'єкцію на п'ятнадцятий день, та четверту таку ін'єкцію на двадцять другий день. Дози доменного антитіла (наприклад, 100 мкл ін'єкції, що містить 0,1 мг доменного антитіла) в даному протоколі лікування вводять в мг на пацієнта.

WO 2008/149148 описує способи випробування, виділення та одержання немодифікованого DOM1h-131-206 dAb, та такі способи є прийнятними для модифікованого TNFR1 dAbs за представленим винаходом зі зниженим зв'язуванням з ADAs, наприклад, з DOM1h-131-206 dAb з подовженням одиничного аланіну на С-кінці (SEQ ID NO 16), та дане розкриття (включаючи способи випробування, виділення та одержання) є включеними в даний документ.

В додаткових втіленнях 1-36, представлених нижче, винахід, крім того, передбачає:

1. Одиничний варіабельний домен імуноглобуліну (dAb) (наприклад VH, VL або VHH), наприклад, який зв'язується з мішенню, який містить одну або більше модифікацій, вибраних з:

(a) С-термінального додавання, подовження або тегу

(b) одного або більше заміщень в амінокислотному каркасі, де, щонайменше, одне заміщення є заміщенням, вибраним з: P14A заміщення, P41A заміщення та L108A заміщення;

та які зменшували зв'язування зі вже існуючими ADAs в порівнянні з немодифікованим одиничним варіабельним доменом імуноглобуліну (dAb).

2. Одиничний варіабельний домен імуноглобуліну (dAb) відповідно до 1, зазначеного вище, де згаданий dAb вибирають з людського VH, або VL dAb, або VHH верблюда.

3. Одиничний варіабельний домен імуноглобуліну (dAb) відповідно до 1 або 2, який містить С-термінальне подовження, щонайменше, однієї амінокислоти.

4. Одиничний варіабельний домен імуноглобуліну (dAb) відповідно до 3, де зазначене С-термінальне подовження включає амінокислотне подовження від однієї амінокислоти до приблизно 6 амінокислот.

5. Одиничний варіабельний домен імуноглобуліну (dAb) відповідно до 3 або 4, де зазначене С-термінальне подовження містить амінокислоту, яка є аланіном.

6. Одиничний варіабельний домен імуноглобуліну (dAb) відповідно до 5, де зазначене С-термінальне подовження складається з одиничної амінокислоти, яка є аланіном.

7. Одиничний варіабельний домен імуноглобуліну (dAb) відповідно до пункту 5, де зазначене С-термінальне подовження включає амінокислотне подовження вибране з: (a) AS, (b) AST (c) ASTK, (d) ASTKG або (e) ASTKGP.

8. Одиничний варіабельний домен імуноглобуліну (dAb) відповідно до будь-якого з 1-2, де С-кінець має тег, вибраний з: тегу афінності, тус-тегу, FLAG-тегу, his-тегів, хімічної модифікації, такої як ПЕГ, або протеїнових доменів, таких як Fc домен антитіла.

9. Одиничний варіабельний домен імуноглобуліну (dAb) відповідно до 6, де зазначений dAb є VH dAb, та який додатково містить P14A каркасне заміщення.

10. Одиничний варіабельний домен імуноглобуліну (dAb) відповідно до 7, де зазначений dAb є VH dAb, та який додатково містить P14A каркасне заміщення.

11. Одиничний варіабельний домен імуноглобуліну (dAb) відповідно до будь-якого з попередніх пунктів, який зв'язується з мішенню, де зазначений вибирають з: TNF α , TNFR1, VEGF, IL-1R, IL-6R, IL-4, IL-5, IL-13, DC-SIGN, ASGPR, альбуміну, TGF β R2.

12. Одиничний варіабельний домен імуноглобуліну (dAb) відповідно до 11, який вибирають з наступних амінокислотних послідовностей, визначених як: (a) DOM1h-131-206 dAb з подовженням одиничного аланіну (SEQ ID NO 16), (b) DOM1h-131-206 dAb з подовженням одиничного аланіну та P14A каркасною мутацією (SEQ ID NO 17), (c) DOM1h-131-206 dAb з P14A каркасною мутацією (SEQ ID NO 18), (d) DOM1h-131-206 dAb з ASTKG С термінальним

подовженням (SEQ ID NO 19), (e) DOM1h-131-206 dAb з ASTKG C термінальним подовженням та P14A каркасною мутацією (SEQ ID NO 20).

13. Одиничний варіабельний домен імуноглобуліну (dAb) відповідно до 11 або 12, де мішень є TNFR1, та немодифікований dAb вибирають з амінокислотної послідовності, яка є на 100 %, 95 %, 90 %, 85 % або 80 % ідентичною до амінокислоти, визначеної як: DOM1h-131-206 (SEQ ID NO 1), DOM 1h-131-511 (SEQ ID NO 2), DOM 1h-131-202 (SEQ ID NO 3).

14. Одиничний варіабельний домен імуноглобуліну (dAb) відповідно до будь-якого з попередніх пунктів, де dAb є присутнім, як злиття або кон'югат з додатковою молекулою.

15. Одиничний варіабельний домен імуноглобуліну (dAb) відповідно до 14, де dAb є присутнім як злиття або кон'югат з однією або більше додатковими молекулами, вибраними з: додаткового dAb, протеїну або поліпептиду, або його фрагменту, наприклад, що подовжує період напіввиведення, або, крім того, є терапевтичною або активною молекулою, ПЕГ молекулою, антитілом або його фрагментом, наприклад, Fc ділянкою.

16. Одиничний варіабельний домен імуноглобуліну (dAb) відповідно до 15, де dAb є присутнім, як mAbdAb молекула.

17. Фармацевтична композиція, яка містить одиничний варіабельний домен імуноглобуліну (dAb) відповідно до будь-якого з попередніх пунктів в комбінації з фармацевтично або фізіологічно прийнятним носієм, наповнювачем або розріджувачем.

18. Фармацевтична композиція відповідно до 17, яка додатково містить терапевтичні або активні агенти.

19. Фармацевтична композиція відповідно до 17 або 18, яка містить анти-TNFR1 dAb.

20. Фармацевтична композиція відповідно до 19, яка містить анти-TNFR1 dAb відповідно до будь-якого одного з 12-13.

21. Одиничний варіабельний домен імуноглобуліну (dAb) відповідно до будь-якого з пунктів 1-16 або композиція відповідно до будь-якого з 17-20, для застосування в медицині.

22. Спосіб лікування або попередження, щонайменше, одного захворювання, або розладу, або стану, вибраного із запального захворювання або розладу, або респіраторного або пульмонального захворювання або розладу шляхом введення суб'єкту терапевтично або профілактично ефективної кількості композиції відповідно до будь-якого одного з 19-20, або dAb відповідно до 11-13.

23. Спосіб за пунктом 22, де зазначене, щонайменше, одне захворювання, або розлад, або стан вибирають з: псоріазу, артриту, розсіяного склерозу, запального захворювання кишечника, наприклад, захворювання Крона та неспецифічного виразкового коліту; або, наприклад, респіраторного або пульмонального захворювання або розладу, наприклад, вибраного з: хронічного обструктивного захворювання легень, хронічного бронхіту, хронічного обструктивного бронхіту та емфіземи, запалення легень, хронічного обструктивного захворювання легень, астми, пневмонії, гіперчутливого пневмоніту, інфільтрату легень, що супроводжується еозинофілією, захворювання легень, зумовленого умовами навколишнього середовища, пневмонії, бронхоектазу, фіброзно-кістозної дегенерації, інтерстиціального захворювання легень, первинної легеневої гіпертензії, легеневої тромбоемболії, розладів плеври, розладів середостіння, розладів діафрагми, гіповентиляції, гіпервентиляції, апное сну, синдрому гострої дихальної недостатності, мезотеліоми, саркоми, відторгнення трансплантата, реакції "трансплантат проти господаря", раку легень, алергічного риніту, алергії, асбестозу, аспергіломи, аспергільозу, бронхоектазу, хронічного бронхіту, емфіземи, еозинофільної пневмонії, ідіопатичного легеневого фіброзу, інвазивного пневмококового захворювання, грипу, нетуберкульозної мікобактерії, ексудативного плевриту, пневмоконіозу, пневмоцитозу, пневмонії, актиномікозу легень, легеневого альвеолярного протеїнозу, легеневої форми сибірської виразки, набряку легень, легеневої емболії, запалення легень, легеневого гістіоцитозу Х, легеневої гіпертензії, легеневого норкадіозу, сухот легень, легеневого оклюзійного захворювання вен, ревматоїдного захворювання легень, саркоїдозу, та гранулематозу Вегенера та гострого пошкодження легень (ALI), та синдрому гострої дихальної недостатності (ARDS) та їх ускладнень.

24. Спосіб відповідно до 23, де зазначене захворювання є ALI, та зазначений dAb є dAb відповідно до пункту 13, або зазначена фармацевтична композиція містить dAb відповідно до пункту 13.

25. Спосіб відповідно до будь-якого одного з 22-24, де зазначена композиція або dAb доставляють суб'єкту шляхом підшкірної, внутрішньовенної або внутрішньом'язової ін'єкції.

26. Спосіб відповідно до будь-якого одного з 22-24, де зазначена композиція або dAb доставляють суб'єкту шляхом парентеральної, пероральної, ректальної, трансмукозальної, очної, пульмональної доставки або доставки до шлунково-кишкового тракту.

27. Ін'єкційний, пероральний, інгаляційний або небулізований препарат, який містить композицію або dAb, відповідно до будь-якого одного з 1-20.

28. Препарат з подовженим вивільненням, який містить композицію відповідно до будь-якого одного з пунктів 1-20.

5 29. Висушений при заморозці препарат, який містить композицію відповідно до будь-якого одного з 1-20.

30. Пристрій доставки, що включає композицію відповідно до будь-якого одного з 1-20.

31. Пристрій доставки, що включає композицію відповідно до будь-якого одного з 1-20, де зазначений пристрій є небулайзером або інгалятором.

10 32. Виділена або рекомбінантна нуклеїнова кислота, що кодує dAb відповідно до будь-якого з 1-16.

33. Виділена або рекомбінантна нуклеїнова кислота, що кодує dAb відповідно до будь-якого з 12-13.

34. Вектор, що містить нуклеїнову кислоту 32 або 33.

15 35. Клітина-господар, що містить нуклеїнову кислоту за пунктом 32 або 33, або вектор за пунктом 34.

36. Спосіб одержання поліпептиду, який містить dAb відповідно до будь-якого з 1-16, де зазначений спосіб включає забезпечення функціонування клітини-господаря за пунктом 35 в умовах прийнятний для експресії зазначеної нуклеїнової кислоти або вектору, в результаті чого одержують поліпептид.

20 37. dAb відповідно до 1-16, де dAb зв'язується з ADA з КД, яка становить 150 % або більше КД немодифікованого dAb (наприклад, 200 %, 250 %, 300 %, 350 %, 400 %, 450 %, 500 %, 550 %, 600 %, 650 % або більше).

Винахід, крім того, передбачає наступні втілення, які перелічені як 1b-25b:

25 1b. Одиничний варіабельний домен імуноглобуліну (dAb), який не зв'язує (або має понижене зв'язування) вже існуючого ADA людини в сироватках людини, де епітоп на dAb, з яким ADA зв'язується, маскується.

2b. dAb відповідно до 1b вище, який має КД зв'язування з ADA, яка становить 150 % або більше (наприклад, 200 %, 250 %, 300 %, 350 %, 400 %, 450 %, 500 %, 550 %, 600 %, 650 % або 30 більше) від КД еквівалентної послідовності, в якій епітоп не маскується.

3b. dAb відповідно до 1 b– 2b, де епітоп маскується шляхом:

а. додавання хімічної структури до С-кінця; та/або

б. одного або більше каркасного(их) заміщення(ь); та/або

с. однієї або більше делецій.

35 4b. dAb відповідно до 3b, де хімічна структура включає одну або більше амінокислоту(и), С-термінальний тег або хімічну модифікацію, таку як пегілювання або амідування.

5b. dAb відповідно до 3b або 4b, де (а), (b) та/або (с) має безпосередній конформаційний ефект на епітоп, опосередкований конформаційний ефект на епітоп, та/або просторові утруднення епітопу.

40 6b. dAb відповідно до будь-якого з попередніх пунктів, де зазначений епітоп;

d. перекривається із залишком Кебата 113 на С-кінці; та/або

е. перекривається із залишками Кебата 14, 41, 108, 110, 112 та 113; та/або

f. містить поверхню, що піддається дії залишків Кебата 14, 41, 108, 110, 112 та 113, та будь-якого іншого залишку в межах 5 ангстрем від даних положень; та/або

45 g. містить каркас 4, та петлі між бета-нитками каркасів 1 та 2.

7b. dAb відповідно до будь-якого з попередніх втілень 1b-6b, який містить одне або більше амінокислотних заміщень в положеннях Кебата 14, 41, 108, 110, або 112 в порівнянні з гаметиною каркасною послідовністю людини.

8b. Гуманізований одиничний варіабельний домен імуноглобуліну (dAb), який має нелюдську послідовність в одному або більше з наступних залишків: залишки Кебата 14, 41, 108, 110 та/або 112.

9b. dAb відповідно до 7b або 8b, де амінокислотні залишки в зазначеному одному або більше положень є аланіновими залишками.

55 10b. dAb відповідно до будь-якого з попередніх втілень 1b-9b, де зазначене маскуванню досягають шляхом забезпечення амінокислотного подовження до С-кінця dAb.

11b. dAb відповідно до 10b, де зазначене подовження становить від 1 до 8 амінокислот.

12b. dAb відповідно до 10b або 11b, де зазначене подовження містить аланіновий залишок.

13b. dAb відповідно до 12b, де зазначене подовження складається з одиничного аланінового залишку.

14b. dAb відповідно до 12b, де зазначене подовження вибирають з групи, що складається з: AS, AST, ASTK, ASTKG та ASTKGP.

15b. dAb відповідно до будь-якого з 1b-14b, де зазначений dAb є VH, або VL, або VHH dAb.

16b. dAb відповідно до будь-якого з 1b-15b, де мішенню з якою зв'язується dAb є TNF α , TNFR1, VEGF, IL-1R, IL-6R, IL-4, IL-5, IL-13, DC-SIGN, ASGPR, альбумін та TGF β R2.

17b. Одиничний варіабельний домен імуноглобуліну (dAb) відповідно до 16b, який вибирають з наступних амінокислотних послідовностей, зазначених як: (a) DOM1h-131-206 dAb з подовженням одиничного аланіну (SEQ ID NO 16); (b) DOM1h-131-206 dAb з подовженням одиничного аланіну та P14A каркасною мутацією (SEQ ID NO 17) (c) DOM1h-131-206 dAb з P14A каркасною мутацією (SEQ ID NO 18); (d) DOM1h-131-206 dAb з ASTKG С-термінальним подовженням (SEQ ID NO 19); та (e) DOM1h-131-206 dAb з ASTKG С-термінальним подовженням та з P14A каркасною мутацією (SEQ ID NO 20).

18b. Одиничний варіабельний домен імуноглобуліну (dAb) відповідно до 16b або 17b, де мішенню є TNFR1, та немодифікований dAb вибирають з послідовності, що є на 100 %, 95 %, 90 %, 85 % або 80 % ідентичною до амінокислоти, зазначеної як: DOM1h-131-206 (SEQ ID NO 1), DOM 1h-131-511 (SEQ ID NO 2), DOM 1h-131-202 (SEQ ID NO 3).

19b. Спосіб маскування епітопу на одиничному варіабельному домені імуноглобуліну (dAb), в якому епітоп зв'язується з вже існуючим ADA людини в сироватках людини, який включає стадію модифікування епітопу.

20b. Спосіб зниження зв'язування одиничного варіабельного домену імуноглобуліну (dAb) зі вже існуючим ADA людини в сироватках людини, який включає маскування епітопу на dAb, з яким зв'язується ADA.

21b. Спосіб відповідно до 19b або 20b, в якому зазначене маскування викликає зниження зв'язування з ADA, таким чином, що dAb, який містить маскований епітоп має КД, яка становить 150 % або більше від КД dAb, в якому епітоп не є маскованим.

22b. Спосіб відповідно до будь-якого з 19b – 21b, де епітоп є маскованим шляхом:

h. додавання хімічної структури до С-кінця; та/або

i. одного або більше каркасного(их) заміщення(ь); та/або

j. однієї або більше делецій.

23b. Спосіб відповідно до 22b, де хімічна структура містить, одну або більше амінокислот, С-термінальний тег або хімічну модифікацію, таку як пегілювання або амідування.

24b. Спосіб відповідно до 22b або 23b, де (a), (b) та/або (c) має безпосередній конформаційний ефект на епітоп, опосередкований конформаційний ефект на епітоп, та/або просторові утруднення епітопу.

25b. Спосіб відповідно до будь-якого з 19b-24b, вказаних вище, де зазначений епітоп;

k. перекривається із залишком Кебата 113 на С-кінці;

l. перекривається із залишками Кебата 14, 41, 108, 110, 112 та 113; та/або

m. містить поверхню, що піддається дії залишків Кебата 14, 41, 108, 110, 112 та 113, та будь-якого іншого залишку в межах 5 ангстрем даної паверхні; та/або

n. містить каркас 4, та петлі між бета-нитками каркасів 1 та 2.

В наступних втіленнях 1с-15с нижче, винахід передбачає:

1с. Гуманізований VHH одиничний варіабельний домен імуноглобуліну, який залишає один або більше гаметичних залишків верблюда в залишках Кебата 14 та/або 108.

2с. Одиничний варіабельний домен імуноглобуліну відповідно до 1с вище, який має КД зв'язування з ADA людини в сироватці людини, яка становить 150 % або більше (наприклад, 200 %, 250 %, 300 %, 350 %, 400 %, 450 %, 500 %, 550 %, 600 %, 650 % або більше) від КД еквівалентної послідовності, в якій залишки 14 та/або 108 вже є гуманізованими.

3с. Одиничний варіабельний домен імуноглобуліну відповідно до 1с або 2с, в якому одну або більше С-термінальних амінокислот видалено.

4с. Одиничний варіабельний домен імуноглобуліну відповідно до 3с, в якому одну С-термінальну амінокислоту видалено.

5с. Одиничний варіабельний домен імуноглобуліну відповідно до 1с або 2с, який містить С-термінальне додавання, подовження або тег.

6с. Одиничний варіабельний домен імуноглобуліну відповідно до 5с, де зазначене додавання, подовження або тег вибирають з групи, що складається з: одного або більше амінокислотного(их) подовження, С-термінального тегу або хімічної модифікації, такої як пегілювання або амідування.

7с. Одиничний варіабельний домен імуноглобуліну відповідно до 5с або 6с, в якому зазначене подовження становить від 1 та 8 амінокислот.

8с. Одиничний варіабельний домен імуноглобуліну відповідно до 7с, де зазначене подовження містить аланіновий залишок.

9с. Одиничний варіабельний домен імуноглобуліну відповідно до 8с, де зазначене подовження складається з одиничного аланінового залишку.

5 10с. Одиничний варіабельний домен імуноглобуліну відповідно до 8с, де зазначене подовження вибирають з групи, що складається з: AS, AST, ASTK, ASTKG, ASTKGP, ASTKA, ASTKAP та ASTKAPS.

11с. Одиничний варіабельний домен імуноглобуліну відповідно до будь-якого з попередніх втілень 1с-10с, який додатково містить нелюдські залишки в одному або більше з наступних залишків: залишки Кебата 41, 110 та/або 112.

12с. Одиничний варіабельний домен імуноглобуліну відповідно до будь-якого з попередніх втілень, де мішенню, з якою зв'язується dAb, є TNF α , TNFR1, VEGF, IL-1R, IL-6R, IL-4, IL-5, IL-13, DC-SIGN, ASGPR, альбумін та TGF β R2.

13с. Спосіб гуманізації верблюжого VHH одиничного варіабельного домену імуноглобуліну, який включає утримування одного або більше верблюжих гаметичних залишків в залишках Кебата: 14 та/або 108.

14с. Спосіб зниження зв'язування VHH одиничного варіабельного домену імуноглобуліну (dAb) верблюда з вже існуючим ADA, який включає утримування верблюжого гаметичного залишку в залишках Кебата: 14 та/або 108.

20 15с. Спосіб відповідно до 13с або 14с, в якому зазначене утримання спричиняє зниження зв'язування з ADA таким чином, що VHH, який містить верблюжі залишки в положеннях 14 та/або 108 мають КД зв'язування з людською ADA в сироватці людини, яка становить 150 % або більше від КД VHH з еквівалентною послідовністю, в якій дані залишки вже є гуманізованими.

25 Зверніть увагу, що термін dAb, як використовується в даному документі, є зареєстрованою торговою маркою.

ПРИКЛАДИ:

Приклад 1: Кількість здорових суб'єктів з вже існуючими ADA з dAb, позначеного DOM1H-131-206

Методика кількісного аналізу DOM1H-131-206 (VH) ADA

30 DOM1H-131-206 (SEQ ID NO 1) біотинилують у біотиновому молярному стимулюючому співвідношенні 8:1. Після маркування, біотинильований DOM1H-131-206 (SEQ ID NO 1) піддають буферо-обміну та зберігають в буфері формуляції, що містить 14 мМ фосфату натрію, 8,4 % цукрози, 0,35 % гліцину, 0,014 % полісорбату 80 при pH 7,4.

35 DOM1H-131-206 маркують рутенієм у Sulfo-Tag молярному стимулюючому співвідношенні 5:1. Після маркування, Sulfo-Tag маркований DOM1H-131-206 піддають буферо-обміну та зберігають в буфері формуляції, що містить 14 мМ фосфату натрію, 8,4 % цукрози, 0,35 % гліцину, 0,014 % полісорбату 80 при pH 7,4.

40 Аналіз анти-медикаментозного антитіла (ADA) представляє собою аналіз, який прооводять на MSD™ ECL (електрохемілюмінесцентній) технологічній платформі. MSD™ технологія (доступна від Meso scale Discovery, Matyland, USA) застосовує хелат металу рутенію ECL мітку в поєднанні з вугільними електродами, які розташовують в лунках планшету для мікротитрування, які є покритими стрептавідином. Зв'язування Sulfo-Tag™, що використовують в аналізі, продукує хемілюмінесцентний сигнал, що спрацьовує, коли на прилад подається напруга (Meso Scale Discovery Sector™ Imager 6000). Одержаний в результаті люмінесцентний сигнал вимірюють в

45 одиницях ECL™. Інтенсивність сигналу є прямо пропорційною кількості антитіла, виявленого в зразку. Негативний (нормальна людська сироватка; NHS) та позитивний (PC; мишаче анти-DOM1H-131-206 ідіотипове антитіло додане в точно відміряній кількості в нормальну людську сироватку) контрольні зразки (QCs) додатково включають в кожен планшет для аналізу.

50 Короткий опис методик аналізу описано нижче:

1. MSD™ стрептавідиновий планшет блокують 150 мкл/лунка блокуючого казеїну в PBS (1 %) при кімнатній температурі (к.т.) протягом 1-2 годин. Блокатор видаляють без промивання.

55 2. Після 1 години попереднього інкубування гомогенну суміш, що містить 0,1 мкг/мл біотинильованого DOM1H-131-206 (лікарський засіб), 0,1 мкг/мл рутенільованого ("Sulfo-Tag"™) DOM1H-131-206 (лікарський засіб), та 2 % зразка сироватки в розріджувачі аналізу (1 % казеїн в PBS), переносять в MSD™ планшет та інкубують протягом 1 години \pm 5 хвилин при к.т.

3. Потім MSD планшет промивають 3 три рази PBST.

4. Додають 150 мкл/лунка буферу зчитування, та планшет зчитують.

60 Під час валідації даного конкретного імуноаналізу, панель з 60 зразків сироватки здорових донорів-людей піддавали скринінгу щодо фонові реактивності в аналізі. Визначено, що

приблизно 45 % зразків сироватки від даних суб'єктів мали виявлені VH-реактивні аутоантитіла, в більшості IgG ізотипу, які були здатні зв'язуватися з DOM1H-131-206 (результати показані на фігурі 1).

Вільний, немічений DOM1H-131-206 конкурує щодо ADA зв'язування в даному аналізі, що в результаті призводить до зниженої інтенсивності сигналу (високе % сигнальне інгібування) Даний "Аналіз підтвердження" застосовували для визначення модифікованих версій DOM1H-131-206, та інше антитіло, що ґрунтується на молекулах, могло б конкурувати з DOM1H-131-206 щодо ADA зв'язування.

Приклад 2: Амінокислотні заміщення в VH каркасі DOM1h-131-206

Вільний, немічений DOM1H-131-206 конкурує щодо ADA зв'язування та в результаті призводить до зниженої інтенсивності сигналу в DOM1H-131-206 ADA аналізі, як описано вище. Даний "Аналіз підтвердження", відповідно, застосовували для визначення досліджуваних речовин, наприклад, DOM1H-131-206, модифікованих версій DOM1H-131-206, або інше антитіло, що ґрунтується на молекулах ("досліджувана речовина"), могло б також інгібувати зв'язування ADA з DOM1H-131-206.

Для дослідження яке зв'язування ADA з VH каркасом могло б зменшуватись, було зроблено ряд амінокислотних заміщень та інших модифікацій каркасу DOM1h-131-206, використовуючи стандартні сайт-спрямовані методи мутагенезу.

Молекули із заміщеннями (досліджувані речовини) аналізували, використовуючи наступний спосіб (Аналіз підтвердження):

Методика аналізу підтвердження DOM1H-131-206 (яка може бути застосована для скринінгу VH dAbs щодо ADA зв'язування):

1. 10 мкг/мл DOM1H-131-206 або іншу досліджувану речовину, таку як модифікований dAbs, попередньо інкубують протягом 1 години \pm 5 хвилин при к.т. з 4 % ADA позитивною людською сироваткою в розріджувачі аналізу (1 % казеїн в PBS).

2. MSD™ стрептавідиновий планшет блокують 150 мкл/лунка блокуючого казеїну в PBS (1 %) при кімнатній температурі (к.т.) протягом 1-2 годин. Блокатор видаляють без промивання.

3. В планшеті для мікротитрування для аналізу, зразок, що містить зразок ADA позитивної людської сироватки та 10 мкг/мл досліджуваної речовини, такої як модифіковані dAbs, додають до гомогенної суміші біотинильованого DOM1H-131-206 (SEQ ID NO 1) (лікарський засіб) та рутинильованого ("Sulfo-Tag"™) DOM1H-131-206 (SEQ ID NO 1) (лікарський засіб) в розріджувачі аналізу (1 % казеїн в PBS) таким чином, що кінцеві концентрації становлять 2 % ADA позитивної людської сироватки, 0,1 мкг/мл біотинильованого DOM1H-131-206 (SEQ ID NO 1) (лікарський засіб) та 0,1 мкг/мл рутинильованого ("Sulfo-Tag"™) DOM1H-131-206 (SEQ ID NO 1) (лікарський засіб), та інкубують протягом 1 години \pm 5 хвилин при к.т...

4. Після 1 години інкубування, зразки для аналізу переносять, до блокованого MSD планшету, та планшет інкубують протягом 1 години \pm 5 хвилин в темряві при к.т.

5. MSD™ планшет потім промивають 3 рази PBST.

6. Додають 150 мкл/лунка буферу зчитування, та планшет зчитують.

Для кожного експерименту зі зразками сироватки людини з різним вихідним клоном (результати показані в таблиці 1) від 10 ADA позитивних суб'єктів досліджували в аналізі підтвердження вище (в прикладі 2): Результати показані в таблиці 1b як і (загальний) середній % інгібування сигналу та також % суб'єктів з ADA зв'язуванням. Менший % інгібування сигналу менш модифікованої сполуки була здатна зв'язуватися ADAs. Зменшення приблизно на 40,5 % у % інгібування сигналу було взяте, щоб показати незначне ADA зв'язування.

Використовуючи аналіз підтвердження, визначили, що амінокислотні заміщення в наступних положеннях значно зменшували зв'язування вже існуючих ADA з DOM1H-131-206, в той же час, зберігаючи специфічну активність щодо зв'язування з антигеном, тобто зв'язування з TNFR1, як визначено, використовуючи методику аналізу TNFR1 афінності, показану в прикладі 5c (результати показані в таблиці 1): P14A, P41A, L108Q.

Приклад 3: Амінокислотне подовження в VH каркасі DOM1H-131-206

Для визначення, незважаючи на те, що модифікація С-кінця VH каркасу могла зменшувати ADA зв'язування, було зроблено ряд С-термінальних модифікацій каркасів, використовуючи сайт-спрямовані способи мутагенезу. Молекули із заміщеннями (досліджувані речовини) аналізували, використовуючи "аналіз підтвердження", як описано раніше в прикладі 2) та результати показані нижче в таблиці 1.

Подовження С-кінця DOM1H-131-206 або інших молекул, які досліджували, також значно зменшувало зв'язування вже існуючого ADA (таблиця 1, таблиця 2). Результати показані в таблиці 2 також одержували, використовуючи "аналіз підтвердження", як описано раніше в прикладі 2. Це є проілюстрованим шляхом подовження A, AS, AST, ASTK, ASTKG, ASTKGP,

AAA, та досліджують всі довші подовження. VHH клони, які не є гуманізованими, мають нижчі рівні зв'язування з ADAs.

Таблиця 1

Оцінювання ADA зв'язування з DOM1H-131-206 мутантами

Вихідний клон	модифікація послідовності	Середній % інгібування сигналу в аналіз підтвердження (середнє значення з 10 суб'єктів)	% суб'єктів з ADA зв'язуванням (10 суб'єктів)
DOM 1H-131-206	Немодифікований	99,47	100
DOM 1H-131-206	Q13A	99,21	100
DOM 1H-131-206	P14A	58,32	100
DOM 1H-131-206	P41A	87,35	100
DOM 1H-131-206	K43A	99,51	100
DOM 1H-131-206	G44E	99,47	100
DOM 1H-131-206	R83A	99,32	100
DOM 1H-131-206	H91S	99,38	100
DOM 1H-131-206	L108Q	90,92	100
DOM 1H-131-206	P14A, G44E	61,61	100
DOM 1H-131-206	G44E, H91S	99,11	100
DOM 1H-131-206	P14A, H91S	50,23	60
DOM 1H-131-206	G44E, L108Q	91,29	100
DOM 1H-131-206	Немодифікований	96,13	100
DOM 1H-131-206	С-термінальний А	15,74	0
DOM 1H-131-206	С-термінальний AS	16,28	0
DOM 1H-131-206	С-термінальний AST	26,41	50
DOM 1H-131-206	С-термінальний ASTK	19,60	40
DOM 1H-131-206	С-термінальний ASTKG	28,27	40
DOM 1H-131-206	С-термінальний ASTKGP	42,63	60

5 % інгібування = ADA зв'язування (% інгібування сигналу, коли наданий протеїн є конкурентним в аналізі утворення зшивання ADA (аналіз підтвердження)).

Таблиця 2

Оцінювання ADA зв'язування VHH молекул та VH доменних антитіл з С-термінальними подовженнями

Вихідний клон	модифікація послідовності	Середній % Інгібування сигналу в аналізі підтвердження (середнє значення з 10 суб'єктів)	% суб'єктів з ADA зв'язуванням (10 суб'єктів)
Пасколізумаб-DT04-H-033	Немодифікований	99,48	100
Пасколізумаб-DT04-H-033	С-термінальний AAA	3,46	0
Пасколізумаб-DT04-H-033	С-термінальний AST	3,44	0
Пасколізумаб-DT04-H-033	С-термінальний AS	4,12	0
Пасколізумаб-DT04-H-033	С-термінальний А	7,46	0
DOM1h-574-208	Немодифікований	94,13	100
DOM1h-574-208-VL злиття	С-термінальний VL dAb	4,43	0
DT04-H-033	С-термінальний AAA	10,98	0
DT04-H-033	С-термінальний AST	14,00	0
DT04-H-033	С-термінальний AS	8,26	0
DT04-H-033	С-термінальний А	12,48	0
DT04-H-033	С-термінальний FLAG (послідовність 6 амінокислотного пептиду)	12,80	0

Продовження таблиці 2

VHH клон 2-40842 (IL6R)	Немодифікований	18,66	20
VHH клон 7-40842 (IL6R)	Немодифікований	21,96	20
VHH клон 3-40955 (RANKL-верблюжачий)	Немодифікований	23,68	20
VHH клон 8-41015 (RANKL-верблюжачий)	Немодифікований	20,08	20
VHH клон 9-41016 (RANKL-гуманізований)	Немодифікований	88,45	100

% інгібування = ADA зв'язування (% інгібування сигналу, коли наданий протеїн є конкурентним в аналізі утворення зшивання ADA).

Послідовність FLAG тега може бути знайдена в Nature Biotechnology 1988, Vol 16, pp1204-1210.

Звертаємо увагу, що (середні) 40 % інгібування сигналу (або менше ніж 40 % інгібування сигналу) беруть, щоб показати незначне ADA зв'язування.

Приклад 4: Комбінація амінокислотних заміщень та С-термінального подовження в VH каркасі DOM1H-131-206

Для визначення, незважаючи на те, що комбінація амінокислотних заміщень та модифікації С-кінця VH каркасу могли зменшувати ADA зв'язування, було зроблено ряд С-термінальних модифікацій та/або амінокислотних заміщень в каркасах, використовуючи сайт-спрямовані способи мутагенезу. Молекули із заміщеннями аналізували, використовуючи "аналіз підтвердження", описаний раніше в прикладі 2). Результати показані нижче в таблиці 3:

Таблиця 3

Вихідний клон	модифікація послідовності	Середній % інгібування сигналу в аналізі підтвердження (середнє значення з 10 суб'єктів)	% суб'єктів з ADA зв'язуванням (10 суб'єктів)
DOM 1H-131-206	С-термінальний А	1,12	0
DOM 1H-131-206	С-термінальний ASTKG	1,77	0
DOM 1H-131-206	P14A + С-термінальний А	8,76	0
DOM 1H-131-206	P14A + С-термінальний ASTKG	11,93	0
DOM 1H-131-206	С-термінальний АСТ	34,96	20
DOM 1H-131-206	С-термінальна S делеція (ΔS)	44,67	40
DOM 1H-131-206	P14E	47,22	60
DOM 1H-131-206	P14K	46,70	50
DOM 1H-131-206	P14Q	52,87	60
DOM 1H-131-206	P14T	68,86	100
DOM 1H-131-206	L11A	97,96	100
DOM 1H-131-206	A84T	90,96	100
DOM 1H-131-206	L108A	94,30	100
DOM 1H-131-206	T110A	78,84	100
DOM 1H-131-206	S112A	77,11	80
DOM 1H-131-206	P14K + С-термінальний А	29,13	10
DOM 1H-131-206	P14K + С-термінальний ASTKG	25,01	10
DOM 1H-131-206	P14Q + С-термінальний А	29,66	20
DOM 1H-131-206	P14Q + С-термінальний ASTKG	21,76	10
DOM 1H-131-206	P14T + С-термінальний А	32,97	20
DOM 1H-131-206	P14T + С-термінальний ASTKG	17,19	0

Приклад 5а та 5b: Афінність DOM1H-131-206 С-термінального подовження

Додаткові дослідження проводили, щоб визначити які модифікації в DOM1H-131-206, що зменшують зв'язування вже існуючого ADA, в результаті призводили до будь-яких змін в афінності даного dAb щодо його мішені, людського TNFR1.

Приклад 5а: Оцінювання TNFR1 зв'язування DOM1H-131-206 мутантів, використовуючи ELISA

Здатні модифіковані варіанти DOM 1H-131-206 (дослідження dAbs), що зв'язуються з людським TNFR1 визначали, використовуючи ELISA. Спостерігалось, що каркасна мутація та С-термінальні модифікації, які, як показано, зменшують зв'язування вже існуючого ADA, в основному, мали співставиме зв'язування з TNFR1, в порівнянні з вихідним DOM1H-131-206 dAb. Виключенням було DOM1H-131-206 з С-термінальним подовженням ASTKGP, який мав приблизно в 5 разів менший EC50 щодо TNFR1 зв'язування в порівнянні з вихідним dAb DOM1H-131-206.

Протокол ELISA аналізу зв'язування TNFR1:

1. Рекombінантний людський TNFR1-Fc (R&D Systems) додають до 96-лункових ELISA планшетів в кінцевій концентрації 0,1 мкг/мл в карбонат-бікарбонатному буфері pH 9,4 (Pierce).

2. Після інкубування протягом ночі при 4 °C, надлишок TNFR1:Fc видаляють шляхом промивання три рази промивочним буфером (промивочний буфер – 0,1 % Tween-20/PBS) та три рази PBS.

3. Планшети блокують 1 % BSA в PBS протягом 1 години при кімнатній температурі. Блок видаляють промиванням, як описано вище, та потім зразки dAb, які досліджують, розбавлені в розріджувачі для аналізу (0,1 % BSA+0,05 % Tween-20/PBS), додають до планшету та інкубують протягом 1 години при кімнатній температурі.

4. Після промивання, як описано вище, додають поліклональний кролячий анти-людський Ig (Vh специфічний) в розбавленні 1:1000 в розріджувачі для аналізу та інкубують протягом 1 години при кімнатній температурі.

5. Після промивання, як описано вище, додають мишаче анти-кроляче HRP кон'югатне антитіло в розбавленні 1:10,000 в розріджувачі для аналізу та інкубують протягом 1 години при кімнатній температурі.

6. Після промивання, як описано вище, до кожної лунки додають 100 мкл субстрату SureBlue TMB. Після того, як проявився блакитний колір, ферментну реакцію зупиняють 100 мкл 1M HCl та планшет зчитують на 450 нм.

7. Криві дози відповіді для кожного досліджуваного dAb одержують шляхом побудови графіка концентрація проти значень поглинання. EC50 значення для dAb зв'язування з TNFR1 визначають, використовуючи Graphpad Prism.

Таблиця 4а

Оцінювання зв'язування з TNFR1 для DOM1H-131-206 мутантів

Вихідний клон	модифікація послідовності	Середнє значення EC50 для TNFR1 зв'язування (нМ)
DOM 1H-131-206	Немодифікований	1,99
DOM 1H-131-206	Q13A	1,75
DOM 1H-131-206	P14A	1,22
DOM 1H-131-206	P41A	0,59
DOM 1H-131-206	K43A	0,67
DOM 1H-131-206	G44E	0,86
DOM 1H-131-206	R83A	0,76
DOM 1H-131-206	H91S	0,96
DOM 1H-131-206	L108Q	0,85
DOM 1H-131-206	P14A, G44E	2,03
DOM 1H-131-206	G44E, H91S	3,50
DOM 1H-131-206	P14A, H91S	0,75
DOM 1H-131-206	G44E, L108Q	1,64
DOM 1H-131-206	Немодифікований	1,99
DOM 1H-131-206	С-термінальний A	1,21
DOM 1H-131-206	С-термінальний ASTK	1,59
DOM 1H-131-206	С-термінальний ASTKG	1,11
DOM 1H-131-206	С-термінальний ASTKGP	11,89

Таблиця 4b

Оцінювання зв'язування з TNFR1 для DOM1H-131-206 мутантів

Вихідний клон	модифікація послідовності	Середнє значення EC50 для TNFR1 зв'язування (нМ)
DOM 1H-131-206	Немодифікований	0,67
DOM 1H-131-206	P14A + C-термінальний A	0,57
DOM 1H-131-206	P14A + C-термінальний ASTKG	1,47
DOM 1H-131-206	C-термінальний AST	1,99
DOM 1H-131-206	C-термінальна S делеція (ΔS)	0,50
DOM 1H-131-206	P14E	0,64
DOM 1H-131-206	P14K	0,72
DOM 1H-131-206	P14Q	0,91
DOM 1H-131-206	P14T	0,77
DOM 1H-131-206	L11A	0,51
DOM 1H-131-206	A84T	0,79
DOM 1H-131-206	L108A	0,70
DOM 1H-131-206	T110A	0,29
DOM 1H-131-206	S112A	1,19
DOM 1H-131-206	P14K + C-термінальний A	0,46
DOM 1H-131-206	P14K + C-термінальний ASTKG	0,48
DOM 1H-131-206	P14Q + C-термінальний A	0,46
DOM 1H-131-206	P14Q + C-термінальний ASTKG	1,10
DOM 1H-131-206	P14T + C-термінальний A	0,66
DOM 1H-131-206	P14T + C-термінальний ASTKG	0,72

Таблиця 4с

Оцінювання зв'язування з TNFR1 для DOM1H-131-206 мутантів

Вихідний клон	модифікація послідовності	Середнє значення EC50 для TNFR1 зв'язування (нМ)
DOM 1H-131-206	Немодифікований	1,97
DOM 1H-131-206	C-термінальний A	2,71
DOM 1H-131-206	P14A + C-термінальний A	2,22
DOM 1H-131-206	C-термінальний ASTKG	1,90
DOM 1H-131-206	P14A + C-термінальний ASTKG	4,64

Приклад 4b: методика аналізу TNFR1 афінності з використанням Biacore™

- 5 Афінність модифікованого DOM1H-131-206 dAb з C-термінальним A подовженням визначали шляхом поверхневого плазмонного резонансу, використовуючи Biacore™ T100. Анти-людське IgG антитіло іммобілізували на CM4 чипі, та людський TNFR1:Fc фіксували на даній поверхні до рівня приблизно 60 відносних одиниць. Досліджувані речовини, розбавлені в буфері до кінцевих концентрацій від 25 нМ до 0,024 нМ (в 4 кратному діапазоні розбавлень)
- 10 ін'єкційно вводили над TNFR1:Fc. Утворені криві зв'язування двічі посилювались на криву 0 нМ

досліджуваної речовини та на дані, встановлені щодо моделі зв'язування 1:1, щоб отримати кінетичні дані. Зв'язування досліджуваної речовини з TNFR1 макаки-крабоїда визначали тим самим способом. Кінетичні дані зв'язування показані нижче в таблиці 4d далі.

- 5 Насамкінець, кінетики зв'язування модифікованого (тобто з додаванням С-термінального А) та немодифікованого TNFR1dAbs були подібними.

Таблиця 4d

	DOM1H-131-206 модифікація	Кінетики зв'язування		
		Ka (M ⁻¹ s ⁻¹) (x10 ⁶)	Kd (s ⁻¹) (x10 ⁻⁴)	KD (M) (x10 ⁻¹¹)
Human TNFR1	С-термінальний А	9,02	2,29	2,53
	Немодифікований	9,94	1,42	1,43
TNFR1 макаки-крабоїда	Немодифікований	10,10	1,51	1,50
	С-термінальний А	9,60	1,89	1,97

(без помилок розраховані вище дані)

Приклад 6: Фармакокінетики DOM1H-131-206 С-термінального подовження

- 10 Наступні дослідження виконували, щоб визначити які модифікації DOM1H-131-206, що зменшують зв'язування вже існуючого ADA, в результаті призводять до будь-яких змін у фармакокінетиках даного dAb.

Фармакокінетична процедура

- 15 Системний вплив DOM 1H-131-206 та DOM 1H-131-206 з С-термінальним аланіновим подовженням визначали у макак-крабоїдів. Окремим групам з 5 макак-крабоїдів дозували досліджувані речовини шляхом 30 хвилинної внутрішньовенної інфузії. Зразки плазми збирали аж до 48 годин після дозування та визначали рівні двох досліджуваних речовин, використовуючи імуноаналіз. Коротко кажучи, біотинильоване антитіло специфічне до досліджуваної речовини додавали до покритого стрептавідином 96-лункового планшету для мікротитрування, після чого додавали зразки плазми макак. Додавали мічені дигоксигеніном людські TNFR1:Fc, після чого додавали пероксидазу з хрину, кон'юговану з анти-дигоксигеніновим антитілом. Додавали кінцевий ТМВ субстрат (доступний з R+D систем), та кількість досліджуваної речовини визначали шляхом зворотного розрахунку калориметричного стгналу зі стандартної кривої досліджуваної речовини.

- 25 Незначні (>2-рази) зміни спостерігали щодо гендерно-усереднених параметрів системного впливу, коли DOM-1H131-206 порівнювали з DOM-1H131-206+A у макак-крабоїдів після внутрішньовенної інфузії. Ми дійшли висновку, що модифікації DOM1H-131-206 за рахунок додавання С-термінального подовження (+A) не впливають на фармакокінетики dAb (показані в таблиці 5).

Таблиця 5

Фармакокінетики DOM1H-131-206 мутантів після
одиничної внутрішньовенної дози у макак-крабоїдів

Вихідний клон	модифікація послідовності	Період напів-виведення з плазми ± допустиме відхилення	Кліренс (мл/хв/кг)	Об'єм розподілення ± допустиме відхилення
DOM 1H-131-206	Немодифікований	2,80 ± 0,32	1,48 ± 0,21	0,25 ± 0,05
DOM 1H-131-206	С-термінальний А	2,57 ± 0,64	2,31 ± 0,49	0,34 ± 0,04

30

Приклад 7a: Експресія DOM1H-131-206 варіантів

- 35 Для визначення чи модифікації VH каркасу, що зменшують зв'язування з вже існуючим ADA, мають вплив на експресію анти-TNFR1 dAb, порівнювали вихід панелі модифікованих варіантів анти-TNFR1 DOM1H 131-206 dAbs з вихідним клоном після росту в 1 літрових ферментаційних ємностях. Досліджуваним dAbs вводили С-термінальне подовження (+A або +ASTKG), з або без

каркасного заміщення (P14A). Досліджувані dAbs експресували в тому самому штамі E. Coli, використовуючи той самий мікробний вектор експресії (pave011 (Avescia)) як немодифікований DOM1H 131-206 (SEQ ID NO 1). В малому масштабі рівня експресії (1л), загальний вихід для dAbs з С-термінальним подовженням +А або +ASTKG був подібним до немодифікованого вихідного клону. Вихід для dAbs з P14A заміщенням та С-термінальним подовженням (+А або +ASTKG) зменшувався в порівнянні з немодифікованим вихідним клоном (Таблиця 6а).

Методика експресії

Стадія "сіяння подовження" завершували шляхом інокуляції в 100 мл колбу перемішування з флакону E. Coli клітин, що експресують dAb конструкт, в мікробний вектор експресії.

Через приблизно 10 годин росту колбу сіяння застосовують, щоб інокулювати 1 л ферментер. Процес продукування проводять аж в три стадії, закладка серії, підживлення та індукування. Початкова фаза закладки триває протягом приблизно 13 годин, протягом якого часу культура росте експоненціально при 37 °C (зі зниженням до 30 °C протягом останніх 4 годин) до тих пір, доки первинне джерело карбону, гліцерин, не буде вичерпано. В той час, коли гліцерин вичерпано, відбувається сплеск розчиненого кисню (DO) та вступають в дію поживні речовини (стадія підживлення). Приблизно через 5 годин після початку подачі поживних речовин (при OD₆₀₀ 75) культуру індують IPTG (стадія індукування) та під час даної фази продукт процесу утворюється та вивільняється в середовище. Серію зупиняють приблизно через 48 годин після індукування та кількісно визначають кількість dAb в супернатанті, використовуючи ВЕРХ.

Таблиця 6а

Експресія титрів DOM1H-131-206 варіантів

Вихідний клон	Модифікація послідовності	Титр зібраного супернатанту (г/л)
DOM1H-131-206	Немодифікований	2,71
DOM1H-131-206	С-термінальний А	3,15
DOM1H-131-206	С-термінальний ASTKG	2,22
DOM1H-131-206	P14A + С-термінальний А	0,29
DOM1H-131-206	P14A + С-термінальний ASTKG	0,18

Висновки з даного експерименту були наступними:

1) DOM1H-131-206+A, DOM1H-131-206+ASTKG та немутантного типу мутанти продемонстрували дуже гарну dAb експресію.

Найвищий титр становив приблизно 3000 мг/л.

2) DOM1H-131-206 P14+A, та DOM1H-131-206 p14+ASTKG мутанти не змогли експресувати dAb в процесі.

3) Як правило, DOM1H-131-206+A та DOM1H-131-206+ASTKG були співставимими з немутантним типом за показниками рівня експресії dAb.

Приклад 7b: Стабільність DOM1H-131-206 з С-термінальним аланіном

Стабільність С-термінального аланінового подовження DOM 1H-131-206+A визначали в людській сироватці, легеневого гомогенаті або печінковому гомогенату, яку вимірювали, використовуючи валідований імуноаналіз, для DOM 1H-131-206 (описано нижче), який детектує DOM 1H-131-206, але є дуже слабким перехресно-реактивним до DOM 1H-131-206+A. Це відбувається завдяки тому, що детектоване антитіло M2.3G10.1G06 сильно зв'язується з DOM 1H-131-206, але слабо з DOM 1H-131-206+A. Формат аналізу застосовує людське TNFR1:Fc, як фіксуючий реагент, та вважається, що він, таким чином, є специфічним для інтактного, функціонального dAb.

Спостерігалось, що плазма мічена 2 мкг/мл DOM 1H-131-206+A давала зчитування ~6,4 нг/мл в даному аналізі, тоді як буфер, мічений 2 мкг/мл GSK2862277 давав зчитування 11,3 нг/мл. Таким чином, перехресна реактивність DOM 1H-131-206+A в DOM 1H-131-206 аналізі становила 0,25-0,5 %.

Для вивчення перетворення в цільну кров людини, легеневого гомогенат людини (10 мг протеїн/мл), або печінковий гомогенат людини (10мг протеїн/мл) вводили 1 мкг/мл або DOM 1H-131-206, DOM 1H-131-206+A або буферу (без додавання лікарського засобу). Після інкубування протягом або 0, 3 год., 6 год. або 24 год., плазму/супернатант збирали центрифугуванням та зразки заморожували до аналізу на DOM 1H-131-206, використовуючи валідований імуноаналіз (робочий діапазон від 0,1 до 10 нг/мл).

Понад 24 год. не було свідчень щодо значного перетворення DOM 1H-131-206+A до DOM 1H-131-206 в будь-якій матриці, які повинні були б доводити шляхом збільшення сигналу в імуноаналізі (завдяки утворенню DOM 1H-131-206). Це означає, що додатковий С-термінальний аланін не є схильним до швидкого протеолітичного розщеплення.

5 Протокол для DOM 1H-131-206 валідованого імуноаналізу

Біотинильований анти-VH mAb (M2.3G10.1G06) розбавляють в буфері для аналізу (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1 % BSA, 0,1 % Tween20, pH 7,5) та додають 100 мкл в кінцевій концентрації 10 нг/мл до кожної лунки нейтравідин-покритого планшету (Pierce). Планшет герметично закривають та інкубують протягом 1 години при 37°C.

10 Планшет для мікротитрування промивають 5 разів по 300 мкл промивного буферу (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20, pH 7,5), використовуючи промивач для планшету.

100 мкл на лунку стандартів, та додають зразки, розбавлені в матриці, та планшет герметично закривають та інкубують з постійним перемішуванням протягом приблизно 2 годин при 37 °C.

15 Планшет для мікротитрування промивають 5 разів по 300 мкл промивного буферу.

додають по 100 мкл на лунку маркованого дигоксигеніном hTNFR1:Fc (1:40,000), та планшет герметично закривають та інкубують з постійним перемішуванням протягом приблизно 2 годин при 37 °C.

Планшет для мікротитрування промивають 5 разів по 300 мкл промивного буферу.

20 додають по 100 мкл на лунку HRP-маркованого мишачого анти-дигоксигенінового антитіла (Abcam)(1:20,000), та розчин, герметично закривають асептичною герметизуючою стрічкою, та планшет герметично закривають та інкубують з постійним перемішуванням приблизно 2 годин при 37 °C.

Планшет для мікротитрування промивають 5 разів по 300 мкл промивного буферу.

25 додають по 100 мкл на лунку TMB субстрату (Thermo), та планшет інкубують з постійним перемішуванням протягом приблизно 5 хвилин при кімнатній температурі.

додають по 100 мкл на лунку TMB субстрат зупиняючого розчину (Sigma), та зчитують поглинання на 450 нм для кожної лунки, використовуючи планшетний рідер. Апроксимують, що стандартна крива відповідає 1/x зваженому логістичному алгоритму чотирьох параметрів, використовуючи SMS2000 та невідомі зразки інтерполюють з кривої.

30 Приклад 7с: Здатність DOM1H-131-206 з С-термінальним аланіновим подовженням (+A) інгібувати TNFR1 сигнал трансдукції:

TNF α передає сигнал через NF κ B шляхи та в результаті призводить до секреції різних цитокінів, включаючи IL-8. В нестимульованих клітинах IL-8 mRNA швидко розкладається. Однак, в присутності TNF α , активація NF κ B шляху призводить до стабілізації IL-8 mRNA. Дана стабілізація в результаті призводить до зростання mRNA та робить внесок в індукцію IL-8 секреції. Тому, визначають, що в даному аналізі індукція секретованого IL-8 є такою, що додавання С-термінального подовження впливає на здатність DOM1H-131-206 або DOM1H-131-206+A (тобто С-термінальне аланінове подовження) інгібувати TNFR1 сигнальну трансдукцію. Дані дослідження проводили на клітинних лініях людини та макаки-крабоїда, та також на цільній крові людини та макаки-крабоїда. Порівняння значень IC₅₀ демонструють, що подовження С-кінця DOM1H-131-206, яке зменшує зв'язування з вже існуючим ADA, негативно не впливає на здатність DOM1H-131-206 інгібувати сигнальну трансдукцію через TNFR1 в клітинах або людини, або макаки-крабоїда (таблиця 6b).

45 Протокол визначення інгібування TNF α -індукованого IL-8 в людських легеневи фібробластах

Здатність DOM1H-131-206 або DOM1H-131-206+A попереджувати зв'язування людського TNF α з людським TNFR1 та інгібувати IL-8 секрецію визначали, використовуючи клітини людської легеневої фібробласти MRC-5 (ATCC). MRC-5 клітини інкубували з досліджуваних зразків протягом однієї години, після чого додавали TNF α (220 пг/мл). Після інкубування при 37°C та 5 % CO₂ протягом 24 годин супернатанти збирали та зберігали при -20°C до тих пір, доки не виконували MSD™ аналіз на IL-8 відповідно до протоколу виробника для зразків культур тканин. перед аналізом супернатанти розбавляли 1 до 12 в калібровочному розріджувачі, що постачається. Апроксимацію кривої проводили в GraphPad Prism з метою визначення IC₅₀.

Протокол визначення інгібування TNF α -індукованого IL-8 в A549 клітинах

A549 клітини висівали в 96-лункові планшети з густиною 2×10^4 клітин/лунка та інкубували протягом ночі при 37°C та 5 % CO₂, що давало прилипання. Потім клітини інкубували протягом однієї години в присутності DOM1H-131-206 або DOM1H-131-206+A при різних концентраціях в діапазоні 0,01 нМ-1000 нМ. Кожну концентрацію досліджували в дублюючих лунках. Після

інкубування при 37°C та 5 % CO₂ протягом 24 годин супернатанти збирали та зберігали при -20°C до тих пір, доки не виконували MSD™ аналіз на IL-8 відповідно до протоколу виробника для зразків культур тканин. перед аналізом супернатанти розбавляли 1 до 5 в калібровочному розріджувачі, що постачається. Параметри кривої та IC₅₀ значення розраховували, використовуючи XLFit.

Протокол визначення інгібування TNFα-індукованого IL-8 в CYNOM-K1 клітинах

CYNOM-K1 клітини інкубували протягом однієї години в присутності DOM1H-131-206 або DOM1H-131-206+A при різних концентраціях, починаючи з 100 нМ. Після чого відбувалась стимуляція TNFα при кінцевій концентрації 1 нг/мл. Після інкубування при 37°C та 5 % CO₂ протягом 24 годин супернатанти збирали та зберігали при -20°C до тих пір, доки не виконували MSD™ аналіз на IL-8 відповідно до протоколу виробника для зразків культур тканин. перед аналізом супернатанти розбавляли 1 до 12 в калібровочному розріджувачі, що постачається. Апроксимацію кривої проводили в GraphPad Prism з метою визначення IC₅₀.

Протокол визначення інгібування TNFα-індукованого IL-8 в цільній крові людини

Кров від здорових волонтерів-донорів (за відповідної згоди, що не протирічить UK Human Tissue Act) збирали в гепарин натрію. Середовище для аналізу готували шляхом додавання 1 % BSA до RPMI-1640 середовища (без фенолу червоного). DOM1H-131-206 або DOM1H-131-206+A та V_H контрольний дослід dAb розбавляли в 96-лункових планшетах в середовищі для аналізу таким чином, що кінцева концентрація після додавання крові становила 800 нМ, та серійно розбавляли 1 до 2 аж до 0,01 нМ. Додавали 130 мкл крові на лунку, та планшети інкубували протягом однієї години (37°C, 5 % CO₂), що дозволяло зв'язування з TNFR1. Потім зразки крові стимулювали 10 мкл TNFα, розбавленими в середовищі для аналізу таким чином, що кінцева концентрація становила 10 нг/мл. Кожну умову досліджували в повторі. Після наступних 24 годин інкубування (37°C, 5 % CO₂), додавали 110 мкл PBS на лунку, що збільшувало об'єм зразків, які потім перемішували на планшетному шейкері протягом 10 хвилин на 500 обертах на хвилину та центрифугували на 1500 обертах на хвилину протягом 5 хвилин. Плазму переносили до нового планшета та зберігали при -80°C до тих пір, доки не виконували IL-8 MSD™ аналіз відповідно до протоколу виробника для зразків сироватки та плазми. Параметри кривої та значення IC₅₀ розраховували, використовуючи XLFit.

Протокол визначення інгібування LPS-індукованого IL-8 в цільній крові макаки-крабоїда

12 мл крові від 4 макак-крабоїдів збирали в гепарин натрію. Середовище для аналізу готували шляхом додавання 1 % BSA до RPMI-1640 середовищ (без фенолу червоного). DOM1H-131-206 або DOM1H-131-206+A та V_H контрольний дослід dAb розбавляли в 96-лункових планшетах в середовищі для аналізу до 15X кінцевої концентрації. Кожну концентрацію досліджували в трьох повторях. Додавали по 130 мкл крові на лунку, та планшети інкубували протягом однієї години (37°C, 5 % CO₂) перед стимулюванням 10 мкл LPS, розбавленим в середовищі для аналізу таким чином, що кінцева концентрація становила 94 нг/мл. Планшети потім інкубували протягом додаткових 24 годин (37°C, 5 % CO₂). Після інкубування, додавали по 110 мкл PBS на лунку, щоб збільшити об'єм зразків, які потім перемішували на планшетному шейкері протягом 10 хвилин на 500 обертах на хвилину та центрифугували на 2000 обертах на хвилину протягом 5 хвилин. Плазму переносили до нового планшета та зберігали при -80°C до тих пір, доки не вимірювали IL-8, використовуючи MSD™ аналіз для людського IL-8, який виконували відповідно до протоколу виробника для зразків сироватки та плазми. Плазму в аналізі не розбавляли. Параметри кривої та IC₅₀ значення розраховували, використовуючи XLFit.

Таблиця 6b

короткий висновок щодо ефективності DOM1H-131-206 в порівнянні з DOM1H-131-206+A в аналізах на основі клітин людини та макаки:

	IC ₅₀ (nM) ± Допустиме відхилення	
	DOM1H-131-206	DOM1H-131-206+A
MRC5 людський легеневи фібробласт (n=3)	4,8± 2,4	3,5 ± 2,5
A549 людський легеневи епітелій (n=2)	1,0 ± 0,23	1,0 ± 0,28
CYNOMK1 шкірні фібробласти макаки-крабоїда (n=2)	4,8± 0,4	4,7± 0,7
Цільна кров людини (n=3-5)	1,6 ± 1,0	0,9 ± 0,3
Цільна кров макаки-крабоїда (n=3)	0,5 ± 0,4	0,4 ± 0,3

Приклад 7d: Застосування DOM1h-131-206 доменного антитіла для лікування псоріазу

В даних дослідженнях DOM1h-131-206 доменне антитіло (що має амінокислотну послідовність, показану SEQ ID NO: 1) застосовували, а також ортологи гризунів даного доменного антитіла. Одержані дані з цими молекулами застосовували для вибору доз, та протоколи лікування, описані в даному документі, слід застосовувати для лікування псоріазу, та псоріатичних плям, пацієнтам-людям слід вводити або DOM1h-131-206 (що має амінокислотну послідовність, показану в SEQ ID NO: 1), або DOM1h-131-206 ADA фіксовану молекулу з термінальним аланіном (що має амінокислотну послідовність, показану в SEQ ID NO: 16), або DOM1h131206 ADA фіксовану молекулу, що містить будь-який фіксований ADA (тобто будь-якої модифікації, що зменшує зв'язування dAb з ADAs), як є розкритим в даному документі.

Наприклад, фармакокінетики, одержанні з досліджень *in vivo* з макаками-крабоїдами, показали, що DOM1h-131-206 доменне антитіло (з амінокислотою послідовністю, показаною в SEQ ID NO: 1) мають кліренс плазми 2,4 мл/хв/кг, які наближаються до рівня гломерулярної фільтрації (GFR) у макак та дають період напіввиведення виділення приблизно 3 години. Об'єм розподілення для даного доменного антитіла становив 0,26 л/кг, який прирівнюють приблизно до екстраваскулярного об'єму та пропонують розподіл поза центральним/плазматичним компартментом. Коли DOM1h-131-206 доменне антитіло вводили в екстраваскулярний компартмент (наприклад, коли інгаляційно вводять в легені), то існує тільки невелика зміна в періоді напіввиведення виділення, що спостерігається, яка відображає швидкість абсорбції, що обмежує кінетику.

Більш того, при наступному внутрішньошкірному дозуванні ортолога гризуна анти-TNFR1 dAb ("Dom1m-15-12") мишам спостерігати навіть більш довге відставання абсорбції. Це може бути пов'язано з більшою різницею між GFR та кліренсом швидкості абсорбції після дозування внутрішньошкірним шляхом. Швидкість кінцевого виділення, яка спостерігалась, в плазмі миші становила приблизно 40 хвилин, яка була більшою, ніж та, що після внутрішньовенної доставки (приблизно 20 хвилин). Повільніша швидкість виведення (K_e), яку спостерігають в плазмі після внутрішньошкірної доставки, була підтвердженою РК дермальної тканини, яка показала швидкість кінцевого виділення 5-7 годин (K_e 0,1-0,14 год.⁻¹), хоча оцінювали, що фракція дози, що приводить в дію очевидну пролонговану швидкість виділення була невеликою (0,5 %). Швидкість дермальної абсорбції (K_a) в плазму визначали з дослідження на щурах з внутрішньошкірного дозування dAb ортолога гризуна, та була відносно швидкою (K_a=4,1 год.⁻¹), що в результаті призводить до спостережуваного T_{max} приблизно через 1 годину після введення дози. Встановлено, що 10 % від доменного антитіла утримувалось в дермальному компартменті у щура з допустимою швидкістю виділення з шкіри подібної до миші. Таким чином, складається враження, що після внутрішньошкірної ін'єкції, DOM1h-131-206 доменне антитіло розподіляється до васкуляризованих тканин в шкірі (наприклад, дерму), де швидко екстрагується в плазму та виводиться за рахунок ниркової фільтрації. Початкова фаза розподілення та абсорбції через тканини шкіри відображається в латентний час абсорбції перед дією плазми, щоб стати здатною для вимірювання. Враховуючи анатомічні відмінності між

шкірою гризуна та людини, очікувалось, що швидкість абсорбції у людей є довшою, що, в свою чергу, призвело б до зменшеної/невимірюваною дією плазми на DOM1h-131-206 доменне антитіло. Це означає, що прогнозована дія плазми людини ґрунтується на спостереженнях з досліджень на гризунах та, тому, служить як консервативна оцінка дії плазми у людей.

DOM1h-131-206 доменне антитіло (що має амінокислотну послідовність, показану в SEQ ID NO: 1) також дозували здоровим волонтерам шляхом внутрішньовенної інфузії (аж до 3 годин тривалістю) аж до 2 мг/кг та в тривалому дослідженні шляхом інгаляції здоровим волонтерам. Отримані фармакокінетичні параметри, як правило, дуже добре узгоджувалися з доклінічними даними у макак-крабодів. Після внутрішньовенного введення кліренс становив 0,6-1,5 мл/хв/кг (GFR у людини приблизно 1,8 мл/хв/кг) з одержаним в результаті період напіввиведення виділення 5 годин. Об'єм розподілення, приблизно 0,3 л/кг, був подібним до екстраваскулярного об'єму. Швидке розподілення DOM1h-131-206 доменного антитіла в екстраваскулярному компартменті було підтверджене шляхом вимірювання бронхоальвеолярного зрошення (легневі епітеліальні рідини вистилки) після IV введення. Рівні легеневої екстраваскулярної рідини становили приблизно 4-14 % рівнів плазми, які вимірювали через 5 годин від початку дозування через 3 години інфузії.

Прогнози щодо ефективності у людей встановлювали, ґрунтуючись на даних оцінки впливу, що спостерігається та передбачається, в дермальному компартменті та *in vitro* клітинної лінії людини. IC₅₀ знаходиться в діапазоні (8-40 нг/мл) в даних *in vitro* системах (різної складності та типу клітин) застосовували для мінімальних рівнів мішеней в дермальному компартменті та полегшеному виборі доз доменного антитіла, та протоколів лікування для лікування псоріазу, та псоріатичних плям, у пацієнтів-людей, описаних в даному документі. Наприклад, вихідну дозу 0,5 мг вибирали, щоб досягти дію плазми, припускаючи найгірший випадок системного впливу, нижчий, ніж даний досягнутий при FTIH внутрішньовенному дослідженні у ADA позитивних суб'єктів. На даний вихідній початковій дозі очікується, що TNFR1 опосередкований сигналінг інгібується в дискретній зоні навколо місця ін'єкції (< 2 см² площі поверхні) на рівні ≥ 90 % безпосередньо після дозування. TNFR1 інгібування протягом часу залежить від кількості лікарського засобу, який доставляється, утримується та потім виділяється з дермального компартменту. Припускаючи мінімум (10 % дермальне затримання та Ke 0,1-0,14 год.⁻¹ як у щура), очікується, що рівні будуть підтримуватися ≥ IC₅₀ (в зоні ін'єкції/дослідження) протягом мінімум 3 днів після інтрадермальної ін'єкції 0,5 мг DOM1h-131-206 доменного антитіла.

Для вибору доз доменного антитіла та передбачення протоколів лікування вивчали дію людської плазми після інтрадермального дозування DOM1h-131-206 доменного антитіла. Дані передбачення припускали максимально можливу дію, яка могла б досягатися для інтрадермальної ін'єкції. Фактична дані концентрація-час в людській плазмі від внутрішньовенно введенного DOM1h-131-206 доменного антитіла застосовували в людській дермальній РК моделі з фіксованою швидкістю абсорбції (масштабується від дермальної абсорбції гризунів) та 100 % біодоступності. Профіль концентрація-час в людській плазмі для максимальної(их) дози(и) домену та протоколи лікування, описані в даному документі (2 мг щотижня + 0,5 мг один раз в два тижні) потім перевіряли. Дані виявлені передбачені пікові концентрації плазми швидко досягаються T_{max} в межах 30 хв після дози, та рівні швидко падали до рівнів нижчих поточного аналізу плазми, нижчих обмеження кількісного визначення (0,1 нг/мл) в межах 24 годин. Ненакопичення повторного дозування очікували в плазмі навіть, використовуючи дане передбачення максимальної можливої дії. Однак, дане передбачення представляє собою найвищу можливу дію плазми та можливі дії могли б бути значно нижчими, ніж передбачені, та навіть такими низькими, що дія плазми не може бути виміряною. Використовуючи мішенні рівні інгібування (ґрунтуючись на основних аналізах клітин *in vitro*) передбачалось, що IC₉₀ (відразу після введення дози) або IC₅₀ (поглиблення) рівні в шкірі в протоколах лікування, описаних в даному документі, будуть знаходитись в діапазоні 30-80 нг/мл або 8-40 нг/мл, відповідно.

ґрунтуючись на зазначеній вище інформації передбачувані дії плазми (C_{max} та AUC) для першої дози, максимальна денна доза та накопичена доза, протягом 28 днів, показана в наступній таблиці 6b разом з межами безпеки протягом протягом доклінічного дослідження.

Таблиця 6b

Перша доза – 0,5 мг щотижня			Комплексна безпека ¹
C _{max}	52	нг/мл	933
AUC _(0-48h)	117	нггод./мл	2137
AUC _(0-28d)	464	нггод./мл	537
Максимальна доза - 2 мг щотижня + 0,5 мг раз в два тижні			
C _{max}	260	нг/мл	187
AUC _(0-48h)	583	нггод./мл	427
AUC _(0-7d)	700	нггод./мл	356
AUC _(0-28d)	2800	нггод./мл	89

За 14 днів повторюють дозу макакам-крабоїдам відповідно до належної лабораторної практики токсикологію досліджують у самців мавп (20 мг/кг/day), ґрунтуючись на середніх значеннях для ссавців (днів 1, 4 та 14) дій (C_{max} та AUC_(0-24h) 48,5 мкг/мл та 249 мкг·год./мл, відповідно).

Нарешті, інформацію, представлену вище з досліджень *in vitro*, досліджень *in vivo* та відповідних аналізів застосовували для вибору доз доменного антитіла та протоколів лікування, прийнятних для лікування псоріазу у пацієнтів-людей.

Введення доменного антитіла відповідно до протоколу лікування, як розкрито в даному документі, є корисним в лікуванні псоріазу. Ефективність доменного антитіла в лікуванні псоріазу, наприклад, в конкретному протоколі лікування, може бути підтверджена шляхом або вимірювання сонографією та/або клінічним оцінюванням.

Сонографічні, високочастотні ультразвукові вимірювання можуть виконувати, використовуючи 20 МГц високочастотний сонограф (DUB USB, Taberna pro Medicum, Lueneburg). Послідні А-скани можуть бути комбінованими та представлені на моніторі як частина шкіри. Латеральна роздільна здатність приблизно 200 мкм та аксіальна роздільна здатність 80 мкм є можливими та переважними. В залежності від ехоструктур, присутніми є компоненти епідермісу, дерми та субкутису, та точне вимірювання товщини шкіри є можливим. Запальний псоріатичний інфільтрат в місці псоріатичної плями має вигляд чітко визначеної ехо смуги прсвітлення нижче вхідного ехо. Товщину псоріатичної ехо смуги прсвітлення можуть визначати та документувати перед введенням доменного антитіла та після введення доменного антитіла. Товщину можуть вимірювати в мкм. Зменшення товщини псоріатичної ехо смуги прсвітлення після введення доменного антитіла демонструє, що введення доменного антитіла, наприклад, відповідно до протоколу лікування, розкритого в даному документі, є ефективним в лікуванні псоріазу та псоріатичної плями у пацієнта-людини. Дивись, наприклад, Bangha et al., 9 Skin Pharmacol. 298 (1996).

Клінічні оцінювання можуть виконувати, використовуючи 5-бальне визначення шляхом порівняння клініки псоріатичної плями, що лікується, в якій доменне антитіло ін'єкційно вводили, щонайменше, з однією нелікованою плямою поблизу псоріатичної плями, яку лікують. Відповідно до даного порівняння призначали наступні бали клінічного оцінювання (бали клінічного оцінювання становлять 0 при визначенні перед першим введенням доменного антитіла):

-1 = погіршився

0 = не змінився (без ефекту)

1 = незначне покращення

2 = чітке покращення, але не повністювилікувався

3 = повністювилікувався.

Таким чином, на основі цього, підвищений бал клінічного оцінювання після введення доменного антитіла відповідно до протоколу лікування, як розкрито в даному документі, демонструє ефективність в лікуванні псоріазу та псоріатичної плями у пацієнта-людини.

Приклад 8: Одиначне аланінове подовження до VHH клонів.

ADA зв'язування з VHH спостерігали, використовуючи аналіз підтвердження, який застосовували в прикладі 2 (для DOM1H-131-206). З метою підтвердження, що подібне інгібування ADA зв'язування могло б досягатися шляхом модифікування VHH послідовності, досліджували три VHH клони з амінокислотними послідовностями, як показано на фігурі 2 (d), (e) та (f):

Клон VHH2(d) є біспецифічного формату, що має IL6R зв'язуючий модуль, зв'язаний за рахунок GGGGSGGGS зі зв'язуючим модулем альбуміну сироватки людини, як описано в WO2010100135. (Амінокислотна послідовність показана на фігурі 2 d: SEQ ID NO 4)

Клон VHH2(e) є біспецифічного формату, що має TNF зв'язуючий модуль, зв'язаний зі зв'язуючим модулем альбуміну сироватки, який в свою чергу, зв'язаний з TNF зв'язуючим модулем, використовуючи GGGGSGGGS як лінкер, як описано в WO2010077422. (Амінокислотна послідовність показана на фігурі 2 e: SEQ ID NO 5)

Клон VHH2(f) є бівалентного моноспецифічного формату, що містить дві ідентичні молекули, зв'язані за рахунок Ala-Ala-Ala лінкеру, кожна молекула є dAb, який може зв'язувати A1 домен фактору фон Віллебранда, як показано в WO2009115614A2. (Амінокислотна послідовність показана на фігурі 2 f: SEQ ID NO 6)

Всі три клони, зазначені вище, були модифіковані шляхом додавання С-термінального аланіну в кінець серинового залишку, та модифіковані й немодифіковані клони порівнювали, використовуючи аналіз з прикладу 2. Як може бути видно нижче в таблиці 7 та на фігурі 4, результати показують, що С-термінальне подовження одиничним аланіновим амінокислотним залишком знижує ADA зв'язування.

Таблиця 7

Зразок	VHH2(d)	VHH2(d)+A	VHH2(e)	VHH2(e)+A	VHH2(f)	VHH2(f)+A
Середній % інгібування	93,23	18,86	94,93	16,95	94,15	17,46

Приклад 9: Кількість здорових суб'єктів зі вже існуючим ADA до низки молекул на основі V_H та V_L dAb

ADA методика аналізу

Подібно до методики, описаної в прикладі 1 для DOM1H-131-206, досліджували молекули (DOM 1H-131-206 (SEQ ID NO 1), DOM 1H-131-206+С-термінальне аланінове подовження (SEQ ID NO 16), mAb-VH (SEQ ID NO), пептидна-VL послідовність, VH-VL (SEQ ID NO 11), "735 молекула (SEQ ID NO 30 та 31), біотинилували, проводили обмін буферу та зберігали в буфері для формулювання. Дані досліджували молекули, до того ж, мітили рутенієм та потім проводили обмін буферу та зберігали в буфері для формулювання.

Аналіз щодо утворення зшивки анти-медикаментозного антитіла (ADA) для кожної молекули виконують на MSD™ ECL (електрохемілюмінесценція) технологічній платформі, як описано раніше.

Коротке викладання методики аналізу, яку застосовують в даному експерименті, описується нижче:

1. MSD™ стрептавідиновий планшет блокують 150 мкл/лунка блокуючого казеїну в PBS (1 %) при кімнатній температурі (RT) протягом 1-2 годин. Блокатор видаляють без промивання.
2. Після 1 години попереднього інкубування, гомогенна суміш, що містить 0,1 мкг/мл біотинильованої досліджуваної молекули, 0,1 мкг/мл рутенильованої ("Sulfo-Tag"™) досліджуваної молекули, та 2 % зразок сироватки в розріджувачі для аналізу (1 % казеїн в PBS) переносять в MSD™ планшет та інкубують протягом 1 години \pm 5 хвилин при к.т.

3. MSD планшет потім промивають 3 рази PBST.

4. додають 150 мкл/лунка буферу зчитування та планшет зчитують.

Зазначені вище концентрації та часи інкубування застосовували для DOM1H-131-206 молекули.

Кваліфікованому фахівцю буде зрозуміло, що точні концентрації та часи інкубування будуть оптимізовувати, наприклад, DOM1H-131-206 (та модифікованих версій) може мати дещо відмінні концентрації та часи інкубування в порівнянні з, наприклад, DOM10H-53-567 або пептидною-VL послідовністю.

Панель зразків сироватки від 100 здорових донорів-людей скринінгували щодо реактивності в аналізі. Вже існуючі антитіла (ADA) щодо варіабельного легкого ланцюга (VL), каркас також детектували в нормальних зразках сироватки люди, хоча при нижчій величині та частоті, ніж ті, що раніше спостерігались щодо V_H та V_{HH} доменів (дивись, фігура 4). Результати показані на фігурі 5, де Y вісь показує рівні зв'язування з ADAs, та V_H dAbs мали найнижчий показник ADA зв'язування.

Висновками були: результати показані на фігурі 5, демонструють рівні вже існуючих ADAs зв'язування з DOM 1H-131-206 та ефект від додавання С-термінального подовження на зв'язування модифікованого DOM 1H-131-206 з ADAs. Також на фігурі 5 може спостерігатись,

що вже існуючі ADAs зв'язування з VH dAb також спостерігались, коли він зливається з mAb (mAb-VH). Фігура 5, крім того, показує, що мають місце зв'язування вже існуючих ADAs з V каппа (Vκ) (VL) dAbs, та показані приклади включають пептид:VL, VH-VL злиття та mAb-VL злиття.

Приклад 10: Амінокислотне подовження до VL каркасу

Оскільки вже існуючі антитіла щодо VL (VK) каркасу також були виявлені в нормальних зразках сироватки людини, хоча, як правило, на нижчому рівні, ніж спостерігали щодо VH каркасу (дивись, фігуру 5), то визначали які модифікації C-термінальної ділянки VK dAbs могли б знижувати вже існуючі ADA зв'язування, як було доведено для молекул, що містять VH.

Ґрунтуючись на mAb:лінкер:VL молекула (визначена "735 – дана молекула є "mAbdAb" – це є IL-13mAb:лінкер:IL-4 (v Каппа) dAb), панель досліджуваних mAb:лінкер: VL молекули генерували за стандартним сайт-спрямованим мутагенезом, та які містили однакову VL dAb послідовність, але мали різні C-термінальні модифікації VL dAb. Дані досліджувані речовини, визначені як "15014", "15019", "15020" та "15021", створювали так, щоб мати C-термінальне подовження (+AAA, +T або +TV), або щоб мати C-термінальну делецію (-R) (показану нижче в таблиці 8).

Досліджувані речовини аналізували, використовуючи "аналіз підтвердження", як описано нижче, подібно до того, що описано раніше для VH dAbs. Дослідження сполуки виконували шляхом оцінювання здатності окремих сполук конкурувати з міченими аналіз-специфічними сполуками щодо зв'язування з вже існуючими антитілами. Будь-які потенційні зниження сигналу в аналізі представляли як % інгібування. Рівні відсотку інгібування більші, ніж попередньо визначені підтверджуючі точки перетину для такого конкретного аналізу, передбачає, що досліджувана сполука конкурує зі специфічною сполукою аналізу щодо зв'язування з анти-VK антитіла, та таким чином може розділяти епітоп(и) зі специфічною сполукою аналізу.

Методика "735 ADA аналізу підтвердження procedure, яку застосовують для вимірювання частоти вже існуючого ADA з V каппа:

1. В планшеті для мікротитрування аналізу інкубують зразок 2 % ADA позитивної сироватки в розріджувачі для аналізу (1 % казеїн в PBS) протягом 1 години ± 5 хвилин при к.т. з кінцевою концентрацією 10 мкг/мл "735 або іншої досліджуваної речовини, такої як модифіковані dAbs.

2. Після 1 години попереднього інкубування, гомогенну суміш, що містить 0,05 мкг/мл біотинильованого "735 та 0,05 мкг/мл рутенільованого ("Sulfo-Tag"™) "735, в розріджувачі аналізу (1 % казеїн в PBS) додають до планшету аналізу та інкубують протягом ночі при к.т.

3. Після інкубування, MSD планшет потім промивають тричі PBST, зразки аналізу переносять в MSD планшет, та планшет інкубують протягом 1 години ± 5 хвилин в темряві при к.т.

4. MSD™ планшет потім промивають тричі PBST.

5. додають 150 мкл/лунка буферу зчитування та планшет зчитують.

Результати скринінгу даних сполук представлені в таблиці 8. Всі з досліджуваних C-термінальних модифікацій (+AAA, +T, +TV та -R) показали знижене інгібування в "735 аналізі підтвердження. Це передбачає, що C-термінальні модифікації VL dAbs знімають зв'язування вже існуючих антитіл (ADAs) подібним способом з VH dAbs.

Таблиця 8

Оцінювання ADA зв'язування mAb:VL "735 мутантів

Клон	Модифікація послідовності (зроблена з dAb компонентою mAbdAb молекули)	% інгібування в аналіз підтвердження (середнє значення з 7 донорів-суб'єктів)	% суб'єктів з ADA зв'язуванням
'735	Немодифікований	74,92	100
15014	+AAA	-4,40	14,29
15019	+T	12,88	14,29
15020	+TV	8,53	0
15021	-R	20,08	0

Приклад 11: Амінокислотне подовження до VH каркасного DOM10H-53-567 (анти-IL-13 dAb)

Оскільки C-термінальні модифікації анти-TNFR1 VH dAb DOM 1H-131-206 зменшували зв'язування вже існуючого ADA, визначали яка модифікація C-кінця могла зменшити ADA зв'язування з відмінною VH молекулою. C-термінальні модифікації робили в VH каркасі DOM10H-53-567, використовуючи сайт-спрямовані способи мутагенезу. Молекули із заміщеннями (досліджувані речовини) аналізували, використовуючи "аналіз підтвердження", описаний раніше.

- Подовження С-кінця DOM10H-53-567 також значно зменшувало зв'язування вже існуючого ADA (результати показані нижче в таблиці 9). Це ілюструється шляхом подовження A, AS, AST, ASTK, ASTKG та ASTKG. Дані модифікації не демонструють негативний вплив на здатність DOM10H-53-567 клонів зв'язувати та інгібувати його мішенний антиген IL-13 як підтверджується аналізом щодо активності IL-13 dAb, описаним нижче, та результати показані в таблиці 9b.

Таблиця 9a

Оцінювання ADA зв'язування DOM10H-53-567 мутантів

Вихідний клон	Модифікація послідовності	% інгібування в аналізі підтвердження (середнє значення від 10 донорів суб'єктів)	% суб'єктів з ADA зв'язуванням
DOM 10H-53-567	Немодифікований	95,06	100
DOM 10H-53-567	С-термінальний A	12,84	10
DOM 10H-53-567	С-термінальний AS	14,79	10
DOM 10H-53-567	С-термінальний AST	29,02	20
DOM 10H-53-567	С-термінальний ASTK	27,67	20
DOM 10H-53-567	С-термінальний ASTKG	13,39	10

Протокол аналізу щодо IL-13 dAb активності:

- Біоаналіз застосовували для вимірювання здатності варіантів DOM10H-53-567 молекули, щоб інгібувати продукування рекомбінантної людської IL-13-стимульованої лужної фосфатази в HEKBlue-STAT6 клітинах *in vitro*. HEK-STAT6 клітини (Invivogen) (які експресують секретовану ембріональну лужну фосфатазу (SEAP) під контролем STAT6-залежного промотору) висівали в 96-лункові планшети. людський IL-13 в концентрації 3 нг/мл та серії розбавлення DOM1-H-53-567 молекул попередньо врівноважували протягом 1 години при кімнатній температурі, та потім додавали до клітин протягом 24 годин при 37 °C. Після інкубування, концентрації SEAP, продукованого клітинами, в супернатанті, як результат IL-13 стимуляції, визначали шляхом додавання Quanti-Blue (Invivogen) та одержання оптичної густини, зчитуючи на 640 нм. IC50 значення розраховували за кривими дози відповіді, використовуючи Graphpad Prism.

Таблиця 9b

Оцінювання активності для DOM10H-53-567 мутантів

Вихідний клон	Модифікація послідовності	Середнє значення IC50 (нМ) для інгібування IL-13, індукованого SEAP (середнє значення від 2 та 4 експериментів)
DOM 10H-53-567	Немодифікований	0,56
DOM 10H-53-567	С-термінальний A	0,59
DOM 10H-53-567	С-термінальний AS	0,56
DOM 10H-53-567	С-термінальний AST	0,68
DOM 10H-53-567	С-термінальний ASTK	0,75
DOM 10H-53-567	С-термінальний ASTKG	0,40

Подовження С-кінця DOM10H-53-567, яке зменшувало зв'язування вже існуючого ADA, не демонструвало негативний вплив на здатність DOM10H-53-567 dAbs зв'язувати та інгібувати їх мішенний антиген (людський IL-13).

Приклад 12a: Клонування анти-VEGF VH/Vk dAb-Fc-dAb молекул з модифікованими С-кінцями

Vh-Vk dAb-Fc-dAbs з модифікаціями, зробленими до С-кінця Vk dAb частини: DMS30047-30054 були сконструйовані шляхом генерування послідовностей Vk dAb варіанту за допомогою PCR та потім шляхом переклонування в DMS30045 (SEQ ID NO 40) та DMS30046 (SEQ ID NO 41), відповідно, щоб згенерувати модифіковані вектори експресії ссавців. З DMS30045: (i) С-термінальний аргініновий залишок видаляли, щоб утворити DMS30047 (DMS30037-R), (ii) С-термінальний аланін додавали, щоб утворити DMS30048 (який є DMS30037+A) (SEQ ID NO 43), (iii) три С-термінальні аланіни додавали, щоб утворити DMS30049 (DMS30037+AAA) (SEQ ID NO

44), та С-термінальний треонін додавали, щоб утворити DMS30050 (DMS30037+T) (SEQ ID NO 45). З DMS30046 (SEQ ID NO 41): (i) С-термінальний аргініновий залишок видаляли, щоб утворити DMS30051 (DMS30038-R) (SEQ ID NO 46), (ii) С-термінальний аланін додавали, щоб утворити DMS30052 ((DMS30038+A) (SEQ ID NO 47), (iii) три С-термінальні аланіни додавали, щоб утворити DMS30053 (DMS30038+AAA) (SEQ ID NO 48), та С-термінальний треонін додавали, щоб утворити DMS30054 (DMS30038+T) (SEQ ID NO 43).

Описи молекул, зазначених вище є наступними:

DMS30045: DOM15-26-597 dAb N-(VEPKSSDK лінкер) & С-термінальний K-044-085 dAb ((TGLDSP)x4), DMS30046: DMS1576 з С-термінальним K-044-085 dAb ((TGLDSP)x4), DMS30047 (містить модифікований С-кінець): DOM15-26-597 dAb N-(VEPKSSDK лінкер) & С-термінальний K-044-085 dAb мінус С-термінальний R ((TGLDSP)x4), DMS30048 (містить модифікований С-кінець): DOM15-26-597 dAb N-(VEPKSSDK лінкер) & С-термінальний K-044-085 dAb+A ((TGLDSP)x4), DMS30049 (містить модифікований С-кінець): DOM15-26-597 dAb N-(VEPKSSDK лінкер) & С-термінальний K-044-085 dAb+AAA ((TGLDSP)x4), DMS30050 (містить модифікований С-кінець): DOM15-26-597 dAb N-(VEPKSSDK лінкер) & С-термінальний K-044-085 dAb+T ((TGLDSP)x4), DMS30051 (містить модифікований С-кінець): DMS1576 з С-термінальним K-044-085 dAb мінус С-термінальний R ((TGLDSP)x4), DMS30052 (містить модифікований С-кінець): DMS1576 з С-термінальним K-044-085 dAb+A ((TGLDSP)x4), DMS30053 (містить модифікований С-кінець): DMS1576 з С-термінальним K-044-085 dAb+AAA ((TGLDSP)x4), DMS30054 (містить модифікований С-кінець): DMS1576 з С-термінальним K-044-085 dAb+T ((TGLDSP)x4) (амінокислотні послідовності молекул показані на фігурі 12 та SEQ ID NO 40-49).

Приклад 12В: Модифікації С-термінальної ділянки VEGF V_K dAb гантельних молекул DMS30037 та DMS30038 зменшували зв'язування з вже існуючими антитілами

Методика V каппа ADA аналізу підтвердження, яку застосовують для вимірювання кількості вже існуючого ADA з V каппа:

1. В планшеті для мікротитрування аналізу, зразок 10 % ADA позитивної сироватки в розріджувачі для аналізу (1 % казеїн в PBS) інкубують протягом 1 години ± 5 хвилин при к.т. з кінцевою концентрацією 10 мкг/мл досліджуваної речовини, такої як модифіковані dAbs.

2. Після 1 години попереднього інкубування, ADA позитивну сироватку/досліджувану речовину додають до планшету аналізу з гомогенною сумішшю, що містить біотинильований V каппа dAb (немодифікований) та рутинильований ("Sulfo-Tag"™) "V каппа dAb (немодифікований) з кінцевою концентрацією приблизно 0,025 мкг/мл біотинильованого dAb, приблизно 0,0125 мкг/мл рутинильованого ("Sulfo-Tag"™) dAb, та 5 % ADA позитивної сироватки в розріджувачі аналізу (1 % казеїн в PBS). Планшет інкубують протягом 1 години ± 5 хвилин при к.т.

3. MSD™ стрептавідиновий планшет блокують 150 мкл/лунка блокуючого казеїну в PBS (1 %) при кімнатній температурі (RT) протягом 1-2 годин. Блокатор видаляють без промивання.

4. Після 1 години попереднього інкубування, гомогенну суміш додають до MSD™ стрептавідинового планшету аналізу та інкубують протягом 1 години ± 5 хвилин при к.т.

5. Після 1 години інкубування, MSD планшет далі тричі промивають PBST, зразки аналізу переносять в MSD планшет, та планшет інкубують протягом 1 години ± 5 хвилин в темряві при к.т.

6. MSD™ планшет потім тричі промивають PBST

7. Додають 150 мкл/лунку буферу зчитування та планшет зчитують.

Кваліфікованому фахівцю буде зрозуміло, що точні концентрації та часи інкубувань в аналізах підтвердження будуть оптимізовані, наприклад 1H-131-206 (та модифіковані версії) може мати незначну різницю в концентраціях та часах інкубувань в порівнянні з DOM10H-53-567.

Результати скринінгів даної сполуки представлені в таблиці 9В нижче. Всі з досліджених С-термінальних модифікацій на V каппа dAbs (+T, +A, +AAA та -R) показали знижене інгібування в наведеному вище "697 аналізі підтвердження. Це передбачає, що С-термінальні модифікації даних V каппа dAbs зменшують зв'язування вже існуючих антитіл (ADAs) подібним способом з Vh dAbs.

Таблиця 9b

Оцінювання ADA зв'язування DMS3007 та DMS3008 мутантів

Вихідний клон	Модифікація послідовності	Середній % інгібування сигналу в аналізі підтвердження (середнє значення з 6 суб'єктів)	% суб'єктів з ADA зв'язуванням (середнє значення з 6 суб'єктів)
DMS30037	Немодифікований	60,46	100
DMS30050	С-термінальний Т додавання	20,97	16,67
DMS30048	С-термінальний А додавання	12,86	16,67
DMS30049	С-термінальний AAA додавання	8,36	16,67
DMS30047	С-термінальний -R делеція	6,17	16,67
DMS30038	Немодифікований	70,65	100
DMS30054	С-термінальний Т додавання	14,66	16,67
DMS30051	С-термінальний -R делеція	-5,91	16,67

Приклад 13 – Експресія анти-VEGF VH/Vk dAb-Fc-dAb молекул з модифікованими С-кінцями (DMS30047-30054)

5 плазмиди експресії, що кодують відповідні анти-VEGF dAb-Fc-dAb молекули, описані вище в прикладі 12а тимчасово трансфікували в HEK293 6E клітини та експресували в 500 мл масштабі, щоб отримати молекули фрагментів антитіл, використовуючи спосіб, описаний нижче в даному прикладі. Рівні експресії >30 мг/л супернатанту досягали в становленому порядку.

10 dAb послідовності клонували в N- або С-кінці багатофункціонального Fc людського IgG1 ізотипу в ссавцевому векторі експресії. dAbs зв'язувалися з Fc, використовуючи лінкерну послідовність: N-термінальним лінкером був або AAAS, або TVAAPS та С-термінальним лінкером був або ((GS(TVAAPSGS)x3), або альбуміновий домен 3.

Приклад 14 Очистка анти-VEGF VH/Vk dAb-Fc-dAb молекул з модифікованими С-кінцями

dAb-Fc-dAb молекули афінно чистили з супернатантів, як описано для прикладу вище.

15 Приклад 15 Молекулярний аналіз, використовуючи гель-хроматографію (SEC) анти-VEGF Vh/Vk dAb-Fc-dAb молекул з модифікованими С-кінцями

Молекулярна цілісність, гомогенність та % чистоти анти-VEGF dAb-Fc-dAb молекул, які очищували, потім аналізували, використовуючи SDS-PAGE та аналітичну гель-хроматографію (SEC). Таким чином, підтверджено, що протеїни є >95 % чистим мішенним протеїном за SDS-PAGE та SEC до наступного аналізу в біологічних аналізах.

20 Приклад 16 Зв'язування анти-VEGF Vh/Vk dAb-Fc-dAb молекул з модифікованими С-кінцями з VEGF на Biacore.

Афінність зв'язування певних анти-VEGF dAb-Fc-dAb молекул (з невеликими С-термінальними модифікаціями) для VEGF₁₆₅ визначали за допомогою поверхневого плазмонного резонансу (SPR), використовуючи Biacore T100. Протеїн А імобілізували на С1 чіпі шляхом сполучення первинного аміну та даної поверхні, потім застосовували, щоб покрити анти-VEGF конструкти. Людський рекомбінантний VEGF₁₆₅ (від джерела "в домі" від перехідної трансфекції з HEK293 клітинами) застосовували як аналіт від 32 нМ до 0,03125 нМ в 4 кратних серіях розбавлення. Всі криві зв'язування двічі посилалися на буфер для ін'єкцій (тобто 0 нМ) та дані характеризували 1:1 модель властиву T100. Регенерацію виконували, використовуючи 50 mM NaOH. Пробіг здійснювали при 37 °C, використовуючи HBS-EP, буфер перебігу. Одержані дані показані в таблицях 10A, 10B & 10C. За даними в таблиці 10A, поведінка DMS30037 та декількох варіантів, модифікованих на С-кінці: DMS30037+A (DMS30048), DMS30037+AAA (DMS30049) та DMS30037+T (DMS30050) (дивись приклад 12а, для наступної деталізації даних молекул) відображає співставимі на Biacore, та С-термінальні модифікації не з'являються для зниження ефективності в порівнянні з вихідною.

Додатковий набір даних є показаним в таблиці 10B, де ефективність як DMS30037, так і DMS30038 порівнювали з варіантами, модифікованими на С-кінці: DMS30037-R, (маркованими як +R (DMS30047), DMS30037+T (DMS30050) та DMS30038-R, (маркованими як +R (DMS30051) та бевацизунаб (Авастин) в Biacore. В цьому наборі даних, до того ж, поведінка всіх молекул відображається співставимою на Biacore, та С-термінальні модифікації не з'являються для зниження ефективності в порівнянні з вихідною. Важливі дані могли не охоплювати інші ніж ті,

що розглядаються кривою для авастину. Додатковий набір даних є показаним в таблиці 10С, в якій молекули DMS30037 та DMS30038 порівнювали з варіантами, модифікованими на С-кінці: DMS30037-R, (DMS30047), DMS30037+T (DMS30050), DMS30038-R, (DMS30051) та DMS30038+T (DMS30054) та бевацизунаб (Авастин). До того ж, поведінка всіх dAb-Fc-dAb молекул відображається співставимою на Biacore, та С-термінальні модифікації не з'являються для зниження ефективності в порівнянні з вихідною. Стосовно цього набору даних, дивись таблицю 10С, дані щодо бевацизунабу (Авастину) не могли, належним чином, вимірюватись завдяки швидкості дисоціації, яка є занадто стійкою.

Таблиця 10А

Зв'язування анти-VEGF dAb-Fc-dAb молекули: DMS30037 з
С-термінальними модифікаціями з VEGF₁₆₅ та в порівнянні з DMS30037

Ліганд	Ka (M ⁻¹ .s ⁻¹)	Kd (s ⁻¹)	Kd (M)
DMS30037	8,18E+06	4,34E-05	5,30E-12
DMS30037+A	8,25E+06	5,21E-05	6,32E-12
DMS30037+AAA	7,74E+06	5,37E-05	6,94E-12
DMS30037+T	8,03E+06	4,21E-05	5,24E-12

Таблиця 10В: Зв'язування анти-VEGF dAb-Fc-dAb молекули: DMS30037 та DMS30038 з С-термінальними модифікаціями з VEGF₁₆₅ та в порівнянні з вихідним dAb-Fc-dAb та бевацизунабом (Авистином).

Таблиця 10В

Ліганд	Ka (M ⁻¹ .s ⁻¹)	Kd (s ⁻¹)	Kd (M)
DMS30037	1,04E+07	4,39E-05	4,22E-12
DMS30037+R	1,07E+07	4,22E-05	3,94E-12
DMS30037+T	1,10E+07	4,27E-05	3,90E-12
DMS30038	1,03E+07	4,79E-05	4,64E-12
DMS30038+R	1,23E+07	5,31E-05	4,31E-12
авастин	8,39E+05	Поза діапазоном	Поза діапазоном

Таблиця 10С: Зв'язування анти-VEGF dAb-Fc-dAb молекули: DMS30037 та DMS30038 з С-термінальними модифікації з VEGF₁₆₅ та в порівнянні з вихідним dAb-Fc-dAb та бевацизунабом (Авистином).

Таблиця 10С

Ліганд	Ka	Kd	Kd
DMS30037	5,60E+06	1,46E-04	2,61E-12
DMS30037+T	5,38E+06	1,42E-04	2,64E-12
DMS30037-R	6,97E+06	1,55E-04	2,22E-12
DMS30038	5,69E+06	1,55E-04	2,73E-12
DMS30038-R	5,90E+06	1,58E-04	2,68E-12
DMS30038+T	8,28E+06	1,22E-04	1,47E-12
авастин	1,24E+06	Поза діапазоном	Поза діапазоном

Приклад 17 Аналіз зв'язування з рецептором VEGF R2 анти-VEGF Vh/Vk dAb-Fc-dAb молекул з модифікованими С-кінцями

Ефективності анти-VEGF Vh/Vk dAb-Fc-dAb молекул, що ґрунтується на DMS30037 та DMS30038, але з С-термінальними модифікаціями, порівнювали як з немутантним типом молекули, так і з бевацизунабом (Авистином), в аналізі зв'язування з VEGF рецептором 2, (R2), використовуючи модифікований спосіб, тобто з попереднім інкубуванням, як описано нижче в даному прикладі. Дані показані в таблиці 11А, всі досліджувані dAb-Fc-dAb молекули: DMS30037, DMS30037+T (DMS30050), DMS30037-R (DMS30047), DMS30038, DMS30038-R (DMS30051), представлено, що є співставимими за ефективністю, та мають значно більшу ефективність, ніж бевацизунаб (Авастин), Таблиця 11А. незначна зміна існувала в

максимальному відсотку інгібування, який досягався молекулами в аналізі зі всіма молекулами, досягаючи >93-98 % максимальне інгібування, (дані не показані).

Наступні дані отримували порівнянням dAb-Fc-dAbs: DMS30038, DMS30038+T, (DMS30050) та DMS30038-R, (DMS30051) з бевацизунабом (Авастином), в тому самому форматі аналізу, дані представлені в таблиці 11В. За даними DMS30038 та його С-термінальні варіанти, (таблиця 11В), мають подібні ефективності, які оцінюють за EC₅₀ значеннями в RBA аналізі, та представлено, що є значно більш ефективним, ніж бевацизунаб (Авастин) за даними критеріями. незначна зміна існувала в максимальному відсотку інгібування, який досягався молекулами в аналізі зі всіма молекулами, досягаючи >94 % максимальне інгібування, (дані не показані).

Аналіз зв'язування з рецептором VEGF R2: Ефективності аналізували в аналізі зв'язування з рецептором VEGF в порівнянні з бевацизунабом (Авастином). Даний аналіз вимірює зв'язування VEGF165, з або VEGF R1, або VEGF R2 та здатність досліджуваних молекул блокувати дану взаємодію. MSD стандартний для зв'язування 96-лунковий планшет (L11XA-3) накривали 0,25 мкг/мл VEGF R1 (R&D системи 321-FL) або VEGF R2 (R&D 357-KD) в букарбонатному буфері (50 мкл/лунку), поуривали планшетним герметиком та інкубували протягом ночі при 4 °С. Наступного дня MSD планшет промивали 3 × 300 мкл/лунку Tris промивним буфером та фарбували над шаром тканини, щоб видалити надлишок промивного буферу з лунок. MSD планшет потім блокували 3 % BSA в PBS (250 мкл/лунку) та інкубують, перемішуючи (750 обертах на хвилину) при кімнатній температурі протягом 1 години. MSD планшет промивали знову перед додавання 2х концентрації анти-VEGF молекули (25 мкл/лунку) та інкубували з перемішуванням (750 обертах на хвилину) при кімнатній температурі протягом 10 хвилин перед додавання 2х концентрації rhVEGF, 25 мкл/лунку, R&D системи (293-VE/CF, робили в клітинах комах, використовуючи бакуловірус) або GSK "внутрішнє" джерело VEGF (зроблене з HEK293 клітин ссавців, останні дані не представлені, за виключенням таблиці 3А). Анти-VEGF молекули та VEGF одержували, використовуючи 0,1 % BSA в PBS. Початковий аналіз виконували зі стадією, в якій анти-VEGF молекула попередньо інкубували з VEGF. Попередні інкубування проводили шляхом додавання однакового об'єму 2х концентрації анти-VEGF молекули до однакового об'єму 2х концентрації VEGF (R&D, 293-VE/CF) протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Кінцева VEGF концентрація, яку застосовували, становила 10 нг/мл. Без VEGF та VEGF самостійні контролю також включали. MSD планшет інкубули з перемішуванням (750 обертах на хвилину) при кімнатній температурі протягом 2 годин після чого його промивали знову перед додаванням реагенту для детектування (50 мкл/лунку, козине анти-людське VEGF біотинильоване антитіло – R&D системи BAF293) з 0,25 мкл/мл в 1 % BSA в PBS та інкубували з перемішуванням (750 обертах на хвилину) при кімнатній температурі протягом 1 години. MSD планшет промивали знову перед додавання стрептавідину sulfo-TAG (50 мкл/лунку, MSD R32AD-1) в 2 мкл/мл в 1 % BSA в PBS та інкубували з перемішуванням (750 обертах на хвилину) при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Перед вимірюванням електрохемілюмінесценції в MSD Sector Imager 6000, MSD планшет промивали та додавали 150 мкл/лунку 2х буферу зчитування Т (MSD R92TC-1). Апроксимацію кривої та розрахунки EC₅₀ виконували, використовуючи GraphPad Prism. Здатність досліджуваних анти-VEGF молекул та бевацизунабу (Авастину) інгібувати VEGF зв'язування з VEGFR1 та VEGFR2 визначали, як описано.

Модифікований спосіб: Другий аналіз виконували у відповідності з чим анти-VEGF агент та VEGF попередньо не інкубували перед додаванням до покритого MSD планшету з VEGF рецептором. Даний аналіз проводили та застосовували тільки VEGF джерело від R&D систем, (293-VE/CF). Здатність анти-VEGF молекул та бевацизунабу (Авастину) інгібувати VEGF зв'язування з VEGFR1 та VEGFR2 визначали, як описано вище, але без стадії попереднього інкубування.

Таблиця 11А: EC₅₀ значення анти-VEGF dAb-Fc-dAbs з С-термінальними модифікаціями порівнювали з бевацизунабом (Авастином) в аналізі зв'язування з рецептором VEGFR2:

Апроксимацію кривої та EC₅₀ розрахунки виконували, використовуючи GraphPad Prism.

Таблиця 11A

VEGFR2 RBA		EC ₅₀	EC ₅₀
		(г/мл)	(пМ)
авастин		1,21E-07	806
DMS30037		2,99E-09	28
DMS30037+T		2,98E-09	28
DMS30037-R		2,66E-09	25
DMS30038		3,37E-09	32
DMS30038-R		3,84E-09	37

Таблиця 11B: EC₅₀ значення анти-VEGF dAb-Fc-dAbs з C-термінальними модифікаціями порівнювали з бевацизунабом (Авастином) в аналізі зв'язування з рецептором VEGFR2:

5 Апроксимацію кривої та EC₅₀ розрахунки виконували, використовуючи GraphPad Prism.

Таблиця 11B

VEGFR2 RBA		EC ₅₀	EC ₅₀
		(г/мл)	(пМ)
авастин		3,4E-07	2266
DMS30038		5,28E-09	50
DMS30038+T		4,31E-09	41
DMS30038-R		4,53E-09	43

Приклад 18 – проліфераційний аналіз ендотеліальних клітин пупочної вени людини: Інгібування анти-VEGF Vh/Vk dAb-Fc-dAb молекулами, які містять C-термінальні модифікації:

10 Здатність dAb-Fc-dAb молекул, що ґрунтуються на DMS30037 та DMS30038, але з C-термінальними модифікаціями: DMS30037-R (DMS30047) & DMS30037+T (DMS30050), DMS30038-R (DMS30051) & DMS30038+T (DMS30054), пригнічувати проліферацію ендотеліальних клітин пупочної вени людини порівнювали з бевацизунабом (Авастином), використовуючи спосіб, описаний нижче з наступними відхиленнями (i) замість того, щоб

15 залишати зовнішні лунки вільними від клітин, застосовували цілий 96-лунковий планшет, та (ii) дані аналізували, використовуючи GraphPad Prism, використовуючи Sigmodial підбір кривої, змінний нахил sf нелінійної регресії (змінний нахил). Досліджені сполуки незалежно оцінювали на окремих планшетах проти молекули порівняння, бевацизунабу (Авастину); аналіз виконували, щонайменше, для трьох окремих випадків, із загальним набором даних на

20 молекулу бевацизунаба (Авастину): 15; DMS30037: 7; DMS30038: 8; DMS30037-R (DMS30047): 3; DMS30037+T (DMS30050): 4; DMS30038-R (DMS30051): 4 & DMS30038+T (DMS30054): 4, (дані не показано). Акцент був зроблений на аналіз як ступеню максимального інгібування так і відносного значення EC₅₀ в аналіз, сформованими певними молекулами порівнянні з бевацизунабом (Авастином).

25 Дані аналізували, використовуючи GraphPad Prism, використовуючи Sigmodial підбір кривої, змінний нахил sf нелінійної регресії (змінний нахил). Окремі параметри кривої встановлювали для кожної молекули та кожного дня. Через дещо недосконалий підбір, було прийняте рішення ввести обмеження для кривої, якими не спостерігалось плато при більш низькій концентрації. Один планшет був виключений з аналізу через недосконалу апроксимацію кривої, незважаючи

30 на обмеження. Дане обмеження буде дорівнювати середньому значенню точок при найнижчій концентрації. Дані вибирали вручну, відносно того чи мінімум був обмеженням чи ні, та форма і параметри кривої автоматично оновлювались на основі цього критерію відбору. Оцінки максимумів кривої та стандартної помилки були проаналізовані, використовуючи зважену змішану модель дисперсійного аналізу, використовуючи $1/(\text{стандартна помилка})^2$, $[SE]^2$, як

35 зважування. Аналіз пристосовували щодо варіабельності між планшетами та днями, використовуючи терміни випадкових ефектів. З цього аналізу, передбачені середні значення оцінювалися, та робили порівняння повертаючись до Авастину (контроль) (дивись, таблицю 12A). Той же аналіз потім проводили за шкалою log₁₀ для IC₅₀, та результати назад перетворювали. Виходячи з цього, сформульовували оцінки середніх геометричних значень та

40 проводили порівняння повертаючись до авастину у вигляді відношення до авастину (контроль), тобто відношення 0,5 означатиме 50 % менше від авастину (дивись таблицю 12B).

Проліфераційний аналіз ендотеліальних клітин пуповини (HUVEC):

Анти-VEGF молекули аналізували щодо їх здатності пригнічувати проліферацію ендотеліальних клітин пупочної вени людини в порівнянні з бевацизунабом (Авастином). Даний аналіз вимірює ступінь проліферації ендотеліальних клітин, яка індукується певною концентрацією VEGF₁₆₅, та здатність VEGF антагоністів блокувати даний ефект. HUVES висівали по 5000 клітин на лунку в 96-лункові покриті желатином планшети, залишаючи зовнішні лунки вільними від клітин, та інкубують протягом декількох годин, щоб дати можливість адгезії. Досліджувані молекули аналізували в еквімолярних концентраціях (max 3,33 × 10⁻⁰⁸М) з 2-кратним серійним розбавленням, кожен в трьох повторах. VEGF₁₆₅ готували в базальному середовищі, щоб досягти кінцеву концентрацію 75 нг/мл. середовищі видаляли вручну з клітинних моношарів, та додавали 50 мкл базальних середовищ, щоб попередити висихання клітин. 25 мкл середовища, що містить VEGF₁₆₅, та 25 мкл базального середовища або середовища, що містить досліджуване антитіло, додавали як відповідне. Клітини інкубували протягом 72 годин, часу після якого визначали загальну кількість клітин, використовуючи протокол Cell Titre Glo. Обробка HUVES з VEGF₁₆₅ в результаті призвела до очікуваного зростання загальної кількості клітин через 72 години, коли порівнювали з необробленими VEGF₁₆₅ клітинами (дані не показані). Дане VEGF-опосередковане зростання інтерпретують як відображаючий кумулятивні ефекти VEGF як щодо HUVES проліферації, так і попередження HUVES клітинної смерті. Досліджувані сполуки незалежно оцінювали на окремих планшетах п відношенню до молекули порівняння, бевацизунабу (Авастину).

Таблиця 12A: Прогнозовані середні геометричні значення максимального відсотку інгібування С-термінально модифікованого анти-VEGF dAb-Fc-dAbs з 95 % довірчими інтервалами (CI) в порівнянні з вихідним та бевацизунабом (Авастином) в аналізі HUVES:

Таблиця 12A

Прогнозовані середні значення Max % інгібування

mAb	оцінка	нижче 95 % CI	вище 95 % CI
авастин	71,0316	61,6741	80,3891
DMS30037	85,4759	74,9164	96,0354
DMS30037+T	89,9852	78,2698	101,70
DMS30037-R	82,2693	69,9929	94,5457
DMS30038	73,5602	63,7180	83,4023
DMS30038+T	79,0343	67,1904	90,8782
DMS30038-R	77,6519	65,5487	89,7550

З цього аналізу представлено, що молекули DMS30037, DMS30037+T та DMS30037-R, в результаті призводять до найбільш максимального інгібування в аналізі HUVES, та вони перевершували групу авастину, довірчий інтервал не перекривав нульову точку відліку таким чином, що дані були статистично суттєвими від такого авастину, дані не показані (дивись таблицю 12A).

Таблиця 12B: Середні геометричні значення IC₅₀ для С-термінально модифікованих анти-VEGF dAb-Fc-dAbs з 95 % довірчими інтервалами (CI) в порівнянні з вихідним та бевацизунабом (Авастином) в аналізі:

Таблиця 12B

Середні геометричні значення IC₅₀

mAb	оцінка	нижче 95 % CI	вище 95 % CI
авастин	3,829E-9	3,119E-9	4,7E-9
DMS30037	1,903E-9	1,473E-9	2,46E-9
DMS30037+T	2,332E-9	1,758E-9	3,092E-9
DMS30037-R	7,365E-9	2,06E-9	2,639E-9
DMS30038	2,163E-9	1,723E-9	2,715E-9
DMS30038+T	2,649E-9	1,877E-9	3,738E-9
DMS30038-R	2,234E-9	1,699E-9	2,936E-9

Подібний аналіз середніх геометричних значень IC₅₀ з 95 % довірчими інтервалами, (CI), показав, що майже всі dAb-Fc-dAb молекули DMS30037, DMS30037+T, DMS30038, DMS30038+T

та DMS30038-R мали статистично значно менші значення IC50, ніж авастин, дані не показані (дивись таблицю 18B). Набір даних від DMS30037-R був високо варіабельним з низьким числом n (3).

Загальна дані дозволяють припустити, що С-термінальні модифікації як dAb-Fc-dAbs: DMS30037 & DMS30038 мають дуже схожі значення IC50 та рівні максимального інгібування в аналізі HUVEC щодо вихідних молекул, та відображають більшу ефективність, ніж бевацизунаб (Авастин), як стосовно максимального відсотку інгібування, так і нижчого IC50, (дивись таблиці 12A та 12B).

Приклад 19 (Зонд mAb): Застосування анти-VH mAb для визначення епітопу для зв'язування вже існуючого анти-VH ADA:

Моноклональне антитіло (анти-VH mAb M2.3G10.1G06) зв'язується з VH каркасом DOM1H-131-206, та визначено, що даний mAb має набагато знижене зв'язування з DOM1H-131-206+A; в наслідок цього дане антитіло виступає, щоб зв'язати подібний епітоп зі вже існуючим людським анти-VH ADA.

CDR послідовності анти-VH mAb M2.3G10.1G06: CDR послідовності анти-VH mAb M2.3G10.1G06 ампліфікували та секвенсували з гібридною клітинною лінією. Важкий та легкий ланцюг послідовності для mAb M2.3G10.1G06 є показаними в [амінокислотні послідовності є показаними на фігурі 6a та 6b]. Послідовності клонували в людському IgG1 mAb векторі експресії та трансфікували в клітинах ссавців для експресії ідентифікованого mAb. Одержане в результаті антитіло чистили від клітинного супернатанту та досліджували щодо його здатності зв'язувати VH dAb каркас.

Специфічність анти-VH mAb M2.3G10.1G06: Специфічність mAb M2.3G10.1G06 щодо зв'язування з VH dAb каркасом (з або без модифікації, що анулює зв'язування вже існуючого ADA) визначали шляхом вимірювання зв'язування mAb M2.3G10.1G06 в аналізі TNFR1:dAb зв'язування, що виконують на MSD™ платформі (дивись приклад 1 щодо деталей MSD™ платформи). Аналіз TNFR1:dAb зв'язування є деталізованим нижче. Продемонстровано, що рутенильований анти-VH mAb M2.3G10.1G06 має знижене зв'язування з VH каркасом до 85 %, коли С-кінець є модифікованим шляхом подовження аланіном (від 1 до 15 % залишкового зв'язування) (результати показані в таблиці 13).

Конкуренція між вже існуючим анти-VH ADA та mAb M2.3G10.1G06: Для підтвердження того, що анти-VH mAb M2.3G10.1G06 зв'язує той самий епітоп, як вже існуючий анти-VH ADA сироватки, виконували аналіз щодо конкуренції. Встановлено, що сироватка від ряду людей-донорів з вже існуючим анти-VH ADA могла конкурувати з анти-VH mAb M2.3G10.1G06 щодо зв'язування з DOM1H-131-206 (дані показані на фігурі 7). Ми дійшли висновку, що вже існуючий людський анти-VH ADA та анти-VH mAb M2.3G10.1G06 приймають участь в перекриванні епітопу на VH каркасі.

Модифікації VH dAbs, які перешкоджають епітопу зв'язування щодо вже існуючого ADA, можуть бути передбаченими на основі зв'язування анти-VH mAb M2.3G10.1G06. Зв'язування анти-VH mAb M2.3G10.1G06 можуть, в наслідок цього, застосовувати для аналізу щодо модифікації, що призводить до зниженого зв'язування вже існуючого ADA.

Способи, які застосовують:

Протокол аналізу TNFR1:dAb зв'язування

1. TNFR1:Fc утримуються у високо зв'язуючому MSD планшеті протягом ночі при 4 °C. MSD планшет потім промивають 3 рази MSD/TRIS промивним буфером.

2. Планшет блокують 3 % BSA в PBS протягом 1,5 години при кімнатній температурі. MSD планшет потім промивають 3 рази MSD/TRIS промивним буфером.

3. Серії розбавлення досліджуваного dAb (DOM 1H-131-206 (SEQ ID NO 1) або DOM 1H-131-206 з С-термінальним аланіновим подовженням (SEQ ID NO 16)) додають протягом 2 годин при к.т. MSD планшет потім промивають 3 рази MSD/TRIS промивним буфером.

4. Рутенильований mAb M2.3G10.1G06 з кінцевою концентрацією 1 мкг/мл додають протягом 1 години при кімнатній температурі. MSD планшет потім промивають 3 рази MSD/TRIS промивним буфером.

5. Додають 150 мкл/лунка буферу зчитування, та планшет зчитують.

Протокол конкурентного аналізу щодо вже існуючого анти-VH ADA та mAb M2.3G10.1G06

1. 0,2 мкг/мл біотинильованої досліджуваної молекули (dAb), яка була DOM 1H-131-206 (SEQ ID NO 1), та зразок 20 % сироватки в розріджувачі для аналізу (1 % казеїн в PBS) інкубують в круглодонному планшеті для аналізу протягом 1 години ± 5 хвилин при к.т.

2. Рутенильований анти-VH mAb M2.3G10.1G06 в кінцевій концентрації 0,5 мкг/мл додають протягом 1 години при кімнатній температурі.

3. MSD™ стрептавідиновий планшет блокують 150 мкл/лунка блокуючого казеїну в PBS (1 %) при кімнатній температурі (к.т.) протягом 1-2 годин.

4. Зразки переносять до MSD™ стрептавідинового планшету та інкубують при кімнатній температурі (к.т.) протягом 1-2 годин.

5. MSD планшет потім промивають 3 рази PBST.

6. Додають 150 мкл/лунка буферу зчитування, та планшет зчитують.

Таблиця 13: Диференційне зв'язування анти-VH mAb з DOM1H-131-206 або DOM1H-131-206, модифікованим С-термінальним подовженням

Таблиця 13

концентрація досліджуваного dAb (пг/мл)	Сигнал аналізу зв'язування Середнє ECL значення \pm SD		Відносне зв'язування з DOM1H131-206+ С-термінальним А (%)
	DOM1H-131-206	DOM1H-131-206 + С-термінальний А	
270000	1168024 \pm 3643	81489 \pm 4537	7
90000	1078743 \pm 17931	66020 \pm 3207	6
30000	377493 \pm 9653	11300 \pm 266	3
10000	108173 \pm 3413	1507 \pm 69	1
3333	34479 \pm 1397	743 \pm 14	2
1111	12026 \pm 243	847 \pm 226	7
370	4387 \pm 41	669 \pm 13	15
0	623 \pm 2	621 \pm 5	

Даний mAb зв'язує каркас VH dAbs, наприклад, DOM 1H-131-206 (SEQ ID NO 1), але зв'язування є суттєво зниженим в dAbs з +А С-термінальною модифікацією, наприклад, DOM 1H-131-206 з С-термінальним аланіновим подовженням (SEQ ID NO 16). Н & L ланцюг послідовності визначали з гібридами, яка зберігається в Biocat. Існувала тільки одна LC послідовність, але дві HC послідовності: одна функціональна (дивись нижче) та одна нефункціональна послідовність, включаючи стоп-кодони та зсуви рамок.

Експресія mAb та підтвердження зв'язування по відношенню до двох молекул, зазначених вище, ґрунтуючись на передбаченій функціональній послідовності нижче дозволить нам підтвердити, що ми маємо коректну mAb послідовність для реєстрації. Спосіб, за яким формують рТТ5 конструкти, означає, що тільки послідовність не курсивом є з гібридами, курсивом є химерна з рТТ вектору, її клонували (це не вимагається для аналізу зв'язування).

Легкий ланцюг

DIVMTQSQKFMSPTVGDRVSITCKASQNVGTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASNRYTGVPDRFTG
SGSGTDFTLTINNMQSEDLADYFCQQYGSYPLTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
VCLLNNFYFPREAKVQWKVDHKLQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC

Важкий ланцюг

EVQLQQSGPVLVKPGASVKMSCKASGYTLTESYMHVVKQSHGKSLEWIGVISPYNGGTSYNQK
FKDKATLTVDKSSSTAYMELNSLTSEDSAVYYCTRRGIYDPSWFAFWGQGTTLTVSAAKTTTPPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Варіабельна ділянка в нормальному типі.

CDRs підкреслена/жирним шрифтом

Химерна послідовність для Fc курсивом.

Fc є людським IgG1.

Послідовності для зонду mAb показані на фігурі 6 (SEQ ID NO 14 та 15).

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> ГЛАКСО ГРУП ЛІМІТЕД

Морлі Пітер
 Люїс Елан
 Сендел Томас
 Ешмен Клер
 Стюард Майкл
 Де Вілдт Рудолф
 Холланд Клер
 Берчлер Мері

<120> МОДИФІКОВАНІ ПРОТЕЇНИ ТА ПЕПТИДИ

<130> PB64743wo

<150> US 61/524,488

<151> 2011-08-17

<150> GB 1121226.3

<151> 2011-12-12

<150> GB 1121233.9

<151> 2011-12-12

<150> GB 1121236.2

<151> 2011-12-12

<150> PCT/EP2012/064632

<151> 2012-07-25

<160> 49

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 119

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Немодифікований dAb DOM 1H-131-206 (анти-TNFR1)

<400> 1

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala His Glu
 20 25 30
 Thr Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser His Ile Pro Pro Asp Gly Gln Asp Pro Phe Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr His Cys
 85 90 95
 Ala Leu Leu Pro Lys Arg Gly Pro Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Немодифікований dAb DOM 1H-131-511 (анти-TNFR1)

<400> 2

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala His Glu
 20 25 30
 Thr Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser His Ile Pro Pro Val Gly Gln Asp Pro Phe Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Leu Leu Pro Lys Arg Gly Pro Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 3

<211> 119

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Немодифікований dAb DOM 1H-131-202 (анти-TNFR1)

<400> 3

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala His Glu
 20     25     30
Thr Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35     40     45
Ser His Ile Pro Pro Asp Gly Gln Asp Pro Phe Tyr Ala Asp Ser Val
 50     55     60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65     70     75     80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85     90     95
Ala Leu Leu Pro Lys Arg Gly Pro Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100    105    110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

```

<210> 4

<211> 245

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> VHH2

<400> 4

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val Phe Lys Ile Asn
 20     25     30
Val Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val
 35     40     45
Ala Gly Ile Ile Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50     55     60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65     70     75     80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85     90     95
Phe Ile Thr Thr Glu Ser Asp Tyr Asp Leu Gly Arg Arg Tyr Trp Gly

```

```

      100      105      110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
      115      120      125
Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
      130      135      140
Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
      145      150      155      160
Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
      165      170      175
Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp
      180      185      190
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr
      195      200      205
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
      210      215      220
Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu
      225      230      235      240
Val Thr Val Ser Ser
      245

```

<210> 5

<211> 363

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> VHH2

<400> 5

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
      20      25      30
Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35      40      45
Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val
      50      55      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
      65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
      100      105      110
Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
      115      120      125
Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu

```

130 135 140
 Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp
 145 150 155 160
 Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser
 165 170 175
 Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
 180 185 190
 Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn
 195 200 205
 Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly
 210 215 220
 Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
 245 250 255
 Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
 260 265 270
 Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala
 275 280 285
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu
 290 295 300
 Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 305 310 315 320
 Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro
 325 330 335
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn
 340 345 350
 Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 355 360

<210> 6

<211> 259

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> VHH2

<400> 6

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn
 20 25 30
 Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

50 55 60
 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro
 100 105 110
 Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 Ala Ala Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 130 135 140
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe
 145 150 155 160
 Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg
 165 170 175
 Glu Leu Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro
 180 185 190
 Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg
 195 200 205
 Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 210 215 220
 Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg
 225 230 235 240
 Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
 245 250 255
 Val Ser Ser

<210> 7

<211> 364

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> VHH2

<400> 7

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
 115 120 125
 Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu
 130 135 140
 Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp
 145 150 155 160
 Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser
 165 170 175
 Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
 180 185 190
 Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn
 195 200 205
 Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly
 210 215 220
 Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
 245 250 255
 Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
 260 265 270
 Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala
 275 280 285
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu
 290 295 300
 Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 305 310 315 320
 Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro
 325 330 335
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn
 340 345 350
 Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 355 360

<210> 8

<211> 361

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> VHH2

<400> 8

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
 115 120 125
 Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu
 130 135 140
 Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp
 145 150 155 160
 Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser
 165 170 175
 Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
 180 185 190
 Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn
 195 200 205
 Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly
 210 215 220
 Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
 245 250 255
 Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
 260 265 270
 Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala
 275 280 285
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu
 290 295 300
 Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 305 310 315 320
 Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro
 325 330 335
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn
 340 345 350
 Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 355 360

<210> 9

<211> 260

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> VHH2

<400> 9

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn

20 25 30

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val

35 40 45

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro

100 105 110

Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

Ala Ala Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

130 135 140

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe

145 150 155 160

Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg

165 170 175

Glu Leu Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro

180 185 190

Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg

195 200 205

Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val

210 215 220

Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg

225 230 235 240

Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr

245 250 255

Val Ser Ser Ala

260

<210> 10
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Dom 1h-574-208

<400> 10
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Lys Tyr
 20 25 30
 Ser Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala His Ala Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Val Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 11
 <211> 230
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Dom 1h-574-208-VL злиття

<400> 11
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Lys Tyr
 20 25 30
 Ser Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gln Ile Ser Asp Thr Ala Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala His Ala Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
 Ala Ile Tyr Thr Gly Arg Trp Val Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln
 115 120 125
 Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
 130 135 140
 Cys Arg Ala Ser Arg Pro Ile Gly Thr Thr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln
 145 150 155 160
 Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Leu Trp Asn Ser Arg Leu
 165 170 175
 Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 180 185 190
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
 195 200 205
 Tyr Cys Ala Gln Ala Gly Thr His Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr
 210 215 220
 Lys Val Glu Ile Lys Arg
 225 230

<210> 12

<211> 119

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> DT04-H-033 (вихідний IL-13 dAb)

<400> 12

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala Asp Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Thr Ile Ser Tyr Asn Gly Leu Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Lys Tyr Glu Tyr Ser Pro Glu Ser Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 13
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Dom 10h-53-567

<400> 13
 Gly Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Val Phe Ala Trp Tyr
 20 25 30
 Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Asp Trp His Gly Glu Val Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Ala Glu Asp Glu Pro Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 14
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> анти-VH mAb M2.3G10.1G06

<400> 14
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Pro Thr Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Met Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 15

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> анти-VH mAb M2.3G10.1G06

<400> 15

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Glu Ser
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Val Ile Ser Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Arg Gly Ile Tyr Tyr Asp Pro Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 16

<211> 120

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> DOM1h-131-206 dAb

<400> 16

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala His Glu
 20 25 30
 Thr Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

```

      35      40      45
Ser His Ile Pro Pro Asp Gly Gln Asp Pro Phe Tyr Ala Asp Ser Val
      50      55      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
      65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr His Cys
      85      90      95
Ala Leu Leu Pro Lys Arg Gly Pro Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
      100     105     110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
      115     120

```

<210> 17

<211> 120

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> DOM1h-131-206 dAb

<400> 17

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1       5       10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala His Glu
      20      25      30
Thr Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35      40      45
Ser His Ile Pro Pro Asp Gly Gln Asp Pro Phe Tyr Ala Asp Ser Val
      50      55      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
      65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr His Cys
      85      90      95
Ala Leu Leu Pro Lys Arg Gly Pro Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
      100     105     110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
      115     120

```

<210> 18

<211> 119

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> DOM1h-131-206 dAb

<400> 18

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala His Glu
 20 25 30
 Thr Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser His Ile Pro Pro Asp Gly Gln Asp Pro Phe Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr His Cys
 85 90 95
 Ala Leu Leu Pro Lys Arg Gly Pro Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 19

<211> 124

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> DOM1h-131-206 dAb

<400> 19

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala His Glu
 20 25 30
 Thr Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser His Ile Pro Pro Asp Gly Gln Asp Pro Phe Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr His Cys
 85 90 95
 Ala Leu Leu Pro Lys Arg Gly Pro Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120

<210> 20
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> DOM1h-131-206 dAb

<400> 20
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala His Glu
 20 25 30
 Thr Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser His Ile Pro Pro Asp Gly Gln Asp Pro Phe Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr His Cys
 85 90 95
 Ala Leu Leu Pro Lys Arg Gly Pro Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120

<210> 21
 <211> 357
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> DOM1h-131-206 dAb

<400> 21
 gaagtacaac tgctggagag cggtaggcgc ctggtcaac cgggtggtc cctgcgcctg 60
 tcctgtcgg catctggtt cacctcgca cagaaacga tgggtgggt tcgccaagct 120
 ccgggcaaag gcctggaatg ggtaagccac attcctccag atggccagga cccattctat 180
 gcggattccg ttaagggctg cttaccatt tctcgtgata actccaaaaa caccctgtac 240
 ctgcagatga actccctgcg cgccgaggat actgcggtgt accattgtgc gctgctgcct 300
 aaacgtggcc cgtggtcga ttactgggt cagggtactc tggtcaccgt aagcagc 357

<210> 22
 <211> 360
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Dom1h-131-206

<400> 22

gaagtacaac tgctggagag cgggtggcggc ctgggtcaac cgggtgggtc cctgcgcctg 60
tctgtgcgg catctggtt caccttcgca cagaaacga tgggtgggt tcgccaagct 120
ccgggcaaag gcctggaatg ggtaagccac attctccag atggccagga cccattctat 180
gcggattccg ttaagggtcg cttaccatt tctcgtgata actcaaaaa caccctgtac 240
ctgcagatga actccctgcg cggcgaggat actgcggtgt accattgtgc gctgctgcct 300
aaacgtggcc cgtggttcga ttactggggg cagggtactc tggtcaccgt aagcagcgcg 360

<210> 23

<211> 372

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Dom1h-131-206

<400> 23

gaagtacaac tgctggagag cgggtggcggc ctgggtcaac cgggtgggtc cctgcgcctg 60
tctgtgcgg catctggtt caccttcgca cagaaacga tgggtgggt tcgccaagct 120
ccgggcaaag gcctggaatg ggtaagccac attctccag atggccagga cccattctat 180
gcggattccg ttaagggtcg cttaccatt tctcgtgata actcaaaaa caccctgtac 240
ctgcagatga actccctgcg cggcgaggat actgcggtgt accattgtgc gctgctgcct 300
aaacgtggcc cgtggttcga ttactggggg cagggtactc tggtcaccgt aagcagcgcg 360
tctaccaaag gt 372

<210> 24

<211> 735

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> анти-IL6 VHH

<400> 24

gaagtgcagc tgggtgaatc tggcgggtggg ctgggtcagc cgggtgggtc tctgcgtctg 60
tcttgcgcag cgtctggtag cgtttcaaa atcaacgtga tggcgtggta tcgtcaggct 120
ccgggtaaag gtcgtgaact ggttcgggt atcattctg gcggtagcac ttctacgcg 180
gactccgtta aaggtcgtt caccatcagc cgcgacaacg cgaaaaacac cctgtacctg 240
cagatgaact ctctgcgicc ggaagatacc gcggttact attgcgcgtt catcaccacc 300
gaatctgact acgacctggg tcgtcgtat tggggtcagg gtactctggt aaccgtatcc 360
tctggtggtg gtgggtcgg tgggtgtcc gaagtacagc tgggtgaatc tggcgggtgg 420
ctgggtacagc cgggtaactc tctgcgtctg tctgtgcgg ctctcgtt cacctctcc 480

agcttcggta tgtctgggt tcgtcaggca ccgggtaaag gtctggaatg ggtgtctagc 540
atctctggca gcggttctga taccctgtac gctgactccg tgaaaggctg ttctactatc 600
tcccgcgaca acgcgaaaaac caccctgtac ctgcagatga actctctgcg tccggaagac 660
accgctgttt actactgcac catcggtggt agcctgtccc gttcttctca gggtagccctg 720
gttactgtga gctct 735

<210> 25
<211> 1089
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> анти-TNF альфа VHH

<400> 25
gaagtcgagc tggtagaatc tggcgggtgt ctggtacagc cgggtgggtc tctgcgtctg 60
tcttgcgcag ctctgggtt cacccttccc gactactgga tgtattgggt tcgtcaggcg 120
ccgggtaaag gtctggaatg ggtgtctgaa atcaacacca acggcctgat caccaaatc 180
ccggactccg tgaaaggctg ttaccatc tcccgcgaca acgcgaaaaa caccctgtac 240
ctgcagatga actctctgcg tccggaagat acccggtgtt actattgtgc gcgttctccg 300
tctggttca accgtgtca gggactctg gttaccgtaa gctctggtgg tggggatcc 360
ggcgggtggt ctgaagtca gctggtgaa agcgggtgtg gtctggtaca gccgggtaac 420
tctctgcgtc tgtctgtgc ggctctggc ttacacctt cctcttccg tatgtcttg 480
gtctgcagg caccgggtaa aggcctggaa tgggtttcct ctatctctgg tagcgttct 540
gacacctgt acgtgactc tgttaaaggc cgcttacca tctccgtga caacgcgaaa 600
accacctgt atctgcagat gaactccctg cgtccggaag ataccgctgt atactactgc 660
accatcggtg gctctctgc tcgttctct cagggtaccc tggttaccgt atctagcgt 720
gggtgtggat ccggtggcgg tagcgaagtt cagctggtg aatctggcgg tggctggt 780
cagccgggtg gttctctgcg tctgtctgt gcagcgtctg gcttcacct cagcgattac 840
tggatgtact ggggtctca ggcaccgggt aaaggctctg aatgggtgtc tgaatcaac 900
accaacggtc tgatcacaa ataccggac agcgtgaaag gtcgtttcac catcagccgt 960
gacaacgcga aaaacacct gtacctcag atgaactct tgcgtccga agacactgcg 1020
gtttattact gcgcacgtc tccgtctgt ttcaaccgtg gtcagggtac cctggttact 1080
gtatctct 1089

<210> 26
<211> 777
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> анти-фон Віллебранд VHH

<400> 26
gaggtacagc tggtggaag cgggtgggt ctggtcagc cgggtgggtc tctgcgtctg 60
tcttgcgcag ctctggccg tacctcagc tacaaccga tgggtgggt ccgtcaggct 120
ccgggtaaag gtcgtgaact ggtgcggcg atctctgta ccggtggctc tacctactat 180

ccggactccg tggaaggctg ttccaccatc tcccgcgaca acgcgaaacg tatggtatac 240
ctgcagatga acagcctgcg cgctgaagac accgcggtt actattgtgc tgcagcgggt 300
gttcgtgctg aagacggctg tttcgtacc ctgccgtccg aatacacctt ctggggtcag 360
ggtaccagg ttaccgttc ttctgcagcg gcggaagtgc agctggtga atctggcgg 420
ggtctgttac agccgggtg ttctctgctg ctgtctgtg ctgcgtctgg tgcaccttc 480
tcctacaacc cgatgggtg gtccgtcag gcaccgggta aaggctgga actggtagcg 540
gcaatcttc gactgggtg ctctacctac taccggact ctgtgaagg ccgcttcacc 600
atctctgtg acaacgcgaa acgtatggtg tacctgcaga tgaactccct gcgtgcgga 660
gacaccgcag ttattactg cgcggcagct ggtgtctg cagaagacgg tctgttctg 720
accctgccga gcgaatacac cttctgggt cagggtaccc aggtaacgt atctct 777

<210> 27

<211> 738

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> анти-IL6 VHH

<400> 27

gaagtgcagc tgggtgaatc tggcgggtg ctggttcagc cgggtgggtc tctgcgtctg 60
tctgcgcag cgtctggtg cgtttcaaa atcaacgtga tggcgtgga tctgcaggct 120
ccgggtaaag gtcgtgaact ggttgcgggt atcatctctg gcggtagcac ttctacgcg 180
gactccgtta aaggctgtt caccatcagc cgcgacaacg cgaaaaacac cctgtacctg 240
cagatgaact ctctgcgtcc ggaagatacc gcggttact attgcgcgtt catcaccacc 300
gaatctgact acgacctggg tctcgttat tgggtcagg gtactctgtt aaccgtatcc 360
tctggtggtg tgggtctggt tgggtgtcc gaagtacagc tgggtgaatc tggcgggtg 420
ctggtacagc cgggtaactc tctgcgtctg tctgtgcgg cttcigggtt cacctctcc 480
agcttcggtg tctctgggt tctgcaggca cgggttaaag gtctggaatg ggtgtctagc 540
atctctggca gcggtctga taccctgtac gctgactccg tgaaggctg ttactatc 600
tcccgcgaca acgcgaaaac caccctgtac ctgcagatga actctctgcg tccggaagac 660
accgctgtt actactgcac catcgggtg agcctgtccc gttctctca ggtaccctg 720
gttactgtga gctctgcg 738

<210> 28

<211> 1092

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> анти-TNF альфа VHH

<400> 28

gaagtgcagc tggtagaatc tggcgggtg ctggtacagc cgggtgggtc tctgcgtctg 60
tctgcgcag cttcgggtt cacctctcc gactactgga tgtattgggt tctgcaggcg 120
ccgggtaaag gtctggaatg ggtgtctgaa atcaacacca acggcctgat caccaaatac 180
ccggactccg tgaaggctg ttccaccatc tcccgcgaca acgcgaaaaa caccctgtac 240

ctgcagatga actctctgcg tccggaagat accgcgggtt actattgtgc gcgttctccg 300
 tctggtttca accgtgggca gggactctg gttaccgtaa gctctggtgg tggggtacc 360
 ggcgggtggt ctgaagtca gctggtgaa agcgggtggt gctcgtgaca gccgggtaac 420
 tctctgctgc tctctgtgc ggctctggc ttacacttct cctcttccg tatgtctgg 480
 gttcgtcagg caccgggtaa aggcctggaa tgggttctct ctatctctgg tagcgggtct 540
 gacacctgt acgtgactc tgttaaaggc cgctcacca tctccgtga caacgcgaaa 600
 accacctgt atctgcagat gaactccctg cgtccggaag ataccgtgt atactactgc 660
 accatcgggt gctctctgc tegtctctc cagggtaccc tggttaccgt atctagcgg 720
 ggtggtggat cgggtggcgg tagcgaagt cagctggtg aatctggcgg tggctcgg 780
 cagccgggtg gttctctgc tctctgtg gcagcgtctg gctcacctt cagcgattac 840
 tggatgtact gggctcgtca ggcaccgggt aaaggctctg aatgggtgct tgaatcaac 900
 accaacggtc tgatcaccaa ataccggac agcgtgaaag gtcgttcac catcagccgt 960
 gacaacgca aaaacacct gtactgcag atgaactctc tgcgtccgga agacactgcg 1020
 gttattact gcgcacgtc tccgtctgt tcaaccgtg gtcagggtac cctggttact 1080
 gtatcctctg cg 1092

<210> 29

<211> 780

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> анти-фон Віллебранд VHH

<400> 29

gaggtagcagc tgggtgaaag cgggtgggtg ctggttcagc cgggtgggtc tctcgtctg 60
 tcttgcgcag ctctggcgg tacctcagc tacaaccga tgggtgggt cgtcaggct 120
 ccgggtaaag gtcgtgaact ggttcggcg atctctgta cgggtggctc tacctactat 180
 ccggactccg tgggaaggctg ttaccatc tccgcgaca acgcgaaacg tatgtatac 240
 ctgcagatga acagcctgcg cgtgaagac accgcgggtt actattgtgc tgcagcgggt 300
 gttcgtctg aagacggctg tgtcgtacc ctgccgtccg aatacacctt ctggggtcag 360
 ggtaccagg ttaccgttc ttctcagcg gcggaagtgc agctgggtga atctggcgg 420
 ggtcgtgac agccgggtg ttctcgtcgt ctgtctgtg ctgcgtctg tgcacctc 480
 tctacaacc cgtgggtg gttcgtcag gcaccgggt aaggtcgtga actggtagcg 540
 gcaatctct gactggtg ctctacctac taccggact ctgtgaagg ccgctcacc 600
 atctctgtg acaacgcgaa acgtatggtg tacctcaga tgaactccct gcgtgcgga 660
 gacaccgag ttattactg cgcggcagct ggtgtcgtg cagaagacgg tctgttctg 720
 accctgccga gcgaatacac ctctggggg cagggtaccc aggtaacgt atctctcgt 780

<210> 30

<211> 581

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> mAb-VL '735 молекула (IL-13mAb: IL-4Vкаппа dAb)

735 молекула

<400> 30

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

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 355 360 365
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 370 375 380
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 385 390 395 400
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 405 410 415
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 420 425 430
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 435 440 445
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Ser Thr Val Ala Ala Pro Ser Gly
 450 455 460
 Ser Thr Val Ala Ala Pro Ser Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
 465 470 475 480
 Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 485 490 495
 Arg Ala Ser Arg Pro Ile Ser Asp Trp Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys
 500 505 510
 Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Ala Trp Ala Ser Ser Leu Gln
 515 520 525
 Gly Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 530 535 540
 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
 545 550 555 560
 Cys Gln Gln Glu Gly Trp Gly Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
 565 570 575
 Val Glu Ile Lys Arg
 580

<210> 31

<211> 219

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> 735 молекула

<400> 31

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ile
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

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

<210> 32

<211> 571

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> 15014

<400> 32

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Arg Glu Thr Val Phe Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110

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

485 490 495
 Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Ala Trp Ala Ser
 500 505 510
 Ser Leu Gln Gly Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 515 520 525
 Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
 530 535 540
 Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Glu Gly Trp Gly Pro Pro Thr Phe Gly Gln
 545 550 555 560
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala
 565 570

<210> 33

<211> 218

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> 15014

<400> 33

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

195 200 205
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 34
<211> 569
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> mAb-VL 15019

<400> 34
Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15
Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30
Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser
50 55 60
Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Asn Gln Val
65 70 75 80
Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Arg Glu Thr Val Phe Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110
Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Pro Gly Lys Gly Ser Thr Val Ala Ala Pro Ser Thr Asp Ile Gln Met
 450 455 460
 Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr
 465 470 475 480
 Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Pro Ile Ser Asp Trp Leu His Trp Tyr
 485 490 495
 Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Ala Trp Ala Ser
 500 505 510
 Ser Leu Gln Gly Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 515 520 525
 Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
 530 535 540
 Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Glu Gly Trp Gly Pro Pro Thr Phe Gly Gln
 545 550 555 560
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 565

<210> 35

<211> 218

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> mAb-VL 15019

<400> 35

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

<210> 36

<211> 570

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> mAb-VL 15020

<400> 36

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Arg Glu Thr Val Phe Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Pro Gly Lys Gly Ser Thr Val Ala Ala Pro Ser Thr Asp Ile Gln Met
 450 455 460
 Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr
 465 470 475 480
 Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Pro Ile Ser Asp Trp Leu His Trp Tyr
 485 490 495
 Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Ala Trp Ala Ser
 500 505 510
 Ser Leu Gln Gly Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 515 520 525
 Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
 530 535 540
 Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Glu Gly Trp Gly Pro Pro Thr Phe Gly Gln
 545 550 555 560
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
 565 570

<210> 37

<211> 218

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> mAb-VL 15020

<400> 37

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
 20 25 30
 Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95
 Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 195 200 205
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 210 215 220
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 225 230 235 240
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 245 250 255
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 260 265 270
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 275 280 285
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 290 295 300
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 305 310 315 320
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 325 330 335
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 340 345 350
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 355 360 365
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 370 375 380
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 385 390 395 400
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Ser
 405 410 415
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser
 420 425 430
 Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala
 435 440 445
 Ser Arg Pro Ile Ser Asp Trp Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 450 455 460
 Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Ala Trp Ala Ser Ser Leu Gln Gly Gly
 465 470 475 480
 Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
 485 490 495
 Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 500 505 510
 Gln Glu Gly Trp Gly Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 515 520 525
 Ile Lys
 530

<210> 39

<211> 218

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> mAb-VL 15021

<400> 39

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

<210> 40

<211> 481

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> DMS30045: DOM15-26-597 dAb N-(VEPKSSDK лінкер) &
 C-термінальний K-044-085 dAb ((TGLDSP)x4)

<400> 40

Glu Val Gln Leu Leu Val Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Lys Ala Tyr
 20 25 30
 Pro Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Glu Ile Ser Pro Ser Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Pro Arg Lys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Val Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys
 115 120 125
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 130 135 140
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 145 150 155 160
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 165 170 175
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 180 185 190
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 195 200 205
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 210 215 220
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 225 230 235 240
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 245 250 255
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 260 265 270
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 275 280 285
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 290 295 300
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 305 310 315 320
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 325 330 335
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Thr Gly Leu
 340 345 350
 Asp Ser Pro Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr
 355 360 365

Gly Leu Asp Ser Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
 370 375 380
 Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln
 385 390 395 400
 Trp Ile Gly Pro Glu Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 405 410 415
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr His Gly Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro
 420 425 430
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 435 440 445
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
 450 455 460
 Met Tyr Tyr Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 465 470 475 480
 Arg

<210> 41

<211> 475

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> DMS30046: DMS1576 з C-термінальним K-044-085 dAb
 ((TGLDSP)x4)

<400> 41

Glu Val Gln Leu Leu Val Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Lys Ala Tyr
 20 25 30
 Pro Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Glu Ile Ser Pro Ser Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Pro Arg Lys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 115 120 125
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 130 135 140
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

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

<210> 42

<211> 480

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> DMS30047 (містить модифікований C-кінець):

DOM15-26-597 dAb N-(VEPKSSDK лінкер) & C-термінальний
K-044-085 dAb мінус C-термінальний R ((TGLDSP)x4)

<400> 42

Glu Val Gln Leu Leu Val Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Lys Ala Tyr
20 25 30
Pro Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Glu Ile Ser Pro Ser Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Asp Pro Arg Lys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser Val Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys
115 120 125
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
130 135 140
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
145 150 155 160
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
165 170 175
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
180 185 190
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
195 200 205
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
210 215 220
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
225 230 235 240
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
245 250 255
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
260 265 270
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
275 280 285
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
290 295 300
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
305 310 315 320

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 325 330 335
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Thr Gly Leu
 340 345 350
 Asp Ser Pro Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr
 355 360 365
 Gly Leu Asp Ser Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
 370 375 380
 Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln
 385 390 395 400
 Trp Ile Gly Pro Glu Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 405 410 415
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr His Gly Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro
 420 425 430
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 435 440 445
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
 450 455 460
 Met Tyr Tyr Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 465 470 475 480

<210> 43

<211> 482

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> DMS30048 (містить модифікований C-кінець):

DOM15-26-597 dAb N-(VEPKSSDK лінкер) & C-термінальний
 K-044-085 dAb + A ((TGLDSP)x4

<400> 43

Glu Val Gln Leu Leu Val Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Lys Ala Tyr
 20 25 30
 Pro Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Glu Ile Ser Pro Ser Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Pro Arg Lys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

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

<210> 44

<211> 484

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> DMS30049 (містить модифікований C-кінець):

DOM15-26-597 dAb N-(VEPKSSDK лінкер) & C-термінальний
K-044-085 dAb +AAA ((TGLDSP)x4)

<400> 44

Glu Val Gln Leu Leu Val Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Lys Ala Tyr
 20 25 30
 Pro Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Glu Ile Ser Pro Ser Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Pro Arg Lys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Val Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys
 115 120 125
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 130 135 140
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 145 150 155 160
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 165 170 175
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 180 185 190
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 195 200 205
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 210 215 220
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 225 230 235 240
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 245 250 255
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys

260 265 270
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 275 280 285
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 290 295 300
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 305 310 315 320
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 325 330 335
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Thr Gly Leu
 340 345 350
 Asp Ser Pro Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr
 355 360 365
 Gly Leu Asp Ser Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
 370 375 380
 Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln
 385 390 395 400
 Trp Ile Gly Pro Glu Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 405 410 415
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr His Gly Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro
 420 425 430
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 435 440 445
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
 450 455 460
 Met Tyr Tyr Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 465 470 475 480
 Arg Ala Ala Ala

<210> 45

<211> 482

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> DMS30050 (містить модифікований C-кінець):

DOM15-26-597 dAb N-(VEPKSSDK лінкер) & C-термінальний
K-044-085 dAb +T ((TGLDSP)x4)

<400> 45

Glu Val Gln Leu Leu Val Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Lys Ala Tyr
 20 25 30
 Pro Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45
 Ser Glu Ile Ser Pro Ser Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Pro Arg Lys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Val Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys
 115 120 125
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 130 135 140
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 145 150 155 160
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 165 170 175
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 180 185 190
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 195 200 205
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 210 215 220
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 225 230 235 240
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 245 250 255
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 260 265 270
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 275 280 285
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 290 295 300
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 305 310 315 320
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 325 330 335
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Thr Gly Leu
 340 345 350
 Asp Ser Pro Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr
 355 360 365
 Gly Leu Asp Ser Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
 370 375 380
 Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln
 385 390 395 400
 Trp Ile Gly Pro Glu Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 405 410 415

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr His Gly Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro
 420 425 430
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 435 440 445
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
 450 455 460
 Met Tyr Tyr Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 465 470 475 480
 Arg Thr

<210> 46

<211> 474

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> DMS30051 (містить модифікований С-кінець): DMS1576
 з С-термінальним К-044-085 dAb мінус С-термінальний R
 ((TGLDSP)x4)

<400> 46

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

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 195 200 205
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 210 215 220
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 225 230 235 240
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 245 250 255
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 260 265 270
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 275 280 285
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 290 295 300
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 305 310 315 320
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 325 330 335
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Leu
 340 345 350
 Asp Ser Pro Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Leu Asp Ser Pro Asp
 355 360 365
 Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
 370 375 380
 Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Trp Ile Gly Pro Glu Leu
 385 390 395 400
 Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 405 410 415
 His Gly Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 420 425 430
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 435 440 445
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Met Tyr Tyr Pro His Thr
 450 455 460
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 465 470

<210> 47

<211> 476

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> DMS30052 (містить модифікований C-кінець): DMS1576
 з C-термінальним K-044-085 dAb +A ((TGLDSP)x4)

<400> 47

Glu Val Gln Leu Leu Val Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Lys Ala Tyr
 20 25 30
 Pro Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Glu Ile Ser Pro Ser Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Pro Arg Lys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 115 120 125
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 130 135 140
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 145 150 155 160
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 165 170 175
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 180 185 190
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 195 200 205
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 210 215 220
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 225 230 235 240
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 245 250 255
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 260 265 270
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 275 280 285
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 290 295 300
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 305 310 315 320
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 325 330 335
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Leu
 340 345 350
 Asp Ser Pro Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Leu Asp Ser Pro Asp
 355 360 365

Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
 370 375 380
 Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Trp Ile Gly Pro Glu Leu
 385 390 395 400
 Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 405 410 415
 His Gly Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 420 425 430
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 435 440 445
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Met Tyr Tyr Pro His Thr
 450 455 460
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala
 465 470 475

<210> 48

<211> 478

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> DMS30053 (містить модифікований C-кінець): DMS1576
 з C-термінальним K-044-085 dAb +AAA ((TGLDSP)x4)

<400> 48

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

165 170 175
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 180 185 190
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 195 200 205
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 210 215 220
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 225 230 235 240
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 245 250 255
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 260 265 270
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 275 280 285
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 290 295 300
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 305 310 315 320
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 325 330 335
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Leu
 340 345 350
 Asp Ser Pro Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Leu Asp Ser Pro Asp
 355 360 365
 Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
 370 375 380
 Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Trp Ile Gly Pro Glu Leu
 385 390 395 400
 Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 405 410 415
 His Gly Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 420 425 430
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 435 440 445
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Met Tyr Tyr Pro His Thr
 450 455 460
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala
 465 470 475

<210> 49

<211> 476

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> DMS30054 (містить модифікований C-кінець): DMS1576
з C-термінальним K-044-085 dAb +T ((TGLDSP)x4)

<400> 49

Glu Val Gln Leu Leu Val Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Lys Ala Tyr
20 25 30
Pro Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Glu Ile Ser Pro Ser Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Asp Pro Arg Lys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
115 120 125
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
130 135 140
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
145 150 155 160
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
165 170 175
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
180 185 190
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
195 200 205
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
210 215 220
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
225 230 235 240
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
245 250 255
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
260 265 270
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
275 280 285
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
290 295 300
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
305 310 315 320
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
325 330 335
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Leu

```

      340      345      350
Asp Ser Pro Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Leu Asp Ser Pro Asp
      355      360      365
Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
      370      375      380
Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Trp Ile Gly Pro Glu Leu
      385      390      395      400
Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
      405      410      415
His Gly Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
      420      425      430
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
      435      440      445
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Met Tyr Tyr Pro His Thr
      450      455      460
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
      465      470      475

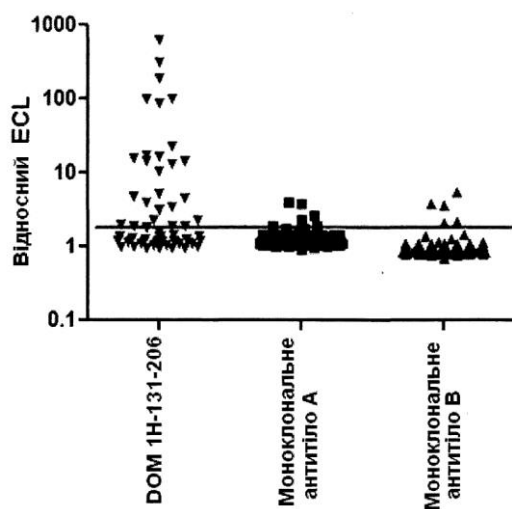
```

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Одиничний варіабельний домен імуноглобуліну, який зв'язується з TNFR1 та який є вибраним з групи, що включає: одиничний варіабельний домен VH імуноглобуліну, що зв'язується з TNFR1 та має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1, або являє собою амінокислотну послідовність, яка є на 99,5 %, 99 %, 98 % ідентичною амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 1, та яка додатково включає модифікацію, що являє собою С-термінальне подовження, яке є
- 10 амінокислотним подовженням від 1 до 5 амінокислот; та де вказане С-термінальне подовження складається з амінокислотного подовження, вибраного з (a) A (b) AS, (c) AST (d) ASTK, (e) ASTKG.
2. Одиничний варіабельний домен імуноглобуліну за пунктом 1, який є вибраним з наступних амінокислотних послідовностей: а) SEQ ID NO: 16; (b) SEQ ID NO: 19.
- 15 3. Одиничний варіабельний домен імуноглобуліну за будь-яким попередніх пунктів, де він є присутнім як злитий білок або кон'югат з додатковими молекулами.
4. Фармацевтична композиція, що містить одиничний варіабельний домен імуноглобуліну за будь-яким з попередніх пунктів у комбінації з фармацевтично або фізіологічно прийнятним носієм, наповнювачем або розріджувачем.
- 20 5. Одиничний варіабельний домен імуноглобуліну у відповідності з пунктами 1-3 або фармацевтична композиція у відповідності з п. 4 для застосування у виробництві лікарського засобу для лікування або запобігання принаймні одного захворювання або розладу або стану, вибраного із: запального захворювання або розладу, або респіраторного захворювання або розладу, або пульмонального захворювання або розладу.
- 25 6. Одиничний варіабельний домен імуноглобуліну за п. 2, де модифікований домен має амінокислотну послідовність, представлену у SEQ ID NO: 16, для застосування у виробництві лікарського засобу для лікування або профілактики принаймні одного захворювання або розладу, або стану, який вибирають з: артриту, псоріазу, запального захворювання кишечника (наприклад) хвороби Крона та неспецифічного виразкового коліту; або, наприклад,
- 30 респіраторних або пульмональних захворювань або розладів, наприклад, вибраних з: астми, хронічного обструктивного захворювання легень, запалення легень, пневмонії, раку легень, алергічного риніту, алергії, пульмонального запалення та гострого пошкодження легень (ALI), а також гострого респіраторного дистрес-синдрому (ARDS) та їх ускладнень.
- 35 7. Композиція у відповідності з пунктом 4 або одиничний варіабельний домен імуноглобуліну за будь-яким з пунктів 1-3 у вигляді ін'єкційної, пероральної, інгаляційної, небулізованої композиції, композиції пролонгованого вивільнення або висушеної заморожуванням композиції.

8. Пристрій для доставки, що включає композицію у відповідності з пунктом 4 або одиничний варіабельний домен імуноглобуліну за будь-яким з пунктів 1-3.
9. Пристрій для доставки, що включає композицію у відповідності з пунктом 4 або одиничний варіабельний домен імуноглобуліну за будь-яким з пунктів 1-3, де вказаний пристрій являє собою небулайзер або інгалятор.
10. Ізольована або рекомбінантна нуклеїнова кислота, що кодує одиничний варіабельний домен імуноглобуліну за будь-яким з пунктів 1-3.
11. Вектор, що включає ізольовану або рекомбінантну нуклеїнову кислоту за п. 10.
12. Клітина-хазяїн, що містить ізольовану або рекомбінантну нуклеїнову кислоту за п. 10 або ізольований вектор за п. 11.

Фігура 1: Кількість вже існуючих анти-медикаментозних антитіл в сироватках здорових суб'єктів



Фігура 2: амінокислотні послідовності:

(a) Немодифікований dAb DOM 1H-131-206 (анти-TNFR1)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAHETMWWVRQAPGKGLEWVSHIPPDGQDPFY
ADSVKGRFTISRDN SKNTLYQMNSLRAEDTAVYHCALLPKRGPWFDYWGQGLTVTVSS
(SEQ ID NO 1)

(b) Немодифікований dAb DOM 1H-131-511 (анти-TNFR1)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAHETMWWVRQAPGKGLEWVSHIPVGGQDPFY
ADSVKGRFTISRDN SKNTLYQMNSLRAEDTAVYYCALLPKRGPWFDYWGQGLTVTVSS
(SEQ ID NO 2)

(c) Немодифікований dAb DOM 1H-131-202 (анти-TNFR1)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAHETMWWVRQAPGKGLEWVSHIPPDGQDPFY
ADSVKGRFTISRDN SKNTLYQMNSLRAEDTAVYYCALLPKRGPWFDYWGQGLTVTVSS
(SEQ ID NO 3)

(d) Клон VHH2(d) є біспецифічного формату, що має IL6R зв'язуючий модуль, зв'язаний за рахунок GGGSGGGS зі зв'язуючим модулем альбуміну сироватки людини, як описано в WO2010100135:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSVFKINVMWYRQAPGKGREL VAGIISGGSTSYAD
SVKGRFTISRДHKNTLYQMNSLRPEDTAVYYCAFITTESDYDLGRRYWQGGTLTVTVSSGG
GGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSIS
GSGSDTLYADSVKGRFTISRДHKTTLYQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVS
S
(SEQ ID NO 4)

(e) Клон VHH2(e) є біспецифічного формату, що має TNF зв'язуючий модуль, зв'язаний зі зв'язуючим модулем альбуміну сироватки, який, в свою чергу, зв'язаний з TNF зв'язуючим модулем, використовуючи GGGSGGGS як лінкер, як описано в WO2010077422:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYVVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKY
PDSVKGRFTISRДHKNTLYQMNSLRPEDTAVYYCARSPSGFNRGQGLTVTVSSGGGGSG
GGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGS
DTLYADSVKGRFTISRДHKTTLYQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSSGGG
GSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYVVRQAPGKGLEWVSEINT
NGLITKYPDSVKGRFTISRДHKNTLYQMNSLRPEDTAVYYCARSPSGFNRGQGLTVTVSS
(SEQ ID NO 5)

Фігура 2 продовження:

(f) Клон VHH2(f) є бівалентного моноспецифічного формату, що містить дві ідентичні молекули, зв'язані за рахунок Ala-Ala-Ala лінкеру, кожна молекула є dAb, який може зв'язувати A1 домен фактору фон Віллебранда, як показано в WO2009115614:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA AISRTGGSTYY
PDSVEGRFTISRДHKKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQ
GTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGREL
VAISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRДHKKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVR
TLPSEYTFWGQGTQVTVSS
(SEQ ID NO 6)

(g) Клон VHH2(d) є біспецифічного формату, що має IL6R зв'язуючий модуль, зв'язаний за рахунок GGGSGGGS зі зв'язуючим модулем альбуміну сироватки людини, як описано в WO2010100135 з аланіновим подовженням:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSVFKINVMWYRQAPGKGRELVAIISGGSTSYAD
SVKGRFTISRДHKKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAFITTESDYDLGRRYWGQGTLVTVSSGG
GGSGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSIS
GSGSDTLYADSVKGRFTISRДHKKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
SA
(SEQ ID NO 7)

(h) Клон VHH2(e) є біспецифічного формату, що має TNF зв'язуючий модуль, зв'язаний зі зв'язуючим модулем альбуміну сироватки, який, в свою чергу, зв'язаний з TNF зв'язуючим модулем, використовуючи GGGSGGGS як лінкер, як описано в WO2010077422 з аланіновим подовженням:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKY
PDSVKGRFTISRДHKKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCARSPSGFNRGQGTLVTVSSGGGGSG
GGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGS
DTLYADSVKGRFTISRДHKKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGG
GSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWRQAPGKGLEWVSEINT
NGLITKYPDSVKGRFTISRДHKKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCARSPSGFNRGQGTLVTVSS
A
(SEQ ID NO 8)

(i) Клон VHH2(f) є бівалентного моноспецифічного формату, що містить дві ідентичні молекули, зв'язані за рахунок Ala-Ala-Ala лінкеру, кожна молекула є dAb, який може зв'язувати A1 домен фактору фон Віллебранда, як показано в WO2009115614 з аланіновим подовженням:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA AISRTGGSTYY
PDSVEGRFTISRДHKKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFWGQ
GTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGREL
VAISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRДHKKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVR
TLPSEYTFWGQGTQVTVSSA
(SEQ ID NO 9)

Фігура 2 продовження:

(j) DOM 1H-574-208

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDKYSMGWVRQAPGKGLEWWSQISDTADRTYY
AHAVKGRFTISRDN SKNTLYQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWWPF EYWGQGLVTVSS
(SEQ ID NO 10)

(k) DOM 1H-574-208-VL злиття:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDKYSMGWVRQAPGKGLEWWSQISDTADRTYY
AHAVKGRFTISRDN SKNTLYQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWWPF EYWGQGLVTVSSAS
TDIQTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRP IGTTL SWYQQKPGKAPKLLILWNSRLQSGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR
(SEQ ID NO 11)

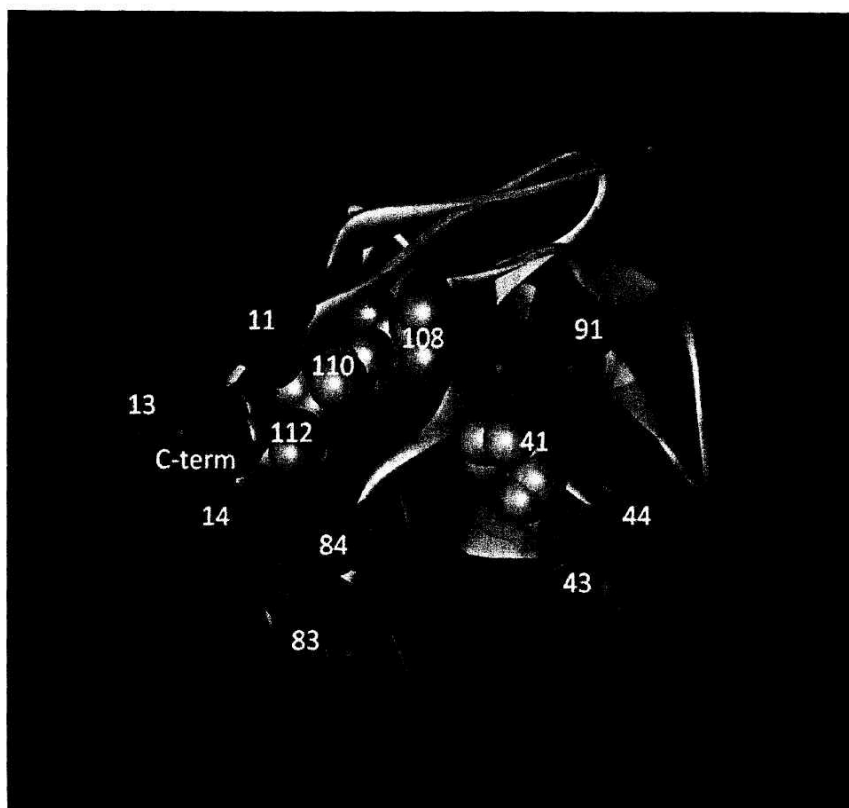
(l) DT04-H-033 (вихідний IL-13 dAb):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFADYGMWVRQAPGKGLEWWSITSYNGLYTYY
ADSVKGRFTISRDN SKNTLYQMNSLRAEDTAVYYCAKYEYSPESDFDYWGQGLVTVSS
(SEQ ID NO 12)

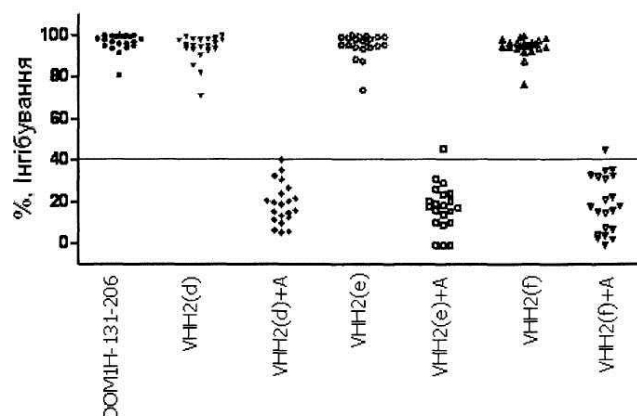
(m) DOM10H-53-567

GVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFVFAWYDMGWVRQAPGKGLEWWSIDWHGEVTY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYQMNSLRAEDTAVYYCATAEDEPGYDYWGQGLVTVSS
(SEQ ID NO 13)

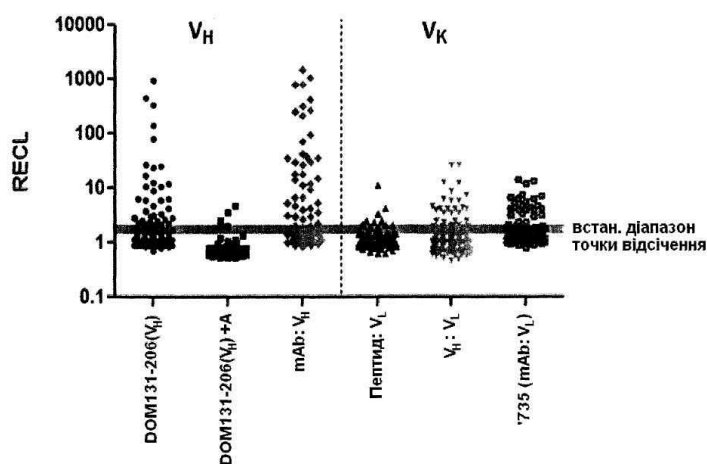
Фігура 3:



Фігура 4: Вплив одиничного аланінового подовження на VHH клони



Фігура 5: Вплив зв'язування з ADA: Dom131-206 нижче стосується Dom1h-131-206 dAb



Фігура 6а та 6b: Варіабельні послідовності легкого та важкого ланцюга анти-VH mAb M2.3G10.1G06 (CDR ділянки підкреслені):

(a) Легкий ланцюг

DIVMTQSQKFMSPTVGDRVSITCKASQNVGTAVAWYQQKPGQSPKLLIYASNRYTGVPDR
FTGSGSGTDFTLTINNMQSEDLADYFCQQYGSYPLTFGGGTKLEIK

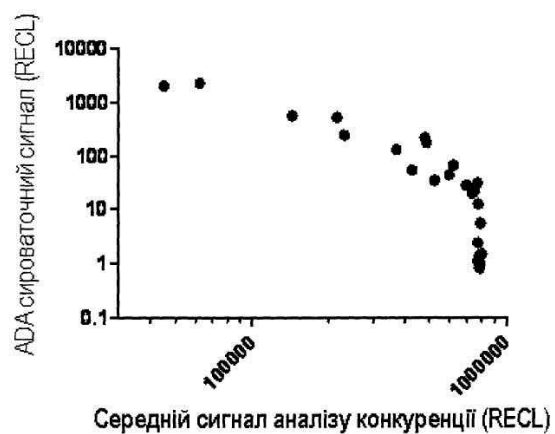
(SEQ ID NO 14)

(b) Важкий ланцюг

EVQLQQSGPVLVKGASVKMSCKASGYTLTESYMHVWKQSHGKSLEWIGVISPYNNGTTSY
NQKFKDKATLTVDKSSSTAYMELNSLTSEDSAVYYCTRRGIYYDPSWFAFWGQGTLTVTSA

(SEQ ID NO 15)

Фігура 7: Конкуренція між вже існуючим анти-VH ADA та mAb M2.3G10.1G06



Фігура 8: показує амінокислотні послідовності модифікованих анти-TNFR1 dAbs:

(a) DOM1h-131-206 dAb з подовженням одиничного аланіну:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAHETMVWVRQAPGKGLEWVSHIPPDGQDP
FYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYHCALLPKRGPWFDYWGQGLTVTV
SSA

(SEQ ID NO 16)

(b) DOM1h-131-206 dAb з подовженням одиничного аланіну та P14A каркасною мутацією

EVQLLESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFAHETMVWVRQAPGKGLEWVSHIPPDGQDP
FYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYHCALLPKRGPWFDYWGQGLTVTV
SSA

(SEQ ID NO 17)

(c) DOM1h-131-206 dAb з P14A каркасною мутацією

EVQLLESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFAHETMVWVRQAPGKGLEWVSHIPPDGQDP
FYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYHCALLPKRGPWFDYWGQGLTVTV
SS

(SEQ ID NO 18)

(d) DOM1h-131-206 dAb з ASTKG C-термінальним подовженням

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAHETMVWVRQAPGKGLEWVSHIPPDGQDP
FYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYHCALLPKRGPWFDYWGQGLTVTV
SSASTKG

(SEQ ID NO 19)

(e) DOM1h-131-206 dAb з ASTKG C-термінальним подовженням та P14A каркасною мутацією

EVQLLESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFAHETMVWVRQAPGKGLEWVSHIPPDGQDP
FYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYHCALLPKRGPWFDYWGQGLTVTV
SSASTKG

(SEQ ID NO 20)

Фігура 9: показує послідовності нуклеїнової кислоти TNFR1 dAbs

(a) DOM1h-131-206 dAb

GAAGTACAACCTGCTGGAGAGCGGTGGCGGCCTGGTTCAACCGGGTGGTTCCCTGCGCC
TGTCTGTGCGGCATCTGGTTTCACCTTCGCACACGAAACGATGGTGTGGGTTTCGCCAA
GCTCCGGGCAAAGGCCTGGAATGGGTAAGCCACATTCCTCCAGATGGCCAGGACCCAT
TCTATGCGGATTCCGTTAAGGGTCGCTTTACCATTTCTCGTGATAACTCCAAAAACACCC
TGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGCGCCGAGGATACTGCGGTGTACCATTTGTGCGCT
GCTGCCTAAACGTGGCCCGTGGTTCGATTACTGGGGTCAGGGTACTCTGGTCACCGTAA
GCAGC

(SEQ ID NO 21)

(b) Dom1h-131-206 з подовженням одиничного аланіну

GAAGTACAACCTGCTGGAGAGCGGTGGCGGCCTGGTTCAACCGGGTGGTTCCCTGCGCC
TGTCTGTGCGGCATCTGGTTTCACCTTCGCACACGAAACGATGGTGTGGGTTTCGCCAA
GCTCCGGGCAAAGGCCTGGAATGGGTAAGCCACATTCCTCCAGATGGCCAGGACCCAT
TCTATGCGGATTCCGTTAAGGGTCGCTTTACCATTTCTCGTGATAACTCCAAAAACACCC
TGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGCGCCGAGGATACTGCGGTGTACCATTTGTGCGCT
GCTGCCTAAACGTGGCCCGTGGTTCGATTACTGGGGTCAGGGTACTCTGGTCACCGTAA
GCAGCGCG

(SEQ ID NO 22)

(c) Dom1h-131-206 з ASTKG C-термінальним подовженням

GAAGTACAACCTGCTGGAGAGCGGTGGCGGCCTGGTTCAACCGGGTGGTTCCCTGCGCC
TGTCTGTGCGGCATCTGGTTTCACCTTCGCACACGAAACGATGGTGTGGGTTTCGCCAA
GCTCCGGGCAAAGGCCTGGAATGGGTAAGCCACATTCCTCCAGATGGCCAGGACCCAT
TCTATGCGGATTCCGTTAAGGGTCGCTTTACCATTTCTCGTGATAACTCCAAAAACACCC
TGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGCGCCGAGGATACTGCGGTGTACCATTTGTGCGCT
GCTGCCTAAACGTGGCCCGTGGTTCGATTACTGGGGTCAGGGTACTCTGGTCACCGTAA
GCAGCGCGTCTACCAAAGGT

(SEQ ID NO 23)

Фігура 10: показує послідовності нуклеїнової кислоти VHH молекули:

(a) анти-IL6 VHH

GAAGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGTGGTCTGGTTCAGCCGGGTGGTTCTCTGCGTC
TGTCCTTGCGCAGCTCTGGTAGCGTTTTCAAATCAACGTGATGGCGTGGTATCGTCAG
GCTCCGGGTAAAGGTCGTGAACCTGGTTCGGGGTATCATTTCTGGCGGTAGCACTTCCTA
CGCGGACTCCGTTAAAGGTCGTTTACCATCAGCCGCGACAACGCGAAAAACACCTGT
ACCTGCAGATGAACCTCTGCGTCCGGAAGATACCGCGGTTTACTATTGCGCGTTCATC
ACCACCGAATCTGACTACGACCTGGGTCGTCGTTATTGGGGTCAGGGTACTCTGGTAAC
CGTATCCTCTGGTGGTGGTGGTCTGGTGGTGGTCCGAAGTACAGCTGGTGAATCTG
GCGGTGGTCTGGTACAGCCGGGTAACCTCTGCGTCTGTCTTGTGCGGCTTCTGGTTTC
ACCTTCTCCAGCTTCGGTATGTCTTGGGTTCTGTCAGGCACCGGGTAAAGGTCGTGAATG
GGTGTCTAGCATCTCTGGCAGCGGTTCTGATACCTGTACGCTGACTCCGTGAAAGGTC
GTTTCACTATCTCCGCGACAACGCGAAAAACACCTGTACCTGCAGATGAACCTCTCTG
CGTCCGGAAGACACCGCTGTTTACTACTGCACCATCGGTGGTAGCCTGTCCCGTTCTTC
TCAGGGTACCCTGGTACTGTGAGCTCT

(SEQ ID NO 24)

(b) анти-TNF альфа VHH

GAAGTGCAGCTGGTAGAATCTGGCGGTGGTCTGGTACAGCCGGGTGGTTCTCTGCGTC
TGTCCTTGCGCAGCTTCTGGCTTACCTTCTCCGACTACTGGATGATTGGGTTCTGTCAG
GCGCCGGGTAAAGGTCGTGAATGGGTGTCTGAAATCAACACCAACGCGCTGATCACC
AATACCCGGAATCCGTGAAGGTCGTTTACCATCTCCGCGACAACGCGAAAAACACCT
CTGTACCTGCAGATGAACCTCTGCGTCCGGAAGATACCGCGGTTTACTATTGTGCGCG
TTCTCCGTCTGGTTTCAACCGTGGTCAGGGTACTCTGGTTACCGTAAGCTCTGGTGGTG
GTGGATCCGGCGGTGGTTCTGAAGTTCAGCTGGTTGAAAGCGGTGGTGGTCTGGTACA
GCCGGGTAACTCTCTGCGTCTGTCTTGTGCGGCTTCTGGCTTACCTTCTCCTTTTCG
GTATGTCTTGGGTTCTGTCAGGCACCGGGTAAAGGCTGGAATGGGTTTCCCTATCTCT
GGTAGCGGTTCTGACACCTGTACGCTGACTCTGTTAAAGGCCGCTTACCATCTCCCG
TGACAACGCGAAAAACACCTGTATCTGCAGATGAACCTCCGTGCGTCCGGAAGATACCG
CTGTATACTACTGCACCATCGGTGGCTCTCTGTCTCGTTCTTCTCAGGGTACCCTGGTTA
CCGTATCTAGCGGTGGTGGTGGATCCGGTGGCGGTAGCGAAGTTCAGCTGGTTGAATC
TGGCGGTGGTCTGGTTCAAGCGGGTGGTTCTCTGCGTCTGTCTTGTGACGCGCTCTGGC
TTCACCTTCAGCGATTACTGGATGTAAGTGGGTTCTGTCAGGCACCGGGTAAAGGTCGGA
ATGGGTGTCTGAAATCAACACCAACCGTCTGATCACCAAATACCCGGACAGCGTGAAG
GTCGTTTACCATCAGCGGTGACAACGCGAAAAACACCTGTACCTGCAGATGAACCTCT
CTGCGTCCGGAAGACACTGCGGTTTATTACTGCGCACGTTCTCCGTCTGGTTTCAACCG
TGGTCAGGGTACCCTGGTACTGTATCCTCT

(SEQ ID NO 25)

(c) анти-фон Віллебранд VHH

GAGGTACAGCTGGTGAAAGCGGTGGTGGTCTGGTTCAGCCGGGTGGTTCTCTGCGTC
TGTCCTTGCGCAGCTTCTGGCCGTACCTTACGTACAACCCGATGGGTTGGTTCCGTCAG
GCTCCGGGTAAAGGTCGTGAACCTGGTTCGCGCATCTCTCGTACCGGTGGCTTACCT
ACTATCCGGAATCCGTGGAAGGTCGTTTACCATCTCCGCGACAACGCGAAACGTATG
GTATACCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCTGAAGACACCGCGGTTTACTATTGTGCTGC
AGCGGGTGTTCGTGCTGAAGACGGTCTGTTCTGTAACCTGCCGTCCGAATACACCTTCT
GGGGTCAGGGTACCCAGGTTACCGTTTCTTCTGACGCGGCGGAAGTGCAGCTGGTTGA
ATCTGGCGGTGGTCTGGTACAGCCGGGTGGTTCTCTGCGTCTGTCTTGTGCTGCGTCTG
GTGCGACCTTCTCCTACAACCCGATGGGTTGGTCCGTCAGGCACCGGGTAAAGGTCGT
GAACTGGTAGCGGCAATCTCTCGCACTGGTGGCTCTACCTACTACCCGGACTCTGTTGA
AGGCCGCTTACCATCTCTCGTACAACGCGAAACGTATGGTGTACCTGCAGATGAACCT
CCCTGCGTGCAGGAAGACACCGCAGTTTATTACTGCGCGGCGAGCTGGTGTCTGTCAGA
AGACGGTCTGTTCGTACCTGCCGAGCGAATACACCTTCTGGGGTCAGGGTACCCAG
GTAACCGTATCTTCT

(SEQ ID NO 26)

Фігура 10 продовження:

(d) анти-IL6 VHH з подовженням одиничного аланіну

GAAGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGTGGTCTGGTTCAGCCGGGTGGTTCTCTGCGTCT
GTCTTGCGCAGCTCTGGTAGCGTTTTCAAAATCAACGTGATGGCGTGGTATCGTCAGGC
TCCGGGTAAAGGTCGTGAACCTGGTTCGGGTATCATTTCTGGCGGTAGCACTTCCTACGC
GGAATCCGTTAAAGGTCGTTTACCATCAGCCGCGACAACGCGAAAAACACCTGTACCT
GCAGATGAACCTCTGCGTCCGGAAGATACCGCGGTTTACTATTGCGCGTTCATCACCCAC
CGAATCTGACTACGACCTGGGTCGTCGTTATTGGGGTCAGGGTACTCTGGTAACCGTATC
CTCTGGTGGTGGTGGTCTGGTGGTGGTTCGGAAGTACAGCTGGTGGAAATCTGGCGGTG
GTCTGGTACAGCCGGTAACTCTCTGCGTCTGTCTTGTGCGGCTTCTGGTTTCACTTCT
CCAGCTTCGGTATGTCTTGGGTTCTGTCAGGCACCGGGTAAAGGTCTGGAATGGGTGTCTA
GCATCTCTGGCAGCGGTTCTGATACCTGTACGCTGACTCCGTGAAAGGTCGTTTCACTA
TCTCCCGCACAACGCGAAAAACACCTGTACCTGCAGATGAACCTCTCTGCGTCCGGAAG
ACACCGCTGTTTACTACTGCACCATCGGTGGTAGCCTGTCCCGTTCTTCTCAGGGTACCC
TGGTACTGTGAGCTCTGCG
(SEQ ID NO 27)

(e) анти-TNF альфа VHH з подовженням одиничного аланіну

GAAGTGCAGCTGGTAGAATCTGGCGGTGGTCTGGTACAGCCGGGTGGTTCTCTGCGTCT
GTCTTGCGCAGCTTCTGGCTTCACTTCTCCGACTACTGGATGATTGGGTTCTGTCAGGC
GCCGGGTAAAGGTCTGGAATGGGTGTCTGAAATCAACACCAACGGCTGATCACCAAATA
CCCGGACTCCGTGAAAGGTCGTTTACCATCTCCCGCACAACGCGAAAAACACCTGT
CCTGCGATGAACCTCTGCGTCCGGAAGATACCGCGGTTTACTATTGTGCGCGTTCCTCC
GTCTGGTTTCAACCGTGGTCAAGGTACTCTGGTTACCGTAAGCTCTGGTGGTGGTGGATC
CGGCGGTGGTCTGAAGTTCAGCTGGTTGAAAGCGGTGGTGGTCTGGTACAGCCGGGT
ACTCTCTGCGTCTGTCTTGTGCGGCTTCTGGCTTCACTTCTCTCTTTCGGTATGTCTTG
GGTTCGTCAGGCACCGGTAAAGGCTGGAATGGGTTTCTCTATCTCTGGTAGCGGTTT
TGACACCTGTACGCTGACTCTGTTAAAGGCGCTTCAACATCTCCCGTGACAACGCGAA
AACACACCTGTATCTGCAGATGAACCTCCGTGCGTCCGGAAGATACCGCTGTATACTACTG
CACCATCGGTGGCTCTGTCTGTCTTCTCAGGGTACCCTGGTTACCGTATCTAGCGG
TGGTGGTGGATCCGTTGGCGGTAGCGAAGTTCAGCTGGTTGAATCTGGCGGTGGTCTGG
TTCAGCCGGGTGGTTCTCTGCGTCTGTCTTGTGACGCGTCTGGCTTCACTTCAAGCGATT
ACTGGATGACTGGGTTCTGTCAGGCACCGGTAAAGGTCTGGAATGGGTGTCTGAAATCA
ACACCAACGGTCTGATCACCAATACCGGACAGCGTGAAGGTGCTTTACCATCAGCC
GTGACAACGCGAAAAACACCTGTACCTGCAGATGAACCTCTCTGCGTCCGGAAGACACTG
CGGTTTATTACTGCGCACGTTCTCCGTCTGGTTTCAACCGTGGTCAAGGTACCCTGGTTA
CTGTATCCTCTGCG
(SEQ ID NO 28)

(f) анти-фон Віллебранд VHH з подовженням одиничного аланіну

GAGGTACAGCTGGTGGAAAGCGGTGGTGGTCTGGTTCAGCCGGGTGGTTCTCTGCGTCT
GTCTTGCGCAGCTTCTGGCCGTACCTTCAGCTACAACCCGATGGGTTGGTTCGCTCAGGC
TCCGGGTAAAGGTCGTGAACCTGGTTCGGCGATCTCTCGTACCGGTGGCTTACCTACTA
TCCGGACTCCGTGGAAGGTCGTTTACCATCTCCCGCACAACGCGAAACGTATGGTATA
CCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCTGAAGACACCGCGGTTTACTATTGTCTGACGCGG
GTGTTCTGCTGAAGACGGTCTGTCTGTAACCTGCCGTCCGAATACACCTTCTGGGGTC
AGGGTACCCAGGTTACCGTTTCTTCTGACGCGCGGAAGTGCAGCTGGTTGAATCTGGC
GGTGGTCTGGTACAGCCGGGTGGTCTCTGCGTCTGTCTTGTGCTGCGTCTGGTCCGAC
CTTCTCCTACAACCCGATGGGTTGGTCCGTGAGGCACCGGGTAAAGGTCTGAACTGGT
AGCGCAATCTCTCGCACTGGTGGCTTACCTACTACCGGACTCTGTTGAAGGCCGCTT
CACCATCTCTCGTGACAACGCGAAACGTATGGGTACCTGCAGATGAACCTCCGTGCGTGC
GGAAGACACCGCAGTTTATTACTGCGCGGACGCTGGTGTTCGTGCAAGACGGTCTGTG
TTCGTACCTGCCGAGCGAATACACCTTCTGGGGTCAGGGTACCAGGTAAACGTATCTT
CTGCG
(SEQ ID NO 29)

Фігура 11: амінокислотні послідовності mAb:VL dAbs

(a) mAb-VL '735 молекула (IL-13mAb: IL-4Vкаппа dAb):

(i) Послідовність важкого ланцюга '735 молекули

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFYIKDITYMHWRQAPGGGLEWMGTIDPANGNT
 KYVPKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSYDDYHVDDYYAMDYWGQ
 GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
 FPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
 PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
 TLPSSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSK
 LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGSTVAAPSGSTVAAPSGSDIQ
 MTQSPSSLSASVGDRTITCRASRPISDWLHWYQQKPGKAPKLLIAWASSLQGGVPSRF
 SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY
 CQQEGWGPPTFGQGTKEIKR
 (SEQ ID NO 30)

(ii) Послідовність легкого ланцюга '735 молекули

DIVMTQSPSLPVTGPGEASISCRSSQNIVHINGNTYLEWYLQKPGQSPRLLIYKISDRFSG
 VPDFRSGSGSGTDFTLKISRVEADDVGIIYCFQGSHPVWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIF
 PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDHKLQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS
 TLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
 (SEQ ID NO 31)

(b) mAb-VL 15014

(i) Послідовність важкого ланцюга 15014 молекули

QVTLRESGPALVKPTQTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKGLEWLAHIYWDDDK
 RYNPSLKSRLTISKDTSRNQVLTMTNMDPVDATYYCARRETVFYWYFDVWGRGTLVT
 VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
 LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
 SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTV
 D KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGSTVAAPSTDIQMTQSPSSLSASV
 GDRVTITCRASRPISDWLHWYQQKPGKAPKLLIAWASSLQGGVPSRFSGSGSGTDFTLT
 ISLQPEDFATYYCQQEGWGPPTFGQGTKEIKRAAA
 (SEQ ID NO 32)

(ii) Послідовність легкого ланцюга 15014 молекули

DIVLTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVDDYDGDSYMNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLES
 GIPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDATYYCQQSNEDPPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIF
 PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDHKLQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS
 STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
 (SEQ ID NO 33)

Фігура 11 продовження:

(c)) mAb-VL 15019

(i) Послідовність важкого ланцюга (mAb компонент є показаним підресленим, лінкер є показаним курсивом, VL dAb компонент слідує за лінкером та є показаним жирним шрифтом)

QVTLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKGLEWLAHIYWDDDK
RYNPSLKSRLTISKDTSRNQVLTMTNMDPVDATYYCARRETVFYWYFDVWGRGTLVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGSTVAAPSTDIQMTQSPSSLSASV
GDRVITICRASRPISDWLHWYQQKPGKAPKLLIAWASSLQGGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQEGWGPPTFGQGTKEIKRT

(SEQ ID NO 34)

(ii) mAb-VL 15019 послідовність L-ланцюга

DIVLTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSDYDGD SYMNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLES
 GIPSRFSGSGSGTDFFTISSLQPEDATYYCQQSNEDPPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIF
 PPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDHLKLSGNSQESVTEQDSKSDSTYSLSS
 TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO 35)

(d)) mAb-VL 15020

(i) Послідовність важкого ланцюга (mAb компонент є показаним підресленим, лінкер є показаним курсивом, VL dAb компонент слідує за лінкером та є показаним жирним шрифтом):

QVTLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKGLEWLAHIYWDDDK
RYNPSLKSRLTISKDTSRNQVLTMTNMDPVDATYYCARRETVFYWYFDVWGRGTLVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGSTVAAPSTDIQMTQSPSSLSASV
GDRVITICRASRPISDWLHWYQQKPGKAPKLLIAWASSLQGGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQEGWGPPTFGQGTKEIKRTV

(SEQ ID NO 36)

Фігура 11 продовження:

(d ii) mAb-VL 15020 послідовність L-ланцюга

DIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDDYDGDSYMNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGI
PSRFGSGSGSDFTFTISSLQPEDATYYCQQSNEDPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDHKLQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLS
KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO 37)

(e)) mAb-VL 15021

(i) Послідовність важкого ланцюга (mAb компонент є показаним підкресленим, лінкер є показаним курсивом, VL dAb компонент слідує за лінкером та є показаним жирним шрифтом):

QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKLEWLAHIYWDDDKRY
NPSLKSRLTISKDTSRNQVLTMTNMDPVDATYYCARRETVFYWYFDVWGRGTLTVSSA
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGSTVAAPS**TDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPISD**
WLHWYQQKPGKAPKLLIAWASSLQGGVPSRFGSGSGSDFTFTISSLQPEDFATYYCQQE
GWGPPTFGQGTKVEIK

(SEQ ID NO 38)

(ii) mAb-VL 15021 послідовність L-ланцюга

DIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDDYDGDSYMNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGI
PSRFGSGSGSDFTFTISSLQPEDATYYCQQSNEDPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDHKLQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLS
KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO 39)

Фігура 12: амінокислотні послідовності Vh-Vk dAb-fc-dAb молекул

(a) DMS30045: DOM15-26-597 dAb N-(VEPKSSDK лінкер) & C-термінальний K-044-085 dAb ((TGLDSP)x4)

EVQLLVSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKAYPMWVRQAPGKGLEWVSEISPGSNTYY
ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPKLDYWGQGTLLVTVSSVEPKS
SDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKTGLDSTGLDSTGLDSTGLD
PTGLDSPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQWIGPELKWYQQKPKGAPKLLIYHGSILQ
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYMYYPHTFGQGTKVEIKR

(SEQ ID NO 40)

(b) DMS30046: DMS1576 з C-термінальним K-044-085 dAb ((TGLDSP)x4)

EVQLLVSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKAYPMWVRQAPGKGLEWVSEISPGSNTYY
ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPKLDYWGQGTLLVTVSSASTHT
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKTGLDSTGLDSTGLDSTGLDSTGLD
PDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQWIGPELKWYQQKPKGAPKLLIYHGSILQSGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYMYYPHTFGQGTKVEIKR

(SEQ ID NO 41)

(c) DMS30047 (містить модифікований C-кінець) : DOM15-26-597 dAb N-(VEPKSSDK лінкер) & C-термінальний K-044-085 dAb мінус C-термінальний R ((TGLDSP)x4)

EVQLLVSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKAYPMWVRQAPGKGLEWVSEISPG
SNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPKLDYWGQGTLLVTVSS
VEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKTGLDSTGLDSTGLD
PTGLDSPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQWIGPELKWYQQKPKGAPKLLIYHGSILQ
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYMYYPHTFGQGTKVEIK

(SEQ ID NO 42)

Фігура 12 продовження:

(d) DMS30048 (містить модифікований C-кінець): DOM15-26-597 dAb N- (VEPKSSDK лінкер) & C-термінальний K-044-085 dAb + A ((TGLDSP)x4)

EVQLLVSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKAYPMWVRQAPGKGLEWVSEISPSG
SNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPRKLDYWGQGLTVTVSS
VEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKTGLDSPTGLDS
PTGLDSPTGLDSPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQWIGPELKWYQQKPGKAPKLLIY
HGSILQSGVPSRFSFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYMYYPHTFGQGTKEIKRA

(SEQ ID NO 43)

(e) DMS30049 (містить модифікований C-кінець): DOM15-26-597 dAb N- (VEPKSSDK лінкер) & C-термінальний K-044-085 dAb +AAA ((TGLDSP)x4)

EVQLLVSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKAYPMWVRQAPGKGLEWVSEISPSG
SNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPRKLDYWGQGLTVTVSS
VEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKTGLDSPTGLDS
PTGLDSPTGLDSPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQWIGPELKWYQQKPGKAPKLLIY
HGSILQSGVPSRFSFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYMYYPHTFGQGTKEIKRAAA

(SEQ ID NO 44)

(f) DMS30050 (містить модифікований C-кінець): DOM15-26-597 dAb N- (VEPKSSDK лінкер) & C-термінальний K-044-085 dAb +T ((TGLDSP)x4)

EVQLLVSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKAYPMWVRQAPGKGLEWVSEISPSG
SNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPRKLDYWGQGLTVTVSS
VEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKTGLDSPTGLDS
PTGLDSPTGLDSPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQWIGPELKWYQQKPGKAPKLLIY
HGSILQSGVPSRFSFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYMYYPHTFGQGTKEIKRT

(SEQ ID NO 45)

Фігура 12 продовження:

(g) DMS30051 (містить модифікований C-кінець): DMS1576 з C-термінальним K-044-085 dAb мінус C-термінальний R ((TGLDSP)x4)

[illegible]

(SEQ ID NO 46)

(h) DMS30052 (містить модифікований C-кінець): DMS1576 з C-термінальним K-044-085 dAb +A ((TGLDSP)x4)

EVQLLVSGGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKAYPMWVRQAPGKGLEWVSEISPSG
SNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKDPKRLDLYWGQGLTVVSS
ASTHTCCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYDGVV
EVHNAKTKPREEQYNSTRYVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQDP
EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSGVDRIITHHNHYTKQSKLSLSPGKGLDPSPTGLDPSPTGLDPSPT
GLDSPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQWGLPELKWYQKPKGAPKLLIYHGSILQSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQMYYPHTFGQGTKEIKRA

(SEQ ID NO 47)

(i) DMS30053 (містить модифікований С-кінець): DMS1576 з С-термінальним K-044-085 dAb +AAA ((TGLDSP)x4)

EVQLLVSGGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKAYPMWVRQAPGKGLEWVSEISPSG
SNTYYADSVKGRFTISRDNSENTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKDRPKLIDYWGQGTLVTVSS
ASTHTCCPCPAPELLGGPSYFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQNPSTYRVSVSLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTSKAKGQPR
EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSGLTSPYKGTGLDPTGLDPTGLDPT
GLDSDPTDIQMTPQSSLSASVGMREITCRASWGPELWKYQPKGAPKLLIYHGSIQSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQMYMYPHTFGQGTKEIKRAAA

(SEQ ID NO 48)

Фігура 12 продовження:

(j) DMS30054 (містить модифікований С-кінець): DMS1576 з С-термінальним K-044-085 dAb +T ((TGLDSP)x4)

EVQLLVSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKAYPMWVRQAPGKGLEWVSEISPSG
SNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPKLDYWGQGTLLTVSS
ASTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGTGLDPTGLDPTGLDPT
GLDSPDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQWIGPELKWYQQKPGKAPKLLIYHGSILQSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYMYYPHTFGQGTKEIKRT

(SEQ ID NO 49)

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601