



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **100874** (13) **C2**
(51) МПК (2013.01)
C07K 16/00
C12P 21/08 (2006.01)
A61K 39/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2010 08706	(74) Представник:	Петров Андрій Володимирович, реєстр. №139
(22) Дата подання заявки:	16.12.2008	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	A. MERCHANT ET AL.: "An efficient route to human bispecific IgG." NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 16, July 1998 (1998-07), pages 677-681, XP002141015
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	11.02.2013		L. CHAN ET AL.: "Variable region domain exchange in human IgGs promotes antibody complex formation with accompanying structural changes and altered effector functions." MOLECULAR IMMUNOLOGY, vol. 41, no. 5, July 2004 (2004-07), pages 527-538, XP002519713
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	07024865.3		S. MORRISON: "Two heads are better than one." NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 25, no. 11, November 2007 (2007-11), pages 1233-1234, XP002470803
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	21.12.2007		Z. XIE ET AL.: "A new format of bispecific antibody: highly efficient heterodimerization, expression and tumor cell lysis." JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, vol. 296, 2005, pages 95-101, XP004738464
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	EP		J. RIDGWAY ET AL.: "'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization." PROTEIN ENGINEERING, vol. 9, no. 7, 1996, pages 617-621, XP002084766
(41) Публікація відомостей про заявку:	11.10.2010, Бюл.№ 19		T. SIMON & K.RAJEWSKY: "Antibody domain mutants demonstrate autonomy of the antigen binding site." THE EMBO JOURNAL, vol. 9, no. 4, April 1990 (1990-04), pages 1051-1056, XP002492563
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	11.02.2013, Бюл.№ 3		WO 96/27011 A, 06.09.1996
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	РСТ/EP2008/010704, 16.12.2008		WO 93/06217 A, 01.04.1993
(72) Винахідник(и): Клайн Крістіан (DE/CH), Шефер Вольфганг (DE)			WO 99/37791 A, 29.07.1999
(73) Власник(и): Ф. ХОФФМАНН-ЛЯ РОШ АГ, Grenzacherstrasse 124, CH-4002 Basel, Switzerland (CH)			

(54) ДВОВАЛЕНТНІ БІСПЕЦИФІЧНІ АНТИТІЛА

(57) Реферат:

Винахід стосується двовалентного біспецифічного антитіла, що містить легкий ланцюг і важкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з першим антигеном; і легкий ланцюг і важкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з другим антигеном, у якому CL- і CH1-домени константних областей замінені один на одного.

UA 100874 C2

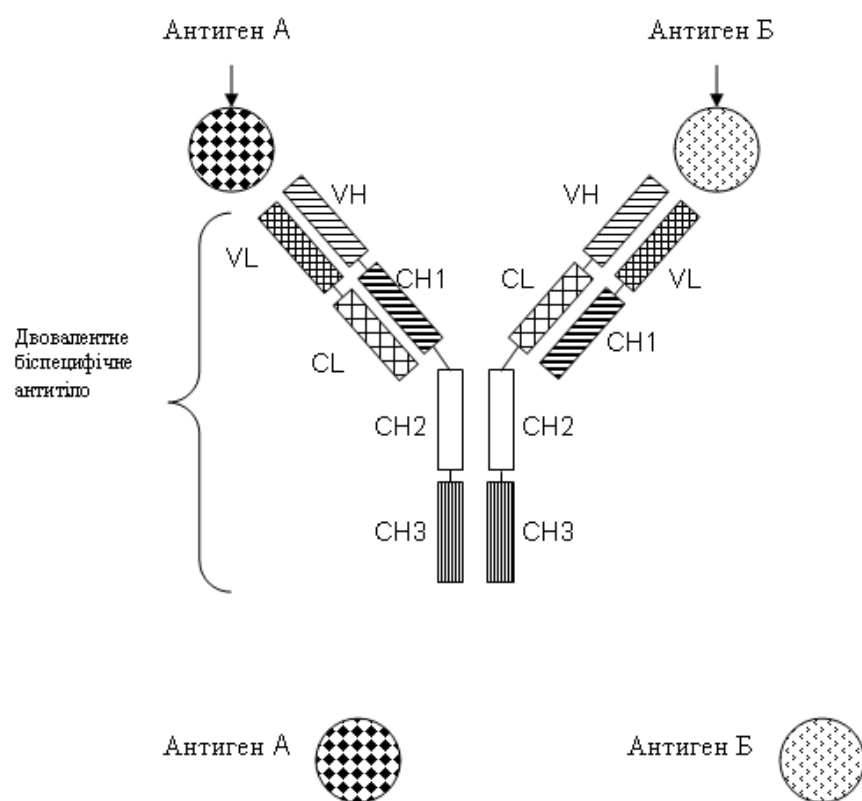


Fig.2

Даний винахід належить до нових двовалентних біспецифічних антитіл, їх одержанню й застосуванню.

Передумови створення винаходу

У даній області відомі сконструйовані білки, такі як бі- і мультиспецифічні антитіла, які можуть зв'язуватися з двома або більшою кількістю антигенів. Зазначені мультиспецифічні еднальні білки можна створювати на основі методів клітинного злиття, хімічної кон'югації або рекомбінантної ДНК.

В останні роки створена широка розмаїтість форматів рекомбінантних біспецифічних антитіл, наприклад, чотиривалентні біспецифічні антитіла, отримані шляхом злиття, наприклад, антитіла IgG-формату й одноланцюгових доменів (див., наприклад, Coloma M.J. і ін., *Nature Biotech* 15, 1997, сс. 159-163; WO 2001/077342 і Morrison S.L., *Nature Biotech* 25, 2007, сс. 1233-1234).

Розроблено також декілька інших нових форматів, у яких уже не зберігалася основна структура антитіла (IgA, IgD, IgE, IgG або IgM), таких як діа-, триа- або тетрабіла, мінібіла, декілька одноланцюгових форматів (scFv, біс-scFv), які можуть зв'язувати два або більшу кількість антигенів (Holliger P. і ін., *Nature Biotech* 23, 2005, сс. 1126 - 1136; Fischer N., Leger O., *Pathobiology* 74, 2007, сс. 3-14; Shen J і ін., *Journal of Immunological Methods* 318, 2007, сс. 65-74; Wu C. і ін., *Nature Biotech* 25, 2007, сс. 1290-1297)

У всіх зазначених форматах використовують лінкери або для злиття основної структури антитіла (IgA, IgD, IgE, IgG або IgM) з додатковим еднальним білком (наприклад, scFv), або для злиття, наприклад, двох Fab-фрагментів або scFv (Fischer N., Leger O., *Pathobiology* 74, 2007, сс. 3-14). Хоча очевидно, що лінкери мають перевагу при створенні біспецифічних антитіл, з ними можуть бути зв'язані також проблеми терапевтичного плану. Фактично ці чужорідні пептиди можуть викликати імунну відповідь проти самого лінкера або області стику між білком і лінкером. Крім того, гнучка природа цих пептидів робить їх більше чутливими до протеолітичного розщеплення, що може привести до поганої стабільності, агрегації й підвищення імуногенності антитіла. Крім того, може існувати необхідність у підтримці ефекторних функцій, таких як комплементзалежна цитотоксичність (CDC) або антитіло-обумовлена клітиннозалежна цитотоксичність (ADCC), які опосередковуються зв'язуванням з Fc-рецептором, шляхом збереження високого ступеня подібності з антитілами, що зустрічаються у природних умовах.

Таким чином, в ідеальному варіанті необхідно створювати біспецифічні антитіла, які мають дуже подібну загальну структуру з антитілами, що зустрічаються у природних умовах (типу IgA, IgD, IgE, IgG або IgM), з мінімальним відхиленням від людських послідовностей.

Відповідно до одного з підходів біспецифічні антитіла з високим ступенем подібності з антитілами, що зустрічаються у природних умовах, створювали за допомогою технології квадром (квадрогібридом) (див. Milstein C. і A.C. Cuello, *Nature*, 305, 1983, сс. 537-540) на основі соматичного злиття двох різних клітинних ліній гібридом, що експресують мишачі моноклональні антитіла з необхідними специфічностями біспецифічного антитіла. У результаті випадкового спарювання важких і легких ланцюгів двох різних антитіл у лінії клітин гібрида гібридами (або квадроми), що утвориться, одержують аж до 10 різних видів антитіл, з яких тільки одне являє собою необхідне функціональне біспецифічне антитіло. Через присутність побічних продуктів, що мають помилкове спарювання, і у значній мірі зниженого виходу продукту, потрібні більше складні процедури очищення (див., наприклад, Morrison S.L., *Nature Biotech* 25, 2007, сс. 1233-1234). У цілому, ця ж проблема, пов'язана з побічними продуктами, що мають помилкові спарювання, зберігається при застосуванні методів рекомбінантної експресії.

Підхід, за допомогою якого можна обійти проблему, пов'язану з побічними продуктами, що мають помилкові спарювання, відомий за назвою «knobs-into-holes» (взаємодія по типу «виступ-западина»), спрямований на посилення спарювання двох різних важких ланцюгів антитіла шляхом інтродукції мутацій у CH3-домени для модифікації поверхні розділу в області контакту. На одному ланцюзі амінокислоти, що мають більші розміри, заміняли на амінокислоти з короткими бічними ланцюгами для створення «западини». І, навпаки, амінокислоти з більшими бічними ланцюгами інтродуктували в інший CH3-домен, створюючи «виступ». Шляхом спільної експресії цих двох важких ланцюгів (і двох ідентичних легких ланцюгів, які повинні відповідати обом важким ланцюгам), одержували високий вихід гетеродимерної формації («виступ-западина») відносно гомодимерної формації («западина-западина» або «виступ-виступ») (Ridgway J. B., Presta L.G., Carter P. і WO 1996/027011). Процентний вміст гетеродимера можна додатково підвищувати шляхом ремоделювання поверхонь розділу двох CH3-доменів за допомогою технології фагового дисплея й інтродукції дисульфідного містка для стабілізації гетеродимерів (Merchant A.M. і ін., *Nature Biotech* 16, 1998, сс. 677-681; Atwell S., Ridgway J.B.,

Wells J.A., Carter P., J Mol Biol 270, 1997, сс.26–35). Нові підходи до технології «knobs-into-holes» описані, наприклад, в EP 1870459A1. Хоча зазначений формат, імовірно, є дуже привабливим, у цей час відсутні дані про його розвиток у напрямку клінічного застосування. Одним з важливих обмежень цієї стратегії є те, що легкі ланцюги двох батьківських антитіл повинні бути

ідентичними для попередження помилкових спарювань і формування неактивних молекул. Таким чином, ця технологія не придатна для більше легкого створення рекомбінантних двовалентних біспецифічних антитіл до двох антигенів з використанням в якості вихідних двох антитіл до першого й другого антигену, оскільки повинні бути оптимізовані або важкі ланцюги цих антитіл, і/або ідентичні легкі ланцюги.

У Simon T. і ін., EMBO Journal, 9, 1990, сс. 1051 -1056 описані мутанти доменів моноспецифічних антитіл.

Короткий виклад сутності винаходу

Даний винахід відноситься до двовалентного біспецифічного антитіла, що містить:

а) легкий ланцюг і важкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з першим антигеном;

і б) легкий ланцюг і важкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з другим антигеном, у якому CL- і CH1-домени константних областей (константні CL- і CH1-домени) замінені один на одного.

Наступним варіантом здійснення винаходу є спосіб одержання двовалентного біспецифічного антитіла, запропонованого у винаході, який полягає у тому, що

а) трансформують клітину-хазяїна

- векторами, які містять молекули нуклеїнових кислот, що кодують легкий ланцюг і важкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з першим антигеном,

- векторами, які містять молекули нуклеїнових кислот, що кодують легкий ланцюг і важкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з другим антигеном, у якому CL- і CH1-домени константних областей замінені один на одного;

б) культивують клітину-хазяїна в умовах, які дозволяють синтезувати зазначену молекулу антитіла; і

в) виділяють молекулу антитіла з культури.

Наступним варіантом здійснення винаходу є клітина-хазяїн, що містить

- вектори, які містять молекули нуклеїнових кислот, що кодують легкий ланцюг і важкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з першим антигеном,

- вектори, які містять молекули нуклеїнових кислот, що кодують легкий ланцюг і важкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з другим антигеном, у якому CL- і CH1-домени константних областей замінені один на одного.

Наступним варіантом здійснення винаходу є композиція, переважно фармацевтична або діагностична композиція антитіла, запропонованого у винаході.

Наступним варіантом здійснення винаходу є фармацевтична композиція, що містить антитіло, запропоноване у винаході, і щонайменше один фармацевтично прийнятний ексципієнт.

Наступним варіантом здійснення винаходу є спосіб лікування пацієнта, що має потребу у терапії, який відрізняється тим, що вводять пацієнтові у терапевтично ефективній кількості антитіло, запропоноване у винаході.

Докладний опис винаходу

Винахід відноситься до двовалентного біспецифічного антитіла, що містить:

а) легкий ланцюг і важкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з першим антигеном;

і б) легкий ланцюг і важкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з другим антигеном, у якому CL- і CH1-домени константних областей замінені один на одного.

Таким чином, двовалентне біспецифічне антитіло містить:

а) перший легкий ланцюг і перший важкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з першим антигеном; і

б) другий легкий ланцюг і другий важкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з другим антигеном, у якому CL- і CH1-домени константних областей другого легкого ланцюга й другого важкого ланцюга замінені один на одного.

Таким чином, для створення антитіла, яке специфічно зв'язується з другим антигеном, застосовують наступні процеси:

у легкому ланцюзі

CL-домени константної області легкого ланцюга заміняють на CH1-домени константної області важкого ланцюга зазначеного антитіла;

і у важкому ланцюзі

CH1-домен константної області важкого ланцюга заміняють на CL-домен константної області легкого ланцюга зазначеного антитіла.

Поняття «антитіло» у контексті даного опису відноситься до повних моноклональних антитіл.

5 Такі повні антитіла складаються з двох пар, кожна з яких включає «легкий ланцюг» (LC) і «важкий ланцюг» (HC) (зазначені пари легкий ланцюг (LC)/важкий ланцюг (HC) скорочено позначають у контексті даного опису як LC/HC). Легкі ланцюги й важкі ланцюги зазначених антитіл являють собою поліпептиди, що складаються з декількох доменів (областей). У повному антитілі кожний важкий ланцюг містить варіабельну область важкого ланцюга (скорочено позначена у контексті даного опису як HCVR або VH) і константну область важкого ланцюга. 10 Константна область важкого ланцюга містить константні CH1-, CH2- і CH3-домени важкого ланцюга (в антитілі, що відноситься до класів IgA, IgD і IgG) і необов'язково константний CH4-домен важкого ланцюга (в антитілі, що відноситься до класів IgE і IgM). Кожний легкий ланцюг містить варіабельний домен легкого ланцюга VL і константний домен легкого ланцюга CL. 15 Структура одного з класів антитіл, що зустрічаються у природних умовах, а саме антитіла класу IgG, показана, наприклад, на фіг. 1. Варіабельні домени VH і VL можна додатково підрозділяти на області гіперваріабельності, позначені як гіперваріабельні ділянки (CDR), що перемижуються більше консервативними областями, які називають каркасними ділянками (FR). Кожна VH- і VL-область складається з трьох CDR і чотирьох FR, які розташовані у 20 напрямку від амінокінця до карбоксикінця у наступному порядку: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 ((Janeway C.A., Jr. і ін., Immunobiology., 5-е вид., вид-в Garland Publishing, 2001; і Woof J., Burton D., Nat Rev Immunol 4, 2004, сс. 89-99). Дві пари, кожна з яких включає важкий ланцюг і легкий ланцюг (HC/LC), мають здатність специфічно зв'язуватися з тим самим антигеном. Таким чином, повне антитіло являє собою двовалентне моноспецифічне антитіло. 25 Зазначені «антитіла» являють собою, наприклад, мишачі антитіла, людські антитіла, химерні антитіла, гуманізовані антитіла й створені за допомогою генної інженерії антитіла (варіанти антитіл або мутантні антитіла), якщо вони зберігають свої характерні властивості. Найбільше кращими є людські або гуманізовані антитіла, насамперед у вигляді рекомбінантних людських або гуманізованих антитіл.

30 Відомо п'ять типів важких ланцюгів антитіл ссавців, які позначають грецькими буквами: α , δ , ϵ , γ і μ (Janeway C.A., Jr. і ін., Immunobiology., 5-е вид., вид-в Garland Publishing, 2001). Присутній тип важкого ланцюга визначає клас антитіла; зазначені ланцюги виявлені в антитілах типу IgA, IgD, IgE, IgG і IgM відповідно (Rhoades R.A., Pflanzner R.G., Human Physiology, 4-е вид., вид-в Thomson Learning, 2002). Пізні важкі ланцюги відрізняються за розміром й складом; α і γ містять приблизно 450 амінокислот, а μ і ϵ складаються приблизно з 550 амінокислот. 35

Кожний важкий ланцюг містить дві області, тобто константну область і варіабельну область. Константна область є ідентичною у всіх антитілах того самого ізотипу, але відрізняється в антитілах різного ізотипу. Важкі ланцюги γ , α і δ містять константну область, що складається з трьох константних доменів CH1, CH2 і CH3 (вибудовані в ряд) і шарнірної області, що надає 40 гнучкість (Woof J., Burton D., Nat Rev Immunol 4, 2004, сс. 89-99); важкі ланцюги μ і ϵ містять константну область, що складається з чотирьох константних доменів CH1, CH2, CH3 і CH4 (Janeway C.A., Jr. і ін., Immunobiology., 5-е вид., вид-в Garland Publishing, 2001). Варіабельна область важкого ланцюга відрізняється в антитілі, які продукуються різними В-клітинами, але є однаковою у всіх антитіл, які продукуються індивідуальною В-клітиною або В-клітинним клоном. 45 Варіабельна область кожного важкого ланцюга антитіла містить приблизно 110 амінокислот і складається з одного домена.

У ссавців відомо тільки два типи легких ланцюгів, які позначають як лямбда (λ) і каппа (κ). Легкий ланцюг складається з двох послідовно розташованих доменів: один константний домен CL і один варіабельний домен VL. Приблизна довжина легкого ланцюга становить 211-217 50 амінокислот. Переважно легкий ланцюг являє собою легкий каппа (κ)-ланцюг, а константний домен CL переважно являє собою C-каппа (κ).

Поняття «моноклональне антитіло» або «композиція моноклонального антитіла» у контексті даного опису відноситься до препарату молекул антитіл однакового амінокислотного складу.

55 «Антитіла» відповідно до винаходу можуть являти собою антитіла будь-якого класу (наприклад, IgA, IgD, IgE, IgG і IgM, переважно IgG або IgE) або підкласу (наприклад, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 і IgA2, переважно IgG1), при цьому обидва антитіла, з яких виводять двовалентне біспецифічне антитіло, запропоноване у винаході, мають Fc-область одного й того самого підкласу (наприклад, IgG1, IgG4 тощо, переважно IgG1), переважно того самого алотипу (наприклад, кавказького).

60

Поняття «Fc-область (фрагмент) антитіла» добре відомо фахівцям у даній області й її визначають на основі розщеплення антитіл папаїном. Антитіла, запропоновані у винаході, містять в якості Fc-області переважно Fc-область, отриману з людського антитіла, і переважно всі інші частини людських константних областей. Fc-область антитіла безпосередньо бере участь в активації комплементу, C1q-зв'язуванні, C3-активації й зв'язуванні Fc-рецептора. У той час як вплив антитіла на систему комплементу залежить від певних умов, зв'язування з C1q обумовлено певними сайтами зв'язування в Fc-області. Зазначені сайти зв'язування відомі у даній області й описані, наприклад, у Lukas T.J. і ін., *J. Immunol.* 127, 1981, сс. 2555-2560; Brunhouse R. і Cebra J.J., *Mol. Immunol.* 16, 1979, сс. 907-917; Burton D.R. і ін., *Nature* 288, 1980, сс. 338-344; Thommesen J.E. і ін., *Mol. Immunol.* 37, 2000, сс. 995-1004; Idusogie E.E. і ін., *J. Immunol.* 164, 2000, сс. 4178-4184; Hezareh M. і ін., *J. Virol.* 75, 2001, сс. 12161-12168; Morgan A. і ін., *Immunology* 86, 1995, сс. 319-324; і EP 0307434. Зазначені сайти зв'язування являють собою, наприклад, L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 і P329 (нумерація дана відповідно до нумерації EU Кебота, див. нижче). Антитіла підкласів IgG1, IgG2 і IgG3, як правило, характеризуються здатністю до активації комплементу, C1q-зв'язуванню й C3-активації, у той час як IgG4 не активують систему комплементу, не зв'язуються з C1q і не активують C3. Переважно Fc-область являє собою людську Fc-область.

Поняття «химерне антитіло» відноситься до антитіла, що містить варіабельну область, тобто єднальну область, отриману з одного джерела або з тих самих видів, і щонайменше частину константної області, отриману з іншого джерела або інших видів, і його, як правило, одержують з використанням методів рекомбінантої ДНК. Кращими є химерні антитіла, які містять мишачу варіабельну область і людську константну область. Іншими кращими формами «химерних антитіл», що підпадають під обсяг даного винаходу, є антитіла, константна область яких модифікована або змінена у порівнянні з вихідним антитілом з метою одержання властивостей, запропонованих у винаході, насамперед відносно зв'язування C1q і/або зв'язування Fc-рецептора (FcR). Такі химерні антитіла позначають також як «антитіла переключеного класу». Химерні антитіла є продуктом експресії генів імуноглобулінів, що містять сегменти ДНК, які кодують варіабельні області імуноглобулінів, і сегменти ДНК, які кодують константні області імуноглобулінів. Методи одержання химерних антитіл включають звичайні методи рекомбінантої ДНК і генної трансфекції, які добре відомі у даній області (див., наприклад, Morrison S.L. і ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1984, сс. 6851-6855; US 5202238 і US 5204244).

Поняття «гуманізоване антитіло» відноситься до антитіл, у яких каркасні або «гіперваріабельні ділянки» (CDR) модифіковані так, що вони містять CDR імуноглобуліну іншої специфічності у порівнянні зі специфічністю батьківського імуноглобуліну. У кращому варіанті здійснення винаходу для одержання «гуманізованого антитіла» мишачий CDR трансплантують у каркасну ділянку людського антитіла (див., наприклад, Riechmann L. і ін., *Nature* 332, 1988, сс. 323-327; і Neuberger M.S. і ін., *Nature* 314, 1985, сс. 268-270). Особливо кращі CDR відповідають CDR, які являють собою послідовності, що розпізнають антигени, зазначені вище для химерних антитіл. Іншими формами «гуманізованих антитіл», що підпадають під обсяг даного винаходу, є антитіла, константна область яких додатково модифікована або змінена у порівнянні з вихідним антитілом з метою одержання властивостей, запропонованих у винаході, насамперед відносно зв'язування C1q і/або зв'язування Fc-рецептора (FcR).

Поняття «людське антитіло» у контексті даного опису відноситься до антитіл, варіабельні й константні області яких виведені з послідовностей імуноглобуліну людських зародків лінії. Людські антитіла добре відомі у даній області (van Dijk M.A. і van de Winkel J.G., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5, 2001, сс. 368-374). Людські антитіла можна одержувати також у трансгенних тварин (наприклад, мишах), які у результаті імунізації можуть продукувати повний спектр або певну частину людських антитіл при відсутності виробництва ендогенного імуноглобуліну. Перенос набору генів імуноглобулінів людської зародкової лінії у таку мутантну зародкову лінію мишей повинен приводити до виробництва людських антитіл після антигенної стимуляції (див., наприклад, Jakobovits A., і ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1993, сс. 2551-2555; Jakobovits A. і ін., *Nature* 362, 1993, сс. 255-258; Bruggemann M. і ін., *Year Immunol.* 7, 1993, сс. 33-40). Людські антитіла можна одержувати також за допомогою фагових дисплейних бібліотек (Hoogenboom H.R. і Winter, G., *J. Mol. Biol.* 227, 1992, сс. 381-388; Marks J.D. і ін., *J. Mol. Biol.* 222, 1991, сс. 581-597). Для одержання людських моноклональних антитіл можна використовувати також методи Cole зі співавторами й Boerner зі співавторами (Cole і ін., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, під ред. Alan R. Liss, 1985, с. 77; і Boerner P., і ін., *J. Immunol.* 147, 1991, сс. 86-95). Як уже було відзначено для химерних і гуманізованих антитіл, запропонованих у винаході, поняття «людське антитіло» включає також такі антитіла, константна область яких

модифікована з метою одержання властивостей, запропонованих у винаході, насамперед відносно зв'язування C1q і/або зв'язування FcR, наприклад, шляхом «перемикання класу», тобто заміни або мутації Fc-областей (наприклад, IgG1 на IgG4 і/або IgG1/IgG4-мутація).

Поняття «рекомбінантне людське антитіло» у контексті даного опису відноситься до всіх людських антитіл, які одержують, експресують, створюють або виділяють за допомогою методів рекомбінації, наприклад, до антитіл, виділених із клітини-хазяїна, такої як NS0- або CHO-клітина, або із тварини (наприклад, миші), що є трансгенною через присутність людських генів імунoglobulinів або антитіл, що експресуються з використанням рекомбінантного експресійного вектора, яким трансфектована клітина-хазяїн. Такі рекомбінантні людські антитіла мають варіабельну й константну області, які перебувають у перетвореній формі. Рекомбінантні людські антитіла, запропоновані у винаході, піддають соматичній гіпермутації *in vivo*. Таким чином, амінокислотні послідовності VH- і VL-областей рекомбінантних антитіл являють собою послідовності, які, хоча й виведені з послідовностей VH і VL людської зародкової лінії й родинних їм ліній, можуть не існувати у природних умовах у спектрі зародкової лінії людських антитіл *in vivo*.

Поняття «варіабельна область (домен)» (варіабельний домен легкого ланцюга (VL), варіабельна область важкого ланцюга (VH)) у контексті даного опису відноситься до областей кожної з пари легких і важких ланцюгів, які беруть участь безпосередньо у зв'язуванні антитіла з антигеном. Домени варіабельних людських легких і важких ланцюгів мають однакову загальну структуру, і кожний домен містить чотири каркасних ділянки (FR), послідовності яких є досить консервативними, зв'язаних трьома «гіперваріабельними ділянками» (або визначальними комплементарними ділянками, CDR). Каркасні ділянки адаптовані до β -складчастої конформації, а CDR можуть утворювати петлі, що з'єднують β -складчасту структуру. CDR у кожному ланцюзі зберігають їхню тривимірну структуру за допомогою каркасних ділянок і утворюють разом з CDR з інших ланцюгів антигензв'язуючий центр. CDR3-ділянки важкого й легкого ланцюгів антитіла грають особливо важливу роль у специфічності зв'язування/афінності антитіл, запропонованих у винаході, і тому є додатковим об'єктом винаходу.

Поняття «гіперваріабельна ділянка» або «антигензв'язуючий центр антитіла» у контексті даного опису відносяться до амінокислотних залишків антитіла, які відповідальні за зв'язування антигену. Гіперваріабельна ділянка містить амінокислотні залишки з «визначальних комплементарних ділянок» або «CDR». «Каркасні» або «FR»-ділянки являють собою ділянки варіабельної області, відмінні від зазначених у даному описі залишків гіперваріабельної ділянки. Таким чином, легкі й важкі ланцюги антитіла містять у напрямку від N- до C-кінця ділянки FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 і FR4. CDR кожного ланцюга розділені амінокислотами зазначеної каркасної ділянки. Зокрема, CDR3 важкого ланцюга являють собою ділянку, що вносить найбільший вклад у зв'язування з антигеном. CDR- і FR-ділянки визначають за допомогою стандартної номенклатури Кебота (Kabat і ін., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-вид., вид-в Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)).

«Константні області (домени)» важкого ланцюга й легкого ланцюга не приймають особистої участі у зв'язуванні антитіла з антигеном, але мають різні ефекторні функції. Залежно від амінокислотної послідовності константної області їхніх важких ланцюгів антитіла або імунoglobulinи підрозділяють на зазначені вище класи.

Поняття «двовалентне біспецифічне антитіло» у контексті даного опису відноситься до антитіла, як воно описано вище, у якому кожна з двох пар, що включає важкий ланцюг і легкий ланцюг (HC/LC), специфічно зв'язується з різним антигеном, тобто перший важкий і перший легкий ланцюг (отримані з антитіла до першого антигену) специфічно зв'язуються обидва з першим антигеном, а другий важкий і другий легкий ланцюг (отримані з антитіла до другого антигену) специфічно зв'язуються обидва з другим антигеном (як показано на фіг. 2); зазначені двовалентні біспецифічні антитіла мають здатність специфічно зв'язуватися одночасно з двома різними антигенами й не більше, ніж із двома антигенами, у відмінність, по-перше, від моноспецифічного антитіла, що має здатність зв'язуватися тільки з одним антигеном, і, по-друге, від чотиривалентного тетраспецифічного антитіла, що має здатність зв'язуватися одночасно з чотирьома молекулами антигенів.

Відповідно до винаходу співвідношення між необхідним двовалентним біспецифічним антитілом і небажаними побічними продуктами можна поліпшувати шляхом заміни деяких доменів тільки в одній парі, що включає важкий ланцюг і легкий ланцюг (HC/LC). Хоча перша з двох HC/LC-пара, отримана з антитіла, яке специфічно зв'язується з першим антигеном, залишається практично не зміненою, другу з двох HC/LC-пар, отриману з антитіла, яке специфічно зв'язується з другим антигеном, змінюють за допомогою наступної заміни:

легкий ланцюг: заміна CL-домена константної області легкого ланцюга на CH1-домен константної області важкого ланцюга зазначеного антитіла, яке специфічно зв'язується з другим антигеном, і

важкий ланцюг: заміна CH1-домена константної області важкого ланцюга на CL-домен константної області легкого ланцюга антитіла, яке специфічно зв'язується з другим антигеном.

Таким чином, двовалентні біспецифічні антитіла, що утворилися, являють собою штучні антитіла, які містять

а) легкий ланцюг і важкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з першим антигеном; і

б) легкий ланцюг і важкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з другим антигеном, де зазначений легкий ланцюг (антитіла, яке специфічно зв'язується з другим антигеном) містить константний домен CH1 замість CL, і

де зазначений важкий ланцюг (антитіла, яке специфічно зв'язується з другим антигеном) містить константний домен CL замість CH1.

Згідно ще одному об'єкту винаходу зазначене поліпшене співвідношення між необхідним двовалентним біспецифічним антитілом і небажаними побічними продуктами можна додатково поліпшувати за допомогою одного із зазначених нижче двох альтернативних підходів:

А) Перший альтернативний підхід (див. фіг. 3):

CH3-домени зазначеного двовалентного біспецифічного антитіла, запропонованого у винаході, можна змінювати за допомогою технології «knob-into-holes», що описана докладно на декількох прикладах, наприклад, у WO 96/027011, Ridgway J.B. і ін., Protein Eng 9, 1996, сс. 617-621; і у Merchant A.M. і ін., Nat Biotechnol 16, 1998, сс. 677-681. При використанні цього методу взаємодіючі поверхні двох CH3-домнів змінюють з метою підвищення гетеродимеризації обох важких ланцюгів, що містять ці два CH3-домени. Кожний з двох CH3-домнів (двох важких ланцюгів) може являти собою «виступ», а інший являти собою «западину». Введення дисульфідного містка стабілізує гетеродимери (Merchant A.M. і ін., Nature Biotech 16, 1998, сс. 677-681; Atwell S., Ridgway J.B., Wells J.A., Carter P., J Mol Biol 270, 1997, сс. 26-35) і підвищує вихід продукту.

Таким чином, відповідно до кращого варіанта здійснення винаходу CH3-домени двовалентного біспецифічного антитіла, у якому перший CH3-домен і другий CH3-домен кожен стикається один з одним на поверхні розділу, що являє собою вихідну поверхню розділу між CH3-доменами антитіла, змінюють за допомогою технології «knob-into-holes», включаючи додаткову стабілізацію шляхом інтродукції дисульфідного містка у CH3-домени (як описано у WO 96/027011, Ridgway J.B. і ін., Protein Eng 9, 1996, сс. 617-621; Merchant A.M. і ін., Nature Biotech 16, 1998, сс. 677-681; і Atwell S., Ridgway J.B., Wells J.A., Carter P., J Mol Biol 270, 1997, сс. 26-35) для активації формування двовалентного біспецифічного антитіла.

Таким чином, відповідно до одного з об'єктів винаходу двовалентне біспецифічне антитіло відрізняється тим, що

CH3-домен одного важкого ланцюга й CH3-домен іншого важкого ланцюга кожен стикається один з одним на поверхні розділу, що являє собою вихідну поверхню розділу між CH3-доменами антитіла;

при цьому поверхню розділу змінюють для активації формування двовалентного біспецифічного антитіла, де зміна відрізняється тим, що:

а) змінюють CH3-домен одного важкого ланцюга

так, що на вихідній поверхні розділу CH3-домена одного важкого ланцюга, що стикається з вихідною поверхню розділу CH3-домена другого важкого ланцюга у двовалентному біспецифічному антитілі, амінокислотний залишок заміняють на амінокислотний залишок, що має більший за обсягом бічний ланцюг, створюючи тим самим опуклість на поверхні розділу CH3-домена одного важкого ланцюга, що може поміститися у порожнину на поверхні розділу CH3-домена іншого важкого ланцюга,

і б) змінюють CH3-домен іншого важкого ланцюга

так, що на вихідній поверхні розділу другого CH3-домена, що стикається з вихідною поверхню розділу першого CH3-домена у двовалентному біспецифічному антитілі, амінокислотний залишок заміняють на амінокислотний залишок, що має менший за обсягом бічний ланцюг, створюючи тим самим порожнину на поверхні розділу другого CH3-домена, в яку може поміститися опуклість на поверхні розділу першого CH3-домена.

Переважно зазначений амінокислотний залишок, що має більший за обсягом бічний ланцюг, вибирають з групи, що включає аргінін (R), фенілаланін (F), тирозин (Y), триптофан (W).

Переважно зазначений амінокислотний залишок, що має менший за обсягом бічний ланцюг,

вибирають з групи, що включає аланін (A), серин (S), треонін (T), валін (V).

Відповідно до одного з об'єктів винаходу обидва СНЗ-домена додатково змінюють шляхом інтродукції цистеїну (C) як амінокислота у відповідних положеннях кожного СНЗ-домена так, щоб міг утворитися дисульфідний місток між обома СНЗ-доменами.

В іншому кращому варіанті здійснення винаходу обидва СНЗ-домена змінюють, використовуючи залишки R409D; K370E (K409D) в якості утворюючих «виступ» залишків і D399K; E357K в якості утворюючих «западину» залишків, як описано, наприклад, в EP 1870459A1.

Або

Б) Другий альтернативний підхід (див. фіг. 4):

Цей підхід передбачає заміну СНЗ-домена константної області одного важкого ланцюга на СН1-домен константної області важкого ланцюга; і заміну СНЗ-домена константної області іншого важкого ланцюга на CL-домен константної області легкого ланцюга.

СН1-домен константної області важкого ланцюга, на який заміняють СНЗ-домен важкого ланцюга, може являти собою домен будь-якого Ig-класу (наприклад, IgA, IgD, IgE, IgG і IgM) або підкласу (наприклад, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 і IgA2).

CL-домен константної області легкого ланцюга, на який заміняють СНЗ-домен важкого ланцюга, може бути лямбда-(λ) або каппа-(κ) типу, переважно каппа-(κ) типу.

Таким чином, одним із кращих варіантів здійснення винаходу є двовалентне біспецифічне антитіло, що містить:

а) легкий ланцюг і важкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з першим антигеном;

і б) легкий ланцюг і важкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з другим антигеном, у якому константні домени CL і СН1 замінені один на одного,

і необов'язково

в) СНЗ-домен одного важкого ланцюга й СНЗ-домен іншого важкого ланцюга, кожний з яких стикається один з одним на поверхні розділу, що являє собою вихідну поверхню розділу між СНЗ-доменами антитіла;

при цьому поверхню розділу змінюють для активації формування двовалентного біспецифічного антитіла, де зміна відрізняється тим, що:

ва) змінюють СНЗ-домен одного важкого ланцюга

так, що на вихідній поверхні розділу СНЗ-домена одного важкого ланцюга, що стикається з вихідною поверхнею розділу СНЗ-домена другого важкого ланцюга у двовалентному біспецифічному антитілі, амінокислотний залишок заміняють на амінокислотний залишок, що має більший за обсягом бічний ланцюг, створюючи тим самим опуклість на поверхні розділу СНЗ-домена одного важкого ланцюга, що може поміститися у порожнину на поверхні розділу СНЗ-домена іншого важкого ланцюга,

і

вб) змінюють СНЗ-домен іншого важкого ланцюга

так, що на вихідній поверхні розділу другого СНЗ-домена, що стикається з вихідною поверхнею розділу першого СНЗ-домена у двовалентному біспецифічному антитілі, амінокислотний залишок заміняють на амінокислотний залишок, що має менший за обсягом бічний ланцюг, створюючи тим самим порожнину на поверхні розділу другого СНЗ-домена, в яку може поміститися опуклість на поверхні розділу першого СНЗ-домена;

або

г) СНЗ-домен константної області одного важкого ланцюга заміняють на СН1-домен константної області важкого ланцюга; і СНЗ-домен константної області іншого важкого ланцюга заміняють на CL-домен константної області легкого ланцюга.

Поняття «антиген» або «молекула антигену» у контексті даного опису застосовують взаємозамінно, і вони відносяться до всіх молекул, які можуть специфічно зв'язуватися антитілом. Двовалентне біспецифічне антитіло специфічно зв'язується з першим антигеном і другим відмінним від першого антигеном. Поняття «антигени» у контексті даного опису включають, наприклад, білки, різні епітопи білків (як різні антигени відповідно до винаходу) і полісахариди. Вони головним чином включають частини (покриття, капсули, клітинні оболонки, джгутики, фімбрії й токсини) бактерій, вірусів і інших мікроорганізмів. Ліпіди й нуклеїнові кислоти є антигенами тільки при їхньому об'єднанні з білками й полісахаридами. Не стосовні до мікробів екзогенні (чужорідні) антигени можуть включати пилок, білок яєць і білки із трансплантованих тканин або органів або антигени, що перебувають на поверхні трансфузуюмих кров'яних клітин. Переважно антиген вибирають з групи, що включає цитокіни, білки клітинної поверхні, ферменти й рецептори цитокінів, білків клітинної поверхні, ферментів і інші рецептори.

Пухлинні антигени являють собою антигени, які презентуються молекулами ГКГ I або ГКГ II на поверхні пухлинних клітин. Іноді ці антигени презентуються пухлинними клітинами й ніколи здоровими клітинами. У цьому випадку їх називають специфічними для пухлини антигенами (TSA), і вони, як правило, є результатом специфічної для пухлини мутації. Більше розповсюдженими є антигени, які презентуються пухлинними клітинами й здоровими клітинами, і їх називають асоційованими з пухлиною антигенами (TAA). Цитотоксичні Т-лімфоцити, які розпізнають ці антигени, можуть мати здатність руйнувати пухлинні клітини до їхньої проліферації або метастазування. Пухлинні антигени можуть перебувати також на поверхні пухлини у формі, зміненого у результаті мутації рецептора, у цьому випадку вони повинні розпізнаватися В-клітинами.

В одному з кращих варіантів здійснення винаходу щонайменше один із двох різних антигенів (перший і другий антиген), з яким двовалентне біспецифічне антитіло специфічно зв'язується, являє собою пухлинний антиген.

В іншому кращому варіанті здійснення винаходу обидва різних антигени (перший і другий антиген), з якими двовалентне біспецифічне антитіло специфічно зв'язується, являють собою пухлинні антигени; у цьому випадку перший і другий антиген можуть являти собою також два різних епітопа одного й того самого специфічного для пухлини білка.

В іншому кращому варіанті здійснення винаходу щонайменше один із двох різних антигенів (перший і другий антиген), з яким двовалентне біспецифічне антитіло специфічно зв'язується, являє собою пухлинний антиген, а інший являє собою антиген ефektorної клітини, такий, наприклад, як Т-клітинний рецептор, CD3, CD16 тощо.

В іншому кращому варіанті здійснення винаходу щонайменше один із двох різних антигенів (перший і другий антиген), з яким двовалентне біспецифічне антитіло специфічно зв'язується, являє собою пухлинний антиген, а інший являє собою протиракову субстанцію, таку як токсин або інгібітор кінази.

У контексті даного опису поняття «специфічно зв'язується» або «зв'язується специфічно з» відноситься до антитіла, яке специфічно зв'язується з антигеном. Переважно афінність до зв'язування антитіла, яке специфічно зв'язується з зазначеним антигеном, характеризується значенням $KD\ 10^{-9}$ молей/л або нижче (наприклад, 10^{-10} молей/л), переважно значенням $KD\ 10^{-10}$ молей/л або нижче (наприклад, 10^{-12} молей/л). Афінність до зв'язування визначають за допомогою стандартного аналізу зв'язування, такого як поверхневий плазмонний резонанс (Biacore®).

Поняття «епітоп» включає будь-яку поліпептидну детермінанту, що має здатність специфічно зв'язуватися з антитілом. У деяких варіантах здійснення винаходу епітопна детермінанта включає хімічно активні поверхневі групи молекул, такі як амінокислоти, бічні ланцюги цукрів, фосфорил або сульфоніл, і у деяких варіантах здійснення винаходу можуть мати специфічні тривимірні структурні характеристики й/або специфічні характеристики заряду. Епітоп являє собою область антигену, що зв'язується з антитілом. У деяких варіантах здійснення винаходу вважається, що антитіло специфічно зв'язується з антигеном, коли воно переважно розпізнає його антиген-мішень у складній суміші білків і/або макромолекул.

Ще одним варіантом здійснення винаходу є спосіб одержання двовалентного біспецифічного антитіла, запропонованого у винаході,

який полягає у тому, що

а) трансформують клітину-хазяїна

- векторами, які містять молекули нуклеїнових кислот, що кодують легкий ланцюг і важкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з першим антигеном,

- векторами, які містять молекули нуклеїнових кислот, що кодують легкий ланцюг і важкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з другим антигеном, у якому CL- і CH1-домени константних областей замінені один на одного;

б) культивують клітину-хазяїна в умовах, які дозволяють синтезувати зазначену молекулу антитіла; і

в) виділяють молекулу антитіла з культури.

У цілому, застосовують два вектори, що кодують легкий ланцюг і важкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з першим антигеном, і ще два вектори, що кодують легкий ланцюг і важкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з другим антигеном. Один із двох векторів кодує відповідний легкий ланцюг, а інший з двох векторів кодує відповідний важкий ланцюг. Однак в альтернативному варіанті способу одержання двовалентного біспецифічного антитіла, запропонованого у винаході, можна застосовувати для трансформації клітини-хазяїна тільки один перший вектор, що кодує легкий ланцюг і важкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з першим антигеном, і тільки один другий вектор, що кодує легкий ланцюг і важкий

ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з другим антигеном.

Винахід відноситься також до способу одержання антитіл, який полягає у тому, що культивують відповідні клітини-хазяїни в умовах, які дозволяють синтезувати молекули антитіл, і виділяють антитіла з культури, наприклад, що передбачає експресію

- 5 - першої нуклеотидної послідовності, що кодує легкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з першим антигеном,
- другої нуклеотидної послідовності, що кодує важкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з першим антигеном,
- третьої нуклеотидної послідовності, що кодує легкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з другим антигеном, у якому CL-домен константної області легкого ланцюга замінений на CH1-домен константної області важкого ланцюга, і
- 10 - четвертої нуклеотидної послідовності, що кодує важкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з другим антигеном, у якому CH1-домен константної області важкого ланцюга замінений на CL-домен константної області легкого ланцюга.

15 Ще одним варіантом здійснення винаходу є клітина-хазяїн, що містить

- вектори, які містять молекули нуклеїнових кислот, що кодують легкий ланцюг і важкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з першим антигеном,
- вектори, які містять молекули нуклеїнових кислот, що кодують легкий ланцюг і важкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з другим антигеном, у якому CL- і CH1-домени константних областей замінені один на одного.

20 Ще одним варіантом здійснення винаходу є клітина-хазяїн, що містить

а) вектор, що містить молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує легкий ланцюг, і вектор, що містить молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує важкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з першим антигеном,

25 б) вектор, що містить молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує легкий ланцюг, і вектор, що містить молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує важкий ланцюг, антитіла, яке специфічно зв'язується з другим антигеном, у якому CL- і CH1-домени константних областей замінені один на одного.

30 Ще одним варіантом здійснення винаходу є композиція, переважно фармацевтична або діагностична композиція двовалентного біспецифічного антитіла, запропонованого у винаході.

Ще одним варіантом здійснення винаходу є фармацевтична композиція, що містить двовалентне біспецифічне антитіло, запропоноване у винаході, і щонайменше один фармацевтично прийнятний ексципієнт.

35 Ще одним варіантом здійснення винаходу є спосіб лікування пацієнта, що має потребу у терапії, який відрізняється тим, що вводять пацієнтові у терапевтично ефективній кількості двовалентне біспецифічне антитіло, запропоноване у винаході.

Поняття «нуклеїнова кислота або молекула нуклеїнової кислоти» у контексті даного опису відноситься до молекул ДНК і молекул РНК. Молекула нуклеїнової кислоти може бути одностанцюговою або двостанцюговою, але переважно являє собою двостанцюгову ДНК.

40 У контексті даного опису поняття «клітина», «клітинна лінія» і «клітинна культура» використовуються взаємозамінно, і всі такі визначення включають потомство. Так, поняття «трансформанти» і «трансформовані клітини» відносяться до первинної розглянутої клітини й отриманим з неї культурам безвідносно до кількості переносів. Варто розуміти також, що все потомство може не бути повністю ідентичним за складом ДНК через навмисні або випадкові мутації. Під обсяг винаходу підпадає варіант потомства, що має таку ж функцію або біологічну активність, яка виявлена у вихідній трансформованій клітині. Якщо використовуються інші визначення, то це буде очевидно з контексту.

Поняття «трансформація» у контексті даного опису відноситься до процесу переносу вектора/нуклеїнової кислоти у клітину-хазяїна. Якщо як клітини-хазяїни застосовують клітини без важкоподоланих бар'єрів клітинних оболонок, то трансфекцію здійснюють, наприклад, за допомогою методу осадження фосфатом кальцію, що описаний у Graham і Van der Eh, Virology 52, 1978, сс. 546 і далі. Однак можна застосовувати також інші методи інтродукції ДНК у клітини, такі як ін'єкція ядер або злиття протопластів. Якщо застосовують прокаріотичні клітини або клітини, які містять виражені конструкції клітинних оболонок, можна застосовувати, наприклад, 50 метод трансфекції, заснованої на обробці кальцієм, з використанням хлориду кальцію, що описаний у Cohen F. N, і ін., PNAS. 69, 1972, сс. 7110 і далі.

60 Рекомбінантне одержання антитіл за допомогою трансформації добре відомо у даній області й описано, наприклад, в оглядових статтях Makrides S.C., Protein Expr. Purif. 17, 1999, сс. 183-202; Geisse S. і ін., Protein Expr. Purif. 8, 1996, сс. 271-282; Kaufman R.J., Mol. Biotechnol. 16, 2000, сс. 151-161; Werner R.G. і ін., Arzneimittelforschung 48, 1998, сс. 870-880, а також в US

6331415 і US 4816567.

У контексті даного опису поняття «експресія» відноситься до процесу, при якому нуклеїнова кислота транскрибується у мРНК, і/або до процесу, при якому транскрибуєма мРНК (яку позначають також як транскрипт) потім може транслюватися у пептиди, поліпептиди або білки. І транскрипти, і кодуємі поліпептиди позначають у цілому як генний продукт. Якщо полінуклеотид виводять з геномної ДНК, то експресія в еукаріотичній клітині може включати сплайсинг мРНК.

«Вектор» являє собою молекулу нуклеїнової кислоти, зокрема самореplikаційну, що переносить вбудовану молекулу нуклеїнової кислоти у клітини-хазяїни й/або між клітинами-хазяїнами. Поняття включає вектори, функція яких складається, насамперед, у вбудовуванні ДНК або РНК у клітину (наприклад, хромосомна інтеграція), у реплікаційні вектори, функція яких насамперед складається у реплікації ДНК або РНК, і в експресійні вектори, функція яких насамперед складається у транскрипції й/або трансляції ДНК або РНК. Під поняття підпадають також вектори, які мають декілька зазначених функцій.

«Експресійний вектор» являє собою полінуклеотид, що при інтродукції у відповідну клітину-хазяїна може транскрибуватися й транслюватися у поліпептид. Поняття «експресійна система», як правило, відноситься до прийнятої клітини-хазяїна, що містить експресійний вектор, функцією якої може бути вихід необхідного продукту експресії.

Двовалентні біспецифічні антитіла, запропоновані у винаході, переважно одержують методами рекомбінації. Зазначені методи добре відомі у даній області й передбачають експресію білка у прокаріотичних і еукаріотичних клітинах з наступним виділенням поліпептиду антитіла й, як правило, очищенням до фармацевтично прийнятої чистоти. Для експресії білка нуклеїнові кислоти, що кодують легкі й важкі ланцюги або їхні фрагменти, вбудовують в експресійні вектори за допомогою стандартних методів. Експресію здійснюють у прийнятних прокаріотичних або еукаріотичних клітинах-хазяїнах типу CHO-клітин, NS0-клітин, SP2/0-клітин, HEK293-клітин, COS-клітин, дріжджів або клітин *E.coli*, і антитіло виділяють з клітин (з супернатанта або клітин після лізису). Двовалентні біспецифічні антитіла можуть бути присутніми у цілих клітинах, у клітинному лізаті або у частково очищеній або практично очищеній формі. Очищення здійснюють для видалення інших клітинних компонентів або інших забруднювачів, наприклад, інших клітинних нуклеїнових кислот або білків, стандартними методами, які включають обробку лугом/ДСН, хроматографію на колонках і інші методи, добре відомі у даній області (див. у *Current Protocols in Molecular Biology*, під ред. Ausubel F., і ін., вид-в Greene Publishing and Wiley Interscience, New York, 1987).

Експресія у NS0-клітинах описана, наприклад, у Barnes L.M. і ін., *Cytotechnology* 32, 2000, сс. 109-123; і Barnes L.M. і ін., *Biotech. Bioeng.* 73, 2001, сс. 261-270. Короткочасна експресія описана, наприклад, у Durocher Y. і ін., *Nucl. Acids. Res.* 30, 2002, с. E9. Клонування варіабельних областей описане в Orlandi R. і ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1989, сс. 3833-3837; Carter P. і ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1992, сс. 4285-4289; і Norderhaug L. і ін., *J. Immunol. Methods* 204, 1997, сс. 77-87. Краща система короткочасної експресії (HEK293) описана у Schlaeger E.-J. і Christensen K., у *Cytotechnology* 30, 1999, сс. 71-83 і у Schlaeger E.-J. в *J. Immunol. Methods* 194, 1996, сс. 191-199.

Контролюючі послідовності, які можна застосовувати для прокаріот, являють собою, наприклад, промотор, необов'язково послідовність оператора й сайт зв'язування рибосом. Відомо, що еукаріотичні клітини можуть використовувати промотори, енхансери й сигнали поліаденілювання.

Нуклеїнова кислота «функціонально зв'язана», коли вона поміщена під функціональний контроль іншої нуклеотидної послідовності. Наприклад, ДНК передпослідовності або лідера секреції функціонально пов'язана з ДНК, що кодує поліпептид, якщо вона експресується у вигляді передбілка, що бере участь у секреції поліпептиду; промотор або енхансер функціонально пов'язаний з послідовністю, що кодує, якщо він впливає на транскрипцію послідовності; або сайт зв'язування рибосом функціонально пов'язаний з послідовністю, що кодує, якщо він поміщений так, щоб він полегшував трансляцію. Як правило, «функціонально зв'язані» означає, що послідовності ДНК, будучи зв'язані, є суміжними, а у випадку лідера секреції, суміжними у рамці читування. Однак не потрібно, щоб енхансери були суміжними. Зв'язування здійснюють шляхом лігування у придатних сайтах рестрикції. Якщо такі сайти не існують, то відповідно до загальноприйнятої практики використовують синтетичні олігонуклеотидні адаптори або лінкери.

Двовалентні біспецифічні антитіла можна відокремлювати від культурального середовища за допомогою загальноприйнятих методів очистки імуноглобулінів, таких, наприклад, як хроматографія на протеїн А-сефарозі, хроматографія на гідроксилапатиті, гель-електрофорез, діаліз або афінна хроматографія. ДНК або РНК, які кодують моноклональні антитіла, легко

виділяти й секвенувати за допомогою загальноприйнятих методів. Джерелом таких ДНК і РНК можуть служити клітини гібридом. Після виділення ДНК можна вбудовувати в експресійні вектори, якими потім трансфектують клітини-хазяїни, такі як клітини HEK293, CHO-клітини або клітини міеломи, які інакше не можуть продукувати білок імуноглобуліну, для синтезу

рекомбінантних моноклональних антитіл у клітинах-хазяїнах.

Варіанти амінокислотної послідовності (або мутанти) двовалентного біспецифічного антитіла одержують шляхом інтродукції відповідних нуклеотидних замін у ДНК антитіла або шляхом синтезу нуклеотидів. Однак такі модифікації можна здійснювати тільки у дуже обмеженому діапазоні, наприклад, як описано вище. Наприклад, модифікації не повинні змінювати вищевказані характеристики антитіла, такі як ізотип IgG і зв'язування з антигеном, але можуть підвищувати вихід продукту рекомбінації, стабільність білка або полегшувати очищення.

Наступні приклади, перелік послідовностей і креслення дані з метою кращого розуміння даного винаходу, повний обсяг якого представлений у наведеній нижче формулі винаходу. Очевидно, що можуть бути зроблені модифікації у викладених процедурах без відхилення від суті винаходу.

Перелік послідовностей

SEQ ID NO: 1 амінокислотна послідовність важкого ланцюга антитіла <IGF-1R> дикого типу.

SEQ ID NO: 2 амінокислотна послідовність легкого ланцюга антитіла <IGF-1R> дикого типу.

SEQ ID NO: 3 амінокислотна послідовність важкого ланцюга ** (HC**) антитіла <IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1, в якому CH1-домен важкого ланцюга замінений на CL-домен легкого ланцюга.

SEQ ID NO: 4 амінокислотна послідовність легкого ланцюга ** (LC**) антитіла <IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1, в якому CL-домен легкого ланцюга замінений на CH1-домен важкого ланцюга.

SEQ ID NO: 5 амінокислотна послідовність ектодомена (ECD) IGF-1R, що несе мітку, яка являє собою His-стрептавідин-єднальний пептид (ECD IGF-1R-His-SBP).

SEQ ID NO: 6 амінокислотна послідовність важкого ланцюга антитіла до ANGPT2 (ангіопоетин-2) <ANGPT2> дикого типу.

SEQ ID NO: 7 амінокислотна послідовність легкого ланцюга антитіла до ANGPT2 <ANGPT2> дикого типу.

SEQ ID NO: 8 амінокислотна послідовність CH3-домени («виступи») із заміною T366W для застосування у технології «knobs-into-holes».

SEQ ID NO: 9 амінокислотна послідовність CH3-домени («западина») із заміною T366S, L368A, Y407V для застосування у технології «knobs-into-holes».

SEQ ID NO: 10 амінокислотна послідовність ектодомена IGF-1R, що несе мітку, яка являє собою His-стрептавідин-єднальний пептид (ECD IGF-1R-His-SBP).

Опис креслень

На кресленнях показано:

на фіг. 1 - схематичне зображення повного антитіла, що зустрічається у природних умовах, типу IgG, специфічного у відношенні одного антигену, з двома парами важких і легких ланцюгів, кожна з яких містить розташовані у загальноприйнятому порядку варіабельні й константні домени;

на фіг. 2 - схематичне зображення двовалентного біспецифічного антитіла, що містить: а) легкий ланцюг і важкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з першим антигеном; і б) легкий ланцюг і важкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з другим антигеном, у якому CL- і CH1-домени константних областей замінені один на одного;

на фіг. 3 - схематичне зображення двовалентного біспецифічного антитіла, що містить: а) легкий ланцюг і важкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з першим антигеном; і б) легкий ланцюг і важкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з другим антигеном, у якому CL- і CH1-домени константних областей замінені один на одного й у якому CH3-домени обох важких ланцюгів змінені за допомогою технології «knobs-into-holes»;

на фіг. 4 - схематичне зображення двовалентного біспецифічного антитіла, що містить: а) легкий ланцюг і важкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з першим антигеном; і б) легкий ланцюг і важкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з другим антигеном, у якому CL- і CH1-домени константних областей замінені один на одного й у якому один з CH3-доменив константної області обох важких ланцюгів замінений на CH1-домен константної області важкого ланцюга; а інший CH3-домен константної області важкого ланцюга замінений на CL-домен константної області легкого ланцюга;

на фіг. 5 - схематичне зображення білкової послідовності важкого ланцюга ** <IGF-1R> HC** антитіла <IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1 (з CL-доменом константної області легкого каппа-ланцюга);

на фіг. 6 - схематичне зображення білкової послідовності легкого ланцюга ** <IGF-1R> LC** антитіла <IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1;

на фіг. 7 - плазмідна карта експресійного вектора pUC-HC**-IGF-1R важкого ланцюга ** <IGF-1R> HC**;

на фіг. 8 - плазмідна карта експресійного вектора pUC-LC**-IGF-1R легкого ланцюга ** <IGF-1R> LC**;

на фіг. 9 - плазмідна карта експресійного вектора 4700-Hyg-OriP;

на фіг. 10 - принцип здійснення клітинного FACS-аналізу, що дозволяє виявляти утворення мостикового зв'язку типу IGF-1R-ANGPT2 з використанням клітин лінії I24, що експресують IGF-1R, з метою виявлення присутності функціонального біспецифічного антитіла <ANGPT2-IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1;

на фіг. 11 - схематичне зображення принципу здійснення Віасоге-аналізу з використанням ECD IGF-1R;

на фіг. 12 - результати, отримані за допомогою ДСН-ПААГ і гель фільтрації, для очищеного моноспецифічного двовалентного антитіла <IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1 (IgG1**), у якого HC** і LC** виділені з супернатантів клітинних культур після короточасної трансфекції клітин лінії HEK293-F;

на фіг. 13 - дані про зв'язування моноспецифічного антитіла <IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1, і антитіла дикого типу <IGF-1R> з ECD IGF-1R, отримані на основі оцінки зв'язування за допомогою ELISA;

на фіг. 14 - результати, отримані за допомогою ДСН-ПААГ і гель-фільтрації, для суміші, що містить антитіло <ANGPT2-IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1, очищеної з супернатантів клітинних культур після короточасної трансфекції клітин лінії HEK293-F;

на фіг. 15 - результати, отримані для зразків А-Е, за допомогою FACS-аналізу, що дозволяє виявляти утворення мостикового зв'язку типу IGF-1R-ANGPT2 з використанням клітин лінії I24, що експресують IGF-1R, з метою виявлення присутності функціонального біспецифічного антитіла <ANGPT2-IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1, в очищеній суміші антитіл: очищені білки зразків А-Е:

А = клітини лінії I24, неопрацьовані,

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

В = I24 + 2 мкг/мл hANGPT2 + суміш, отримана у результаті спільної експресії антитіла <IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1, і антитіла <ANGPT2> дикого типу, що містить біспецифічне антитіло <ANGPT2-IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1,

Г - відсутній,

Д = I24 + 2 мкг/мл hANGPT2 + антитіло <ANGPT2> дикого типу,

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

Приклади

Матеріали й загальні методи

Загальна інформація, що стосується нуклеотидних послідовностей легких і важких ланцюгів людського імуноглобуліну, представлена у: Kabat E.A. і ін., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е вид., вид-в Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991. Амінокислоти ланцюгів антитіл пронумеровані відповідно до нумерації EU (Edelman G.M. і ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63, 1969, сс. 78-85; Kabat E.A. і ін., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е вид., вид-в Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991).

Методи рекомбінантної ДНК

Для маніпуляцій з ДНК використовували стандартні методи, описані у Sambrook J. і ін., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Реагенти для молекулярної біології використовували відповідно до інструкцій виробників.

Синтез генів

Необхідні сегменти генів одержували з олігонуклеотидів, створених шляхом хімічного синтезу. Генні сегменти довжиною 600 - 1800 т.п.н., які фланковані унікальними сайтами рестрикції, збирали шляхом відпалу й лігування олігонуклеотидів, включаючи ПЛР-ампліфікацію й наступне клонування через зазначені сайти рестрикції, наприклад, KpnI/ SacI або AscI/PacI у клонуючому векторі pGA4, основою якого є плазміда pPCRScript (фірма Stratagene).

Послідовності ДНК субклонуваних генних фрагментів підтверджували шляхом секвенування

ДНК. Синтез генних фрагментів здійснювали у порядку, представленому у специфікації фірми Geneart (Регенсбург, Німеччина).

Визначення послідовностей ДНК

Послідовності ДНК визначали шляхом секвенування двох ланцюгів на фірмі MediGenomix GmbH (Мартинсрид, Німеччина) або фірмі Sequiserve GmbH (Фатерштеттен, Німеччина).

Аналіз послідовностей ДНК і білків і обробка даних про послідовності

Застосовували пакет програм фірми GCG (Genetics Computer Group, Медисон, шт. Вісконсин), версія 10.2 і Infomax's Vector NT1 Advance suite, версія 8.0 для створення, картування, аналізу, анотування й ілюстрації послідовностей.

Експресійні вектори

Для експресії описаних антитіл застосовували варіанти експресійних плазмід, призначених для короткочасної експресії (наприклад, у клітинах HEK293 EBNA або HEK293-F), або на основі кДНК-конструкції з використанням промотору CMV-інтрона А, або на основі геномної конструкції з використанням промотору CMV.

Крім касети експресії антитіла вектори містили:

- сайт ініціації реплікації, що забезпечує реплікацію зазначеної плазмиди в *E. coli*, і
- ген β -лактамази, що надає стійкість в *E. coli* до ампіциліну.

Транскрипційна одиниця гена антитіла складалася з наступних елементів:

- унікальний(і) сайт(и) рестрикції на 5'-кінці,
- негайно-ранній енхансер і промотор з людського цитомегаловірусу,
- розташована за ним послідовність інтрону А у випадку експресії на основі кДНК-конструкції,
- 5'-нетрансльована область гена людського антитіла,
- сигнальна послідовність важкого ланцюга імуноглобуліну,
- ланцюг людського антитіла (дикого типу або із заміною доменів) або у вигляді кДНК-конструкції, або у вигляді геномної конструкції з екзон-інтронною конструкцією імуноглобуліну,
- 3'-нетрансльована область з сигнальною послідовністю поліаденілювання й
- унікальний(і) сайт(и) рестрикції на 3'-кінці.

Злиття генів, що містять описані ланцюги антитіла, як зазначено нижче, здійснювали за допомогою ПЛР і/або синтезу й складання генів з використанням відомих методів і процедур рекомбінації шляхом з'єднання відповідних сегментів нуклеїнових кислот, наприклад, з використанням унікальних сайтів рестрикції у відповідних векторах. Субклоновані нуклеотидні послідовності підтверджували секвенуванням ДНК. Для короткочасних трансфекцій створювали великі кількості плазмід за допомогою одержання плазмід із трансформованих культур *E. coli* (набір Nucleobond AX, фірма Macherey-Nagel).

Методики культивування клітин

Застосовували стандартні методики культивування клітин, описані у Current Protocols in Cell Biology, під ред. Bonifacino J.S., Dasso M., Harford J.B., Lippincott-Schwartz J. і Yamada K.M., вид-в John Wiley & Sons, Inc., 2000.

Біспецифічні антитіла експресували шляхом короткочасної котрансфекції відповідними експресійними плазмідами вирощених у вигляді прикріплених культур клітин HEK293-EBNA або вирощених у вигляді суспензійних культур клітин HEK293-F, як буде описано нижче.

Короткочасні трансфекції у системі HEK293-EBNA

Біспецифічні антитіла експресували шляхом короткочасної котрансфекції відповідними експресійними плазмідами (наприклад, що кодують важкий ланцюг і модифікований важкий ланцюг, а також відповідний легкий ланцюг і модифікований легкий ланцюг) вирощених у вигляді прикріплених культур клітин HEK293-EBNA (лінія клітин нирки людського ембріона 293, що експресує ядерний антиген вірусу Епштейна-Барра; Американська колекція типових культур, депонована під номером ATCC № CRL-10852, партія 959 218), які культивували у середовищі DMEM (модифікована по методу Дульбекко середовище Голка, фірма Gibco), доповненої 10% FCS (фетальна теляча сироватка, фірма Gibco) з ультра низьким вмістом IgG (Ultra Low IgG FCS), 2мМ L-глутаміном (фірма Gibco) і 250 мкг/мл генетицину (фірма Gibco). Для трансфекції застосовували реагент для трансфекції типу FuGENE™ 6 (фірма Roche Molecular Biochemicals), використовуючи співвідношення реагенту FuGENE™ (мкл) і ДНК (мкг) 4:1 (діапазон від 3:1 до 6:1). Білки експресували, застосовуючи відповідні плазмиди, з використанням молярного співвідношення плазмід, що кодують (модифікованого й дикого типу) легкий ланцюг і важкий ланцюг, 1:1 (еквімолярне співвідношення), у діапазоні від 1:2 до 2:1 відповідно. Клітини підживлювали у день 3 L-глутаміном до концентрації 4мМ, глюкозою (фірма Sigma) і NAA (амід нікотинової кислоти) (фірма Gibco). Збирали супернатанти клітинних культур, що містять біспецифічне антитіло, у дні з 5 по 11 після трансфекції шляхом центрифугування й зберігали при -20°C. Загальну інформацію, що стосується рекомбінантної експресії людських

імуноглобулінів, наприклад, у HEK293-клітинах, див. у Meissner P. і ін., *Biotechnol. Bioeng.* 75, 2001, сс. 197-203.

Короточасні трансфекції у системі HEK293-F

Біспецифічні антитіла одержували шляхом короточасної трансфекції відповідними плазмідами (наприклад, що кодують важкий ланцюг і модифікований важкий ланцюг, а також відповідний легкий ланцюг і модифікований легкий ланцюг), використовуючи систему HEK293-F (фірма Invitrogen) відповідно до інструкції виробника. У цілому, метод полягав у наступному: HEK 293-F-клітини (фірма Invitrogen), вирощені у вигляді суспензійної культури або у колбі, що струшується, або у ферментері з мішалкою у безсироваточному середовищі для експресії типу FreeStyle 293 (фірма Invitrogen), трансфектували сумішшю чотирьох експресійних плазмід і 293-фектином або фектином (фірма Invitrogen). У 2-літрову колбу (фірма Corning), що струшується, висівали клітини HEK293-F з щільністю $1,0 \times 10^6$ клітин/мл у 600 мл і інкубували при 120 об/хв, 8% CO₂. Через 1 день клітини трансфектували при щільності клітин приблизно $1,5 \times 10^6$ клітин/мл за допомогою приблизно 42 мл суміші А), що містить 20 мл Opti-MEM (фірма Invitrogen) з 600 мкг загальної плазмідної ДНК (1 мкг/мл), що кодує важкий ланцюг або модифікований важкий ланцюг відповідно й відповідний легкий ланцюг, в еквімолярному співвідношенні, і суміші Б), що містить 20 мл Opti-MEM + 1,2 мл 293-фектину або фектину (2 мкг/мл). Залежно від поглинання глюкози у процесі ферментації додавали розчин глюкози. Через 5-10 днів збирали супернатант, що містить секретоване антитіло, і або з супернатанта безпосередньо очищали антитіла, або супернатант заморожували й зберігали.

Визначення білка

Концентрацію білків очищених антитіл і їхніх похідних визначали на основі оптичної щільності (ОЩ) при 280 нм, використовуючи коефіцієнт молярної екстинкції, розрахований на основі амінокислотної послідовності відповідно до методу, що описаний у Pace і ін., *Protein Science*, 1995, 4, сс. 2411-1423.

Визначення концентрації антитіл у супернатантах

Концентрацію антитіл і їхніх похідних у супернатантах клітинних культур визначали шляхом імунопреципітації з білок А-агарозними гранулами (фірма Roche). 60 мкл білок А-агарозних гранул відмивали тричі у TBS-NP40 (50мМ Трис, рН 7,5, 150мМ NaCl, 1% Nonidet-P40). Потім 1 - 15 мл супернатанта клітинної культури наносили на білок А-агарозні гранули, попередньо врівноважені у TBS-NP40. Після інкубації протягом 1 год при кімнатній температурі гранули відмивали на фільтрувальній колонці типу Ultrafree-MC (фірма Amicon), використовуючи однократно 0,5 мл TBS-NP40, двічі 0,5 мл дворазового (2×) забуференого фосфатом фізіологічного розчину (2×3ФР, фірма Roche) і швидко чотири рази 0,5 мл 100мМ Na-цитратним буфером, рН 5,0. Зв'язане антитіло елюювали, додаючи 35 мкл буфера для зразків NuPAGE® LDS (фірма Invitrogen). Половину зразка поєднували з відновлювачем для зразків NuPAGE® або залишали у невідновленій формі відповідно й витримували протягом 10 хв при 70°C. Потім по 5-30 мкл застосовували для здійснення ДСН-ПААГ з використанням 4-12% біс-Трис-гелів NuPAGE® (фірма Invitrogen) (застосовуючи буфер MOPS для здійсненні ДСН-ПААГ в умовах, що не відновлюють, і буфер MES у вигляді рухливого буфера з антиоксидантною добавкою NuPAGE® (фірма Invitrogen) для здійсненні ДСН-ПААГ в умовах, що відновлюють) і офарбовували кумаси брильянтовим блакитним.

Концентрацію антитіл і їхніх похідних у супернатантах клітинних культур оцінювали кількісно за допомогою афінної ЖХВР-хроматографії. У цілому, метод полягав у наступному: супернатанти, що містять антитіла і їхні похідні, які зв'язувалися з білком А, вносили на колонку Applied Biosystems Poros A/20 в 200мМ KH₂PO₄, 100мМ натрій-цитратний буфер, рН 7,4 і елюювали з матриксу за допомогою 200мМ NaCl, 100мМ лимонної кислоти, рН 2,5 з використанням системи Agilent HPLC 1100. Елюований білок оцінювали кількісно за допомогою УФ-абсорбції й інтегрування площ піків. Очищене стандартне антитіло у вигляді IgG1 служило як стандарт.

В альтернативному варіанті концентрацію антитіл і їхніх похідних у супернатантах клітинних культур оцінювали за допомогою «сендвіч»-IgG-ELISA. У цілому, метод полягав у наступному: 96-ямкові титраційні мікропланшети, що мають високу здатність зв'язувати стрептавідин А (планшети типу StreptaWell High Bind Streptavidin A (фірма Roche)), сенсibiliзували з розрахунку 100 мкл/лунку біотинільованим антилюдським IgG F(ab')₂-FcγBI, застосовуваним як іммобілізована молекула (фірма Dianova), у концентрації 0,1 мкг/мл протягом 1 год при кімнатній температурі або в іншому варіанті протягом ночі при 4°C і потім відмивали тричі, використовуючи 200 мкл/лунку 3ФР, 0,05% Твін (3ФР, фірма Sigma). Додавали у лунки по 100 мкл/лунку серійних розведень у 3ФР (фірма Sigma), що містять відповідне антитіло супернатантів клітинних культур, та інкубували протягом 1-2 год на шейкері для титраційних

мікропланшетів при кімнатній температурі. Лунки відмивали тричі, використовуючи 200 мкл/лунку 3ФРТ, і зв'язане антитіло виявляли за допомогою 100 мкл F(ab')₂-hFcγγ>POD (фірма Dianova) у концентрації 0,1 мкг/мл як ідентифікуюче антитіло протягом 1-2 год на шейкері для титраційних мікропланшетів при кімнатній температурі. Незв'язане ідентифікуюче антитіло відмивали тричі, використовуючи 200 мкл/лунку 3ФР, і зв'язане ідентифікуюче антитіло виявляли, додаючи 100 мкл ABTS/лунку. Визначення абсорбції здійснювали на спектрометрі типу Tecan Fluor при довжині хвилі 405 нм (довжина референс хвилі 492 нм).

Очищення білків

Білки очищали із профільтрованих супернатантів клітинних культур відповідно до стандартних протоколів. У цілому, метод полягав у наступному: білки наносили на колонку, заповнену білоком А-сефарозою (фірма GE Healthcare), і відмивали 3ФР. Елюцію антитіл здійснювали при рН 2,8 з наступною негайною нейтралізацією зразка. Агрегований білок відокремлювали від мономерних антитіл гель-фільтрацією (Superdex 200, фірма GE Healthcare) у 3ФР або у 20мМ гістидині, 150мМ NaCl, рН 6,0. Фракції мономерних антитіл поєднували, при необхідності концентрували, використовуючи, наприклад, центрифужний концентратор типу MILLIPORE Amicon Ultra (30 MWCO (молекулярно-вагова межа), заморожували й зберігали при -20°C або -80°C. Частину зразків залишали для наступного аналітичного вивчення білка і його аналітичної характеристики, наприклад, за допомогою ДСН-ПААГ, гель-фільтрації або мас-спектрометрії.

ДСН-ПААГ

Застосовували систему гелю NuPAGE® Pre-Cast (фірма Invitrogen) відповідно до інструкції виробника. Зокрема використовували 10% або 4-12% біс-Трис-гелі NuPAGE®, Novex® (рН 6,4) і рухливі буфери, такі як NuPAGE® MES (гелі, які застосовуються в умовах, що відновлюють, рухливий буфер з антиоксидантною добавкою NuPAGE®) або MOPS (гелі, які застосовуються в умовах, що не відновлюють).

Аналітична гель-фільтрація

Як гель-фільтрація, призначена для визначення агрегованого й олігомерного стану антитіл, застосовували ЖХВР-хроматографію. У цілому, метод полягав у наступному: очищені на білку А антитіла вносили у колонку типу Tosoh TSKgel G3000SW у 300мМ NaCl, 50мМ KH₂PO₄/K₂HPO₄, рН 7,5 у системі Agilent HPLC 1100, або у колонку Superdex 200 (фірма GE Healthcare) у 2×3ФР у ЖХВР-системі Dionex. Кількість елюйованого білка визначали на основі УФ-абсорбції й інтегрування площ піків. Як стандарт застосовували стандарт для гель-фільтрації фірми BioRad (Gel Filtration Standard 151-1901).

Мас-спектрометрія

Загальну деглікозиловану масу антитіл, отриманих у результаті кросинговеру, визначали й підтверджували за допомогою мас-спектрометрії з іонізацією електроспреем (ESI-MC). У цілому, метод полягав у наступному: 100 мкг очищених антитіл деглікозилювали за допомогою 50 мед. N-глікозидази F (PNGаза, фірма ProZyme) у 100мМ KH₂PO₄/K₂HPO₄, рН 7 при 37°C протягом 12-24 год при концентрації білка аж до 2 мг/мл і потім знесолювали за допомогою ЖХВР на колонці Sephadex G25 (фірма GE Healthcare). Масу відповідних важких і легких ланцюгів визначали за допомогою ESI-MC після деглікозилювання й відновлення. У цілому, метод полягав у наступному: 50 мкг антитіла у 115 мкл інкубували з 60 мкл 1М ТСЕР і 50 мкл 8М гідрохлориду гуанідику після знесолення. Загальну масу й масу відновлених важких і легких ланцюгів визначали за допомогою ESI-MC з використанням Мс-системи Q-Star Elite, забезпеченої джерелом NanoMate.

ELISA для оцінки зв'язування ECD IGF-1R

Особливості зв'язування створених антитіл з позаклітинним доменом (ECD) IGF-1R аналізували за допомогою ELISA. Для цієї мети позаклітинний домен IGF-1R (залишки 1-462), що містить лідерну послідовність, яка зустрічається у природних умовах, і 12 богатих LI-цистеїном доменів ектодомена альфа-ланцюга людського IGF-1R (згідно McKern і ін., 1997; Ward і ін., 2001), злитий з N-кінцевою міткою, що представляє собою His-стрептавідин-єднальний пептид (His-SBP), клонували у похідному вектора pcDNA3 і короткочасно експресували у HEK293F-клітинах. Білкова послідовність ECD IGF-1R-His-SBP представлена у SEQ ID NO: 10. 96-ямкові титраційні мікропланшети, що мають високу здатність зв'язувати стрептавідин А (планшети типу StreptaWell High Bind Streptavidin A (фірма Roche)), сенсibiliзували, використовуючи 100 мкл/лунку супернатанта клітинної культури, що містить розчинний злитий білок IGF-1R-ECD-SBP, протягом ночі при 4°C і відмивали тричі, використовуючи 200 мкл/лунку 3ФР, 0,05% Твін (3ФР, фірма Sigma). Потім додавали у лунки з розрахунку 100 мкл/лунку серійні розведення відповідного антитіла й в якості референс-антитіла антитіло дикого типу \langleIGF-1R> у 3ФР (фірма Sigma), що включало 1% BCA (фракція V, фірма Roche), та інкубували протягом 1-2

год на шейкері для титраційних мікропланшетів при кімнатній температурі. При здійсненні серійних розведень у лунки вносили однакову кількість очищеного антитіла. Лунки відмивали тричі, використовуючи 200 мкл/лунку 3ФР, і зв'язане антитіло виявляли, використовуючи 100 мкл/лунку F(ab')₂-hFcγγ>POD (фірма Dianova) у концентрації 0,1 мкг/мл (1:8000) як ідентифікуюче антитіло, протягом 1-2 год на шейкері для титраційних мікропланшетів при кімнатній температурі. Незв'язане ідентифікуюче антитіло відмивали тричі, використовуючи 200 мкл/лунку 3ФР, і зв'язане ідентифікуюче антитіло виявляли, додаючи 100 мкл ABTS/лунку. Визначення абсорбції здійснювали на спектрометрі Tecan Fluor при довжині хвилі 405 нм (довжина референс хвилі 492 нм).

10 Біасоре-аналіз із використанням ECD IGF-1R (IGF-1R-ECD)

Зв'язування створених антитіл з людським IGF-1R-ECD досліджували також за допомогою поверхневого плазмонного резонансу, використовуючи пристрій типу BIACORE T100 (фірма GE Healthcare Biosciences AB, Упсала, Швеція). У цілому, метод полягав у наступному: для оцінки афінності козячі антилюдські антитіла типу IgG JIR 109-005-098 іммобілізували на CM5-чипі за допомогою амінового сполучення для презентації антитіл до людського IGF-1R-ECD, що несуть Fc. Зв'язування оцінювали у HBS-буфері (HBS-P (10mM HEPES, 150mM NaCl, 0,005% Твін 20, pH 7,4) при 25°C. IGF-1R-ECD (фірма R&D Systems або отриманий при створенні винаходу) додавали у розчин у різних концентраціях. Асоціацію оцінювали шляхом ін'єкції IGF-1R-ECD протягом проміжку часу від 80 с до 3 хв; дисоціацію оцінювали шляхом відмивання поверхні чипа HBS-буфером протягом 3-10 хв і значення KD визначали, використовуючи модель зв'язування Ленгмюра при співвідношенні 1:1. Через низьку щільність завантаження й рівня захоплення антитіл \langleIGF-1R> одержували дані про зв'язування одновалентного IGF-1R-ECD. Дані, отримані для негативного контролю (наприклад, криві, отримані тільки для буфера) віднімали з кривих, отриманих для зразка, для корекції властивого системі зрушення основного рівня й для зниження шумових сигналів. Застосовували програму Biacore T100 Evaluation, версія 1.1.1 для аналізу сенсограмм і для розрахунку даних, що стосуються афінності. На фіг. 11 представлено схематичне зображення Біасоре-аналізу.

Приклади 1

Одержання, експресія, очищення й характеристика моноспецифічного двовалентного антитіла \langleIGF-1R>, в якому CL- і CH1-домени константних областей замінені один на одного (скорочено позначено у контексті даного опису як антитіло \langleIGF-1R>, що несе заміну CL-CH1)

Приклад 1А

Створення експресійних плазмід для моноспецифічного двовалентного антитіла \langleIGF-1R>, що несе заміну CL-CH1

Послідовності варіабельних доменів важкого й легкого ланцюга моноспецифічного двовалентного антитіла \langleIGF-1R>, що несе заміну CL-CH1, включаючи відповідні лідерні послідовності, описані у даному прикладі, виводили з важкого ланцюга людського антитіла \langleIGF-1R> (SEQ ID NO: 1, плазміда 4843-pUC-HC-IGF-1R) і його легкого ланцюга (SEQ ID NO: 2, плазміда 4842-pUC-LC-IGF-1R), які описані у WO 2005/005635, і константні домени важкого й легкого ланцюга виводили з людського антитіла (C-каппа й IgG1).

Генні сегменти, що кодують лідерну послідовність, варіабельний домен важкого ланцюга (VH) і домени людського легкого каппа-ланцюга (CL) антитіла \langleIGF-1R> зчіплювали й зливали з 5'-кінцем Fc-домени константних областей людського важкого γ 1-ланцюга (шарнір-CH2-CH3). ДНК, що кодує відповідний злитий білок, отриманий у результаті заміни CH1-домена на CL-домени (заміна CH1-CL), створювали шляхом синтезу гена й позначали далі як \langleIGF-1R> HC** (SEQ ID NO: 3).

Генні сегменти, що кодують лідерну послідовність, варіабельний домен легкого ланцюга (VL) і константний домен (CH1) людського важкого γ 1-ланцюга антитіла \langleIGF-1R> зчіплювали у вигляді незалежного ланцюга. ДНК, що кодує відповідний злитий білок, отриманий у результаті заміни CL-домена на CH1-домени (заміна CL-CH1), створювали шляхом синтезу гена й позначали далі як \langleIGF-1R> LC** (SEQ ID NO: 4).

На фіг. 5 і фіг. 6 представлено схематичне зображення білкової послідовності модифікованого важкого ланцюга \langleIGF-1R> HC** і модифікованого легкого ланцюга \langleIGF-1R> LC**.

Нижче коротко описані відповідні експресійні вектори:

Вектор pUC-HC**-IGF-1R

Вектор pUC-HC**-IGF-1R являє собою експресійну плазмиду, наприклад, призначеного для короткочасної експресії несучого заміну CL-CH1 важкого ланцюга \langleIGF-1R> HC** (касета експресії на основі кДНК-конструкції; з CMV-інтроном А), у клітинах лінії HEK293 (EBNA) або стабільної експресії у CHO-клітинах.

Крім експресійної касети <IGF-1R> HC** цей вектор містив:

- сайт ініціації реплікації з pUC18, що забезпечує реплікацію зазначеної плазмиди в E. coli, і
- ген β -лактамази, що надає стійкість в E. coli до ампіциліну.

Транскрипційна одиниця гена <IGF-1R> HC** містила наступні елементи:

- 5 - сайт рестрикції AclI на 5'-кінці,
- негайно-ранній енхансер і промотор з людського цитомегаловірусу,
- розташовану за ним послідовність інтрона A,
- 5'-нетрансльовану область гена людського антитіла,
- сигнальну послідовність легкого ланцюга імуноглобуліну,
- 10 - ген людського зрілого HC**-ланцюга <IGF-1R>, що кодує злиття варіабельного домена людського важкого ланцюга (VH) і константного домена людського легкого каппа-ланцюга (CL), злитий на 5'-кінці Fc-доменів константних доменів людського важкого γ 1-ланцюга (шарнір-CH2-CH3),
- 3'-нетрансльовану область з сигнальною послідовністю поліаденілювання й
- 15 - сайт рестрикції SgrAI на 3'-кінці.

Плазмідна карта експресійного вектора pUC-HC**-IGF-1R, призначеного для несучого заміну CL-CH1 важкого ланцюга ** <IGF-1R> HC**, представлена на фіг. 7. Амінокислотна послідовність <IGF-1R> HC** (включаючи сигнальну послідовність) представлена у SEQ ID NO: 3.

20 Вектор pUC-LC**-IGF-1R

Вектор pUC-LC**-IGF-1R являє собою експресійну плазмиду, наприклад, призначеного для короткочасної експресії несучого заміну CL-CH1 легкого ланцюга <IGF-1R> LC** ((касета експресії на основі кДНК-конструкції; з CMV-інтроном A), у клітинах лінії HEK293 (EBNA) або стабільної експресії у CHO-клітинах.

25 Крім експресійної касети <IGF-1R> LC** цей вектор містив:

- сайт ініціації реплікації з pUC18, що забезпечує реплікацію зазначеної плазмиди в E. coli, і
- ген β -лактамази, що надає стійкість в E. coli до ампіциліну.

Транскрипційна одиниця гена <IGF-1R> LC** містила наступні елементи:

- сайт рестрикції Sse8387I на 5'-кінці,
- 30 - негайно-ранній енхансер і промотор з людського цитомегаловірусу,
- розташовану за ним послідовність інтрона A,
- 5'-нетрансльовану область гена людського антитіла,
- сигнальну послідовність важкого ланцюга імуноглобуліну,
- ген людського зрілого LC**-ланцюга <IGF-1R>, що кодує злиття варіабельного домена людського легкого ланцюга (VL) і константних доменів людського важкого γ 1-ланцюга (CH1),
- 3'-нетрансльовану область з сигнальною послідовністю поліаденілювання й
- 35 - сайти рестрикції Sall і FseI на 3'-кінці.

Плазмідна карта експресійного вектора pUC-LC**-IGF-1R, призначеного для несучого заміну CL-CH1 легкого ланцюга ** <IGF-1R> LC**, представлена на фіг. 8. Амінокислотна послідовність <IGF-1R> LC** (включаючи сигнальну послідовність) представлена у SEQ ID NO: 4.

40 Плазмиди pUC-HC**-IGF-1R і pUC-LC**-IGF-1R можна застосовувати для короткочасних або стабільних котрансфекцій, наприклад, клітин HEK293, HEK293 EBNA або CHO (2-векторна система). З метою порівняння здійснювали короткочасну експресію антитіла <IGF-1R> дикого типу з плазмід 4842-pUC-LC-IGF-1R (SEQ ID NO: 2) і 4843-pUC-HC-IGF-1R (SEQ ID NO: 1), аналогічно методу, описаному у цьому прикладі.

45 Для досягнення більше високих рівнів експресії при короткочасних експресіях у клітинах HEK293 EBNA експресійну касету <IGF-1R> HC** можна субклонувати із використанням сайтів AclI, SgrAI, а експресійну касету <IGF-1R> LC** можна субклонувати із використанням сайтів Sse8387I і FseI в експресійному векторі 4700-pUC-Hyg_OrIP, що містив

- 50 - елемент OriP і
- ген, що обумовлює стійкість до гіроміцину, в якості селекуємого маркера.

Транскрипційні одиниці важкого й легкого ланцюга можна або субклонувати у двох незалежних векторах 4700-pUC-Hyg-OrIP з метою котрансфекції (2-векторна система), або їх можна клонувати в одному загальному векторі 4700-pUC-Hyg-OrIP (1-векторна система) для наступних короткочасних або стабільних трансфекцій з використанням векторів, що утворилися. На фіг. 9 показана плазмідна карта основного вектора 4700-pUC-OrIP.

Приклад 1Б

Створення експресійних плазмід для моноспецифічного двовалентного антитіла <IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1

Злиті гени <IGF-1R> (злиті гени HC** і LC**), що містять змінені Fab-послідовності щодо антитіла <IGF-1R> дикого типу, збирали за допомогою відомих методів і процесів рекомбінації шляхом з'єднання відповідних сегментів нуклеїнових кислот.

Кожну з нуклеотидних послідовностей, що кодують HC** і LC** IGF-1R, синтезували шляхом хімічного синтезу й потім клонували у клонуючому векторі pGA4, основою якого є плазмід рPCRScrip (фірма Stratagene), на фірмі Geneart (Регенсбург, Німеччина). Касету експресії, що кодує IGF-1R HC**, вбудовували шляхом лігування у придатну для E. coli плазмиду, використовуючи сайти рестрикції PvuII і BmgBI, з одержанням кінцевого вектора рUC-HC**-IGF-1R; касету експресії, що кодує відповідну IGF-1R LC**, вбудовували шляхом лігування у придатну для E. coli плазмиду, використовуючи сайти рестрикції PvuII і Sall, з одержанням кінцевого вектора рUC-LC**-IGF-1R. Субклоновані нуклеотидні послідовності підтверджували шляхом секвенування ДНК. Для короточасних і стабільних трансфекцій використовували великі кількості плазмід, які одержували з трансформованих культур E. coli (набір Nucleobond AX, фірма Macherey-Nagel).

Приклад 1В

Короточасна експресія моноспецифічного двовалентного антитіла <IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1, його очищення й підтвердження ідентичності за допомогою мас-спектрометрії

Рекомбінантне антитіло <IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1, експресували шляхом короточасної котрансфекції плазмідами рUC-HC**-IGF-1R і рUC-LC**-IGF-1R клітин, що перебувають у суспензії, лінії HEK293-F відповідно до описаного вище методу.

Експресоване й секретоване моноспецифічне двовалентне антитіло <IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1, очищали з профільтованих супернатантів клітинної культури за допомогою афінної хроматографії на білку А відповідно до описаного вище методу. У цілому, метод полягав у наступному: утримуючі антитіло <IGF-1R>, несучі заміну CL-CH1, супернатанти клітинної культури після короточасних трансфекцій прояснювали центрифугуванням і фільтрацією й вносили на колонку HiTrap MabSelect Xtra (фірма GE Healthcare), що містить білок А, врівноважену ЗФР-буфером (10мМ Na₂HPO₄, 1мМ KH₂PO₄, 137мМ NaCl і 2,7мМ KCl, pH 7,4). Незв'язані білки відмивали врівноважуючим ЗФР-буфером, а потім 0,1М натрій-цитратним буфером, pH 5,5 і відмивали ЗФР. Для елюції антитіла застосовували 100мМ натрій-цитратний буфер, pH 2,8, після чого зразки негайно нейтралізували, додаючи 300 мкл 2М Трис, pH 9,0 на 2-мілілітрову фракцію. Агрегований білок відокремлювали від мономерних антитіл за допомогою гель-фільтрації на колонку HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade (фірма GE Healthcare) у 20мМ гістидині, 150мМ NaCl, pH 6,0, а фракцію мономерних антитіл потім концентрували за допомогою центрифужного концентратора MILLIPORE Amicon Ultra-15. Антитіло <IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1, заморожували й зберігали при -20°C або -80°C. Цілісність антитіла <IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1, аналізували за допомогою ДСН-ПААГ у присутності відновлювача або без нього й потім офарбовували кумасси брильянтовым блакитним відповідно до описаного вище методу. Мономерний стан антитіла <IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1, підтверджували аналітичною гель-фільтрацією (фіг. 12). Охарактеризовані зразки використовували для подальшого аналітичного дослідження білка й вивчення функціональних характеристик. За допомогою ESI-мас-спектрометрії підтверджували теоретичну молекулярну масу повністю дегліколізованого антитіла <IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1.

Приклад 1Г

Аналіз здатності моноспецифічного двовалентного антитіла <IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1, зв'язувати IGF-1R за допомогою застосовуваного для оцінки зв'язування IGF-1R-ECD ELISA і Bioscore-аналізу

Єднальні здатності моноспецифічного двовалентного антитіла <IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1, оцінювали за допомогою ELISA з використанням позаклітинного домена (ECD) IGF-1R відповідно до описаного вище методу. Для цієї мети позаклітинний домен IGF-1R (залишки 1-462), що містить лідерну послідовність, яка зустрічається у природних умовах, і 12 богатих LI-цистеїном доменів ектодомена альфа-ланцюга людського IGF-1R (згідно McKern і ін., 1997; Ward і ін., 2001), злитий з N-кінцевою міткою, що представляє собою His-стрептавідин-єднальний пептид (His-SBP), клонували у похідному вектора рсDNA3 і короточасно експресували у HEK293F-клітинах. Білкова послідовність ECD IGF-1R-His-SBP представлена вище. З отриманої титраційної кривої видно, що антитіло <IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1, мало функціональну активність і для нього виявлені характеристики зв'язування й кінетичні характеристики, порівнянні з характеристиками антитіла <IGF-1R> дикого типу у межах помилки методу, і тому воно є повністю функціональним (фіг. 13).

Ці дані корелюють з результатами, отриманими за допомогою Біасоре-аналізу, що продемонстрував, що афінність моноспецифічного двовалентного антитіла <IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1, характеризується значенням KD, рівним 3,7 пМ, і таким чином, воно має порівнянні параметри афінності й кінетичні характеристики зв'язування з ECD IGF-1R з вихідним антитілом <IGF-1R> дикого типу, для якого значення KD становить 3,2 нМ.

Приклад 1Д

Аналіз здатності моноспецифічного двовалентного антитіла <IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1, зв'язувати IGF-1R за допомогою FACS з використанням надекспресуючих IGF-1R I24-клітин

Для підтвердження активності зв'язування антитіла <IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1, з IGF-1R, надекспресуємим на поверхні I24-клітин (NIH3T3-клітини, що експресують рекомбінантний людський IGF-1R, фірма Roche), використовували FACS-аналіз. У цілому, метод полягав у наступному: 5×10^5 I24-клітин на кожну трубку, призначену для здійснення FACS, інкубували з розведенням очищеного антитіла <IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1, і антитіла <IGF-1R> дикого типу в якості референс-антитіла та інкубували на льоді протягом 1 год. Незв'язаний білок відмивали за допомогою 4 мл охолодженого на льоді 3ФР (фірма Gibco) + 2% FCS (фірма Gibco). Потім клітини центрифугували (5 хв при 400 g), а зв'язане антитіло виявляли за допомогою кон'югата F(ab')₂ <hFcγ>PE (фірма Dianova) на льоді протягом 1 год, захищаючи від дії світла. Виявлене незв'язане антитіло відмивали за допомогою 4 мл охолодженого на льоді 3ФР + 2% FCS. Потім клітини центрифугували (5 хв при 400 g), ресуспендували у 300-500 мкл 3ФР і виявлене зв'язане антитіло оцінювали кількісно за допомогою пристрою FACSCalibur або FACS Canto (фірма BD (FL 2-канал, 10000 клітин на процес). В експеримент включали як контролю антитіла відповідного ізотипу для виключення будь-яких неспецифічних випадків зв'язування. Зв'язування антитіла <IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1, і антитіла <IGF-1R> дикого типу з IGF-1R на поверхні I24-клітин характеризувалося порівняним залежним від концентрації зрушенням середньої інтенсивності флуоресценції.

Приклади 2

Опис моноспецифічного двовалентного антитіла <ANGPT2> дикого типу

Приклад 2А

Створення експресійних плазмід для моноспецифічного двовалентного антитіла <ANGPT2> дикого типу

Послідовності варіабельних областей важкого й легкого ланцюга моноспецифічного двовалентного антитіла до ANGPT2 (<ANGPT2>) дикого типу, включаючи відповідні лідерні послідовності, описані у даному прикладі, виводили з важкого ланцюга людського антитіла <ANGPT2> (SEQ ID NO: 6) і його легкого ланцюга (SEQ ID NO: 7), які описані у WO 2006/045049, а константні домени важкого й легкого ланцюга виводили з людського антитіла (С-каппа й IgG1).

Антитіло <ANGPT2> дикого типу клонували у плазмідах SB04-pUC-HC-ANGPT2 (SEQ ID NO: 6) і SB06-pUC-LC-ANGPT2 (SEQ ID NO: 7), які є аналогами векторів, описаних вище у прикладі 1А.

З метою порівняння й для здійснення експериментів за спільною експресією (див. приклад 3) антитіло <ANGPT2> дикого типу короткочасно (ко-)експресували з використанням плазмід SB04-pUC-HC-ANGPT2 і SB06-pUC-LC-ANGPT2.

Приклад 2Б

Створення експресійних плазмід для моноспецифічного двовалентного антитіла <ANGPT2> дикого типу

Кожну з нуклеотидних послідовностей, що кодують HC і LC <ANGPT2>, синтезували за допомогою хімічного синтезу й потім клонували у клонуючому векторі pGA4, основою якого є плазмід рPCRScript (фірма Stratagene), на фірмі Geneart (Регенсбург, Німеччина). Експресійну касету, що кодує HC <ANGPT2>, клонували у придатній для E. coli плазміді, одержуючи кінцевий вектор SB04-pUC-HC-ANGPT2; експресійну плазмід, що кодує відповідну LC <ANGPT2>, клонували у придатній для E. coli плазміді, одержуючи кінцевий вектор SB06-pUC-LC-ANGPT2. Субклоновані нуклеотидні послідовності підтверджували шляхом секвенування ДНК. Для короткочасних і стабільних трансфекцій використовували великі кількості плазмід, які одержували з трансформованих культур E. coli (набір Nucleobond AX, фірма Macherey-Nagel).

Приклади 3

Експресія біспецифічного двовалентного антитіла <ANGPT2-IGF-1R>, в якому важкий і легкий ланцюг специфічно зв'язується з IGF-1R, константні домени CL і CH1 замінені один на одного (скорочено позначено у контексті даного опису як антитіло <ANGPT2-IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1)

Приклад 3А

Короткочасна спільна експресія й очищення антитіла <IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1, і антитіла <ANGPT2> дикого типу у клітинах лінії HEK293 EBNA з одержанням біспецифічного антитіла <ANGPT2-IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1

5 Для створення функціонального біспецифічного антитіла, що розпізнає IGF-1R, на основі Fab-фрагмента антитіла <IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1, з одного боку, і що розпізнає ANGPT2 на основі Fab-фрагмента антитіла <ANGPT2> дикого типу, з іншого боку, дві експресійні плазмиди, що кодують антитіло <IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1 (приклад 1А), спільно експресували із двома експресійними плазмидами, що кодують антитіло <ANGPT2> дикого типу (приклад 2А). З урахуванням підтвердженою статистикою асоціації важких ланцюгів (НС) дикого типу й несучих заміну важких ланцюгів CL-CH1 НС** це приводило до одержання біспецифічного й двовалентного антитіла <IGF-1R-ANGPT2>, що несе заміну CL-CH1. З огляду на, що обидва антитіла однаково добре експресувались і при цьому не утворювалися побічні продукти у кількості, що може вплинути на результат, варто очікувати, що цей процес повинен 10 приводити до одержання нижче зазначених трьох основних продуктів у співвідношенні 1:2:1: А) антитіло <IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1, Б) біспецифічне антитіло <IGF-1R-ANGPT2>, що несе заміну CL-CH1, і В) антитіло <ANGPT2> дикого типу. Можна було очікувати присутності декількох побічних продуктів. Однак через заміну тільки CL-CH1-доменів частота зустрічальності побічних продуктів повинна бути знижена у порівнянні з Fab, отриманими у результаті повного кросинговеру. Слід зазначити, що для антитіла <ANGPT2> дикого типу був виявлений більше високий вихід продукту короткочасної експресії у порівнянні з антитілом <IGF-1R> дикого типу й антитілом <IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1, співвідношення плазмід, що кодують антитіло <ANGPT2> дикого типу, і плазмід, що кодують антитіло <IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1, зрушувалося вбік експресії антитіла <ANGPT2> дикого типу.

25 Для створення суміші основних продуктів, таких як А) антитіло <IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1, Б) біспецифічне антитіло <IGF-1R-ANGPT2>, що несе заміну CL-CH1, і В) антитіло <ANGPT2> дикого типу, чотирма плазмидами pUC-НС**-IGF-1R і pUC-LC**-IGF-1R і плазмидами SB04-pUC-НС-ANGPT2 і SB06-pUC-LC-ANGPT2 короткочасно котрансфектували HEK293F-клітини, що знаходяться у виді суспензійної культури, відповідно до описаного вище методу. Зібраний супернатант, що містить суміш основних продуктів: А) антитіло <IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1, Б) біспецифічне антитіло <IGF-1R-ANGPT2>, що несе заміну CL-CH1, і В) антитіло <ANGPT2> дикого типу, позначили як «суміш, що містить біспецифічне антитіло, що несе заміну CL-CH1». Супернатанти клітинної культури, які включали суміш, що містить біспецифічне антитіло, що несе заміну CL-CH1, збирали центрифугуванням і потім очищали 35 відповідно до описаного вище методу (фіг. 14).

Цілісність суміші антитіл аналізували за допомогою ДСН-ПААГ у присутності відновлювача або без нього й потім офарбовували кумасси брильянтовым блакитним. Отримані за допомогою ДСН-ПААГ результати свідчать про те, що, як і слід було сподіватися, у препараті були присутні 2 різні важкі й легкі ланцюги (гель у присутності відновлювача). Мономерний стан суміші антитіл 40 підтверджували аналітичною гель-фільтрацією, і було встановлено, що очищені види антитіл перебували у мономерному стані. Охарактеризовані зразки використовували для подальшого аналітичного дослідження білка й вивчення функціональних характеристик.

Приклад 3Б

Виявлення функціонального біспецифічного антитіла <ANGPT2-IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1, за допомогою клітинного FACS-аналізу, що дозволяє виявляти утворення мостикового зв'язку, з використанням експресуючих IGF-1R клітин лінії I24

Для підтвердження присутності функціонального біспецифічного антитіла <ANGPT2-IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1, в очищеній суміші, що містила біспецифічне антитіло, що несе заміну CL-CH1, що включає наступні основні продукти: А) антитіло <IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1, Б) біспецифічне антитіло <ANGPT2-IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1, і В) антитіло <ANGPT2> дикого типу, отримане після короткочасної спільної експресії відповідно до методу, описаному у прикладі 3А, проводили клітинний FACS-аналіз, що дозволяє виявляти утворення мостикового зв'язку такого як IGF-1R-ANGPT2, з використанням клітин лінії I24 (NIH3T 3-клітини, що експресують рекомбінантний людський IGF-1R, фірма Roche). Принцип аналізу показаний на 50 фіг. 10. Біспецифічне антитіло <ANGPT2-IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1, що було присутнє в очищеній суміші антитіл, мало здатність зв'язуватися з IGF-1R на поверхні I24-клітин і одночасно з ANGPT2; і у такий спосіб мало здатність з'єднувати мостиковим зв'язком два його антигени-мішені з двома протилежними Fab-фрагментами.

У цілому, метод полягав у наступному: 5×10^5 клітин лінії I24 на трубку, призначену для 60 здійснення FACS, інкубували із загальною сумішшю очищених антитіл на льоді протягом 1 год

(титрація 160 мкг/мл суміші). Відповідні очищені антитіла дикого типу <IGF-1R> і <ANGPT2> наносили на I24-клітини як контролі. Незв'язане антитіло відмивали 4 мл охолодженого на льоді 3ФР (фірма Gibco) + 2% FCS (фірма Gibco), клітини центрифугували (5 хв при 400 g) і зв'язане біспецифічне антитіло виявляли за допомогою 50 мкл (2 мкг/мл) людського ANGPT2 (фірма R&D Systems) протягом 1 год на льоді. Потім незв'язаний ANGPT2 відмивали один або два рази 4 мл охолодженого на льоді 3ФР (фірма Gibco) + 2% FCS (фірма Gibco), клітини центрифугували (5 хв при 400 g) і зв'язаний ANGPT2 виявляли за допомогою 50 мкл (5 мкг/мл) антитіла <ANGPT2>mIgG 1-біотин (BAM0981, фірма R&D Systems) протягом 45 хв на льоді; в альтернативному варіанті клітини інкубували з 50 мкл (5 мкг/мл) кон'югата mIgG 1-біотин як контроль ізо типу (фірма R&D Systems). Незв'язане ідентифікуюче антитіло відмивали 4 мл охолодженого на льоді 3ФР (фірма Gibco) + 2% FCS (фірма Gibco), клітини центрифугували (5 хв при 400 g) і зв'язане ідентифікуюче антитіло виявляли за допомогою 50 мкл кон'югата 1:400 стрептавідин-PE (SA-PE) (фірма Invitrogen/Zymed) протягом 45 хв на льоді, захищаючи від дії світла. Незв'язаний кон'югат стрептавідин-PE відмивали 4 мл охолодженого на льоді 3ФР + 2% FCS. Потім клітини центрифугували (5 хв при 400 g), ресуспендували у 300-500 мкл 3ФР і зв'язаний кон'югат стрептавідин-PE оцінювали кількісно за допомогою пристрою FACSCalibur (фірма BD (FL 2-канал, 10000 клітин на процес). В експеримент включали як контролі антитіла відповідного ізо типу для виключення будь-яких неспецифічних випадків зв'язування. Крім того, як контролі включали очищені моноспецифічні двовалентні антитіла типу IgG1, такі як <IGF-1R> і <ANGPT2>.

Результати, представлені на фіг. 15, демонструють, що інкубація з сумішшю, що містила очищене виникле у результаті кросинговеру антитіло (<ANGPT2-IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1), отримане після спільної експресії виниклого у результаті кросинговеру антитіла (<IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1) з антитілом дикого типу (антитіло <ANGPT2> дикого типу), приводило до істотного зрушення флуоресценції, що свідчить про присутність функціонального біспецифічного антитіла <ANGPT2-IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1, що має здатність зв'язуватися одночасно з IGF-1R на поверхні I24-клітин і з ANGPT2; і у такий спосіб має здатність з'єднувати мостиковим зв'язком два його антигени-мішені з двома протилежними Fab-фрагментами. На відміну від цього відповідні контрольні антитіла <IGF-1R> і <Ang-2> не приводили до зрушення флуоресценції при здійсненні FACS-аналізу, що дозволяє виявляти утворення мостикового зв'язку.

У сполученні ці дані свідчать про те, що шляхом спільної експресії відповідних плазмід дикого типу й отриманих у результаті кросинговеру плазмід можна створювати функціональні біспецифічні антитіла. Вихід правильного біспецифічного антитіла можна підвищувати, збільшуючи рівень правильної гетеродимеризації важких ланцюгів дикого типу й модифікованих отриманих у результаті кросинговеру важких ланцюгів, наприклад, використовуючи технологію «knobs-into-holes», а також стабілізацію за допомогою дисульфідного містка (див. приклад 4).

Приклад 4

Експресія двовалентного біспецифічного антитіла <ANGPT2-IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1, з модифікованими CH3-доменами (технологія «knobs-into-holes»)

Для додаткового підвищення виходу біспецифічного антитіла <ANGPT2-IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1, застосовували технологію «knobs-into-holes» для спільної експресії антитіла <IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1, і антитіла дикого типу <ANGPT2>, з метою одержання препарату гомогенного й функціонального біспецифічного антитіла. Для цієї мети CH3-домен у важкому ланцюзі * HC* антитіла <IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1, заміняли на CH3-домен («виступи»), що має послідовність SEQ ID NO: 8 з заміною T366W, а CH3-домен у важкому ланцюзі антитіла дикого типу <ANGPT2> заміняли на CH3-домен («западина»), що має послідовність SEQ ID NO: 9 з замінами T366S, L368A, Y407V, або навпаки. Крім того, можна інтродукувати дисульфідний місток для підвищення стабільності й виходу, а також як додаткові залишки, що формують іонні зв'язки й підвищують вихід продукту гетеродимеризації (EP 1870459A1).

Короткочасну спільну експресію й очищення утворившогося двовалентного біспецифічного антитіла <ANGPT2-IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1, з модифікованими CH3-доменами (технологія «knobs-into-holes») здійснювали відповідно до методу, описаному у прикладі 3.

Слід зазначити, що для оптимізації гетеродимеризації можна застосовувати, наприклад, різні технології «knobs-in-holes», такі як інтродукція додаткового дисульфідного містка у CH3-домен, наприклад, Y349C у несучий «виступ» ланцюг і D356C у несучий «западину» ланцюг, і/або їхнє об'єднання зі застосуванням залишків R409D; K370E (K409D) в якості утворюючих «виступи» залишків і D399K; E357K в якості утворюючих «западину» залишків, які описані в EP 1870459A1.

Аналогічно методу, описаному у прикладі 4, можна одержувати інші двовалентні біспецифічні антитіла, що несуть заміну CL-CH1, з модифікованими CH3-доменами (технологія «knobs-into-holes»), мішенню яких є ANGPT2 і інший антиген-мішень (використовуючи описані вище важкий і легкий ланцюг антитіла до ANGPT2 і важкий і легкий ланцюг** HC** і LC** антитіла, що несе заміну CL-CH1, до зазначеної іншої мішені, за допомогою чого обидва важкі ланцюги модифікували за допомогою технології «knobs-into-holes», або мішенню яких є IGF-1R і інший антиген-мішень (використовуючи важкий і легкий ланцюг антитіла до зазначеної іншої мішені й описані вище важкий і легкий ланцюг** HC** і LC** антитіла до IGF-1R, що несе заміну CL-CH1, за допомогою чого обидва важкі ланцюги модифікували за допомогою технології «knobs-into-holes»).

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Ф. Хоффманн-Ля Рош АГ

<120> Двовалентні біспецифічні антитіла

<130> 24679 EP

<150> EP 07024865

<151> 2007-12-21

<160> 10

<170> PatentIn версія 3.2

<210> 1

<211> 467

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> амінокислотна послідовність важкого ланцюга антитіла <IGF-1R> дикого типу

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Leu Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
115 120 125

Arg Gly Thr Leu Val Ser Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
130 135 140

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
165 170 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
180 185 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
195 200 205

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445

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

Pro Gly Lys
 465

<210> 2
 <211> 235
 <212> PRT
 <213> Штучна

<220>
 <223> амінокислотна послідовність легкого ланцюга антитіла <IGF-1R>
 дикого типу
 <400> 2

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

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

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser

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

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

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

<210> 3
<211> 471
<212> PRT
<213> Штучна

<220>

<223> амінокислотна послідовність важкого ланцюга ** (HC**) антитіла <IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1, в якому CH1-домен важкого ланцюга замінений на CL-домен легкого ланцюга

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Leu Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
115 120 125

Arg Gly Thr Leu Val Ser Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser
130 135 140

Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
145 150 155 160

Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
165 170 175

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
180 185 190

Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr
195 200 205

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

Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
225 230 235 240

Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
245 250 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
260 265 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
275 280 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
290 295 300

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

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

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

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

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

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

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

405 410 415
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470
 <210> 4
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Штучна
 <220>
 <223> амінокислотна послідовність легкого ланцюга ** (LC**) антитіла <IGF-1R>, що несе заміну CL-CH1, в якому CL-домен легкого ланцюга замінений на CH1-домен важкого ланцюга
 <400> 4
 Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15
 Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 20 25 30
 Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35 40 45

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

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

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

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

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

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

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
145 150 155 160

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
165 170 175

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
195 200 205

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
 210 215 220

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 225 230

<210> 5
 <211> 557
 <212> PRT
 <213> Штучна

<220>
 <223> амінокислотна послідовність ектодомена IGF-1R, що несе мітку, яка
 являє собою His-стрептавідин-еднальний пептид (ECD IGF-1R-His-SBP)

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Ala Ala Ala Leu
 485 490 495

Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro Gly Thr His His His His His His Ser
 500 505 510

Gly Asp Glu Lys Thr Thr Gly Trp Arg Gly Gly His Val Val Glu Gly
 515 520 525

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

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

<210> 6

<211> 471

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> амінокислотна послідовність важкого ланцюга антитіла до
ангіопоетину-2 <ANGPT2> дикого типу

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Leu Leu Asp Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr
115 120 125

Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
210 215 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
225 230 235 240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
245 250 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
260 265 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
275 280 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
290 295 300

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 7
<211> 219
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> амінокислотна послідовність легкого ланцюга антитіла до
ангіопоетину-2 <ANGPT2> дикого типу

<400> 7

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

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

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

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

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

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

Thr His Trp Pro Pro 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> 8
<211> 107
<212> PRT
<213> Штучна

<220>

<223> амінокислотна послідовність CH3-домена («виступи») із заміною T366W для застосування у технології «knobs-into-holes»

<400> 8

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

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

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

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

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

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
100 105

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> амінокислотна послідовність CH3-домена («западина») із заміною T366S, L368A, Y407V для застосування у технології «knobs-into-holes»

<400> 9

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

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe
 20 25 30

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

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

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

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105

<210> 10

<211> 557

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> амінокислотна послідовність ектодомена IGF-1R, що несе мітку, яка
 являє собою His-стрептавідин-еднальний пептид (ECD IGF-1R-His-SBP)

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Ala Ala Ala Leu
 485 490 495

Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro Gly Thr His His His His His His Ser
 500 505 510

Gly Asp Glu Lys Thr Thr Gly Trp Arg Gly Gly His Val Val Glu Gly
515 520 525

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

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

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Двовалентне біспецифічне антитіло, що містить:
 - а) легкий ланцюг і важкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з першим антигеном; і
 - б) легкий ланцюг і важкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з другим антигеном, у якому CL- і CH1-домени константних областей замінені один на одного.
- 10 2. Антитіло за п. 1, яке **відрізняється** тим, що CH3-домен одного важкого ланцюга й CH3-домен іншого важкого ланцюга кожний стикається один з одним на поверхні розділу, що являє собою вихідну поверхню розділу між CH3-доменами антитіла; при цьому поверхня розділу змінена для активації формування двовалентного біспецифічного антитіла, де зміна відрізняється тим, що:
 - 15 а) змінений CH3-домен одного важкого ланцюга так, що на вихідній поверхні розділу CH3-домена одного важкого ланцюга, що стикається з вихідною поверхнею розділу CH3-домена другого важкого ланцюга у двовалентному біспецифічному антитілі, амінокислотний залишок замінений на амінокислотний залишок, який має більший за обсягом бічний ланцюг, що приводить до створення опуклості на поверхні розділу CH3-домена одного важкого ланцюга, яка може поміститися у порожнину на поверхні розділу CH3-домена іншого важкого ланцюга,
і
 - б) змінений CH3-домен іншого важкого ланцюга так, що на вихідній поверхні розділу другого CH3-домена, що стикається з вихідною поверхнею розділу першого CH3-домена у двовалентному біспецифічному антитілі, амінокислотний залишок замінений на амінокислотний залишок, який має менший за обсягом бічний ланцюг, що приводить до створення порожнини на поверхні розділу другого CH3-домена, в яку може поміститися опуклість на поверхні розділу першого CH3-домена.
- 25 3. Антитіло за п. 2, яке **відрізняється** тим, що зазначений амінокислотний залишок, що має більший за обсягом бічний ланцюг, вибраний з групи, що включає аргінін (R), фенілаланін (F), тирозин (Y), триптофан (W).
4. Антитіло за п. 2 або п. 3, яке **відрізняється** тим, що зазначений амінокислотний залишок, що має менший за обсягом бічний ланцюг, вибраний з групи, що включає аланін (A), серин (S), треонін (T), валін (V).
- 35 5. Антитіло за одним із пп. 2-4, яке **відрізняється** тим, що обидва CH3-домени додатково змінені шляхом інтродукції цистеїну (C) як амінокислота у відповідні положення кожного CH3-домена.
6. Антитіло за п. 1, яке **відрізняється** тим, що один з CH3-доменів константної області важкого ланцюга обох важких ланцюгів замінений на CH1-домен константної області важкого ланцюга; а інший CH3-домен константної області важкого ланцюга замінений на CL-домен константної області легкого ланцюга.
- 40 7. Спосіб одержання двовалентного біспецифічного антитіла за п. 1, який полягає у тому, що а) трансформують клітину-хазяїна - векторами, які містять молекули нуклеїнових кислот, що кодують легкий ланцюг і важкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з першим антигеном,
- 45

- векторами, які містять молекули нуклеїнових кислот, що кодують легкий ланцюг і важкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з другим антигеном, у якому CL- і CH1-домени константних областей замінені один на одного;

б) культивують клітину-хазяїна в умовах, які дозволяють синтезувати зазначену молекулу антитіла; і

в) виділяють молекулу антитіла з культури.

8. Клітина-хазяїн, що містить:

- вектори, які містять молекули нуклеїнових кислот, що кодують легкий ланцюг і важкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з першим антигеном,

- вектори, які містять молекули нуклеїнових кислот, що кодують легкий ланцюг і важкий ланцюг антитіла, яке специфічно зв'язується з другим антигеном, у якому CL- і CH1-домени константних областей замінені один на одного.

9. Фармацевтична композиція, що містить двовалентне біспецифічне антитіло за будь-яким з пп. 1-6 і щонайменше один фармацевтично прийнятний ексципієнт.

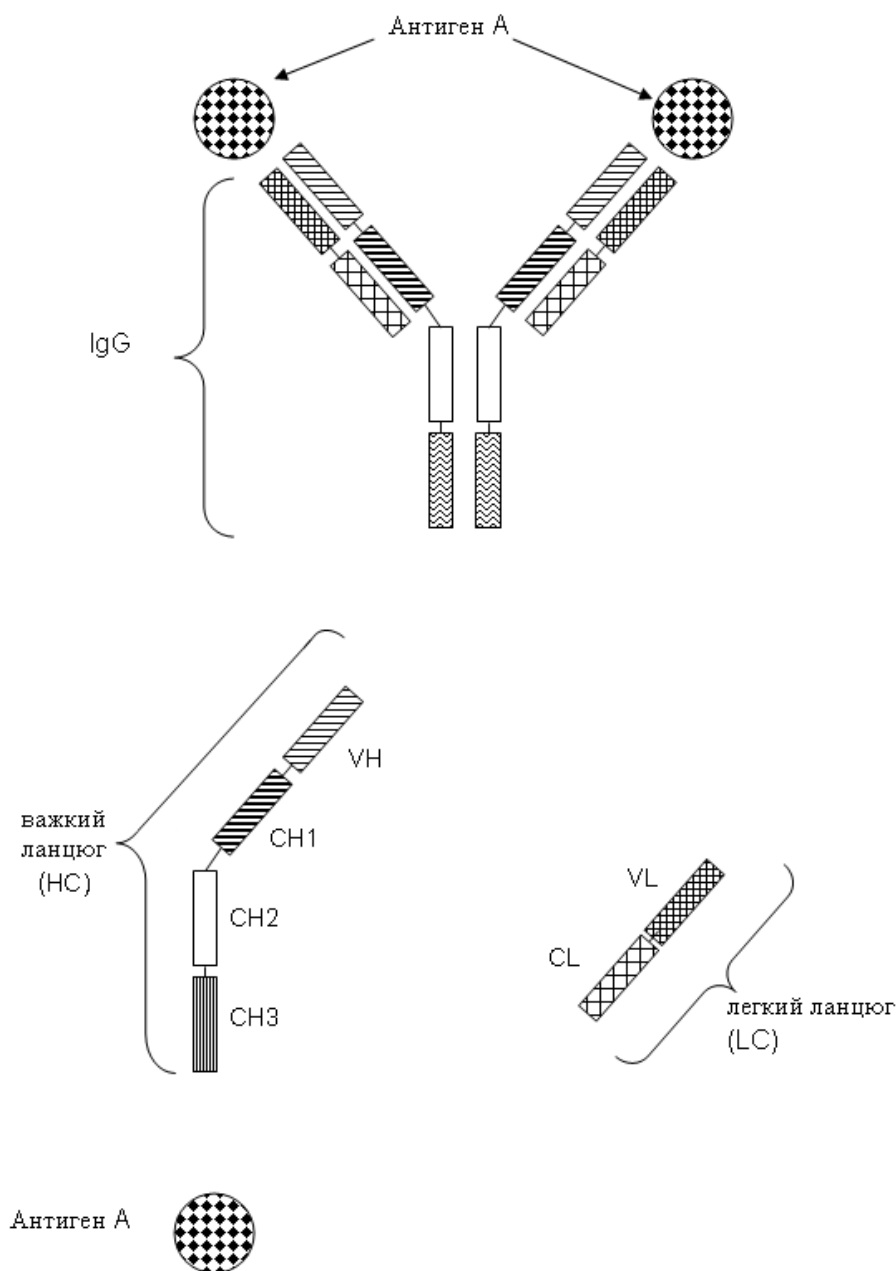


Fig.1

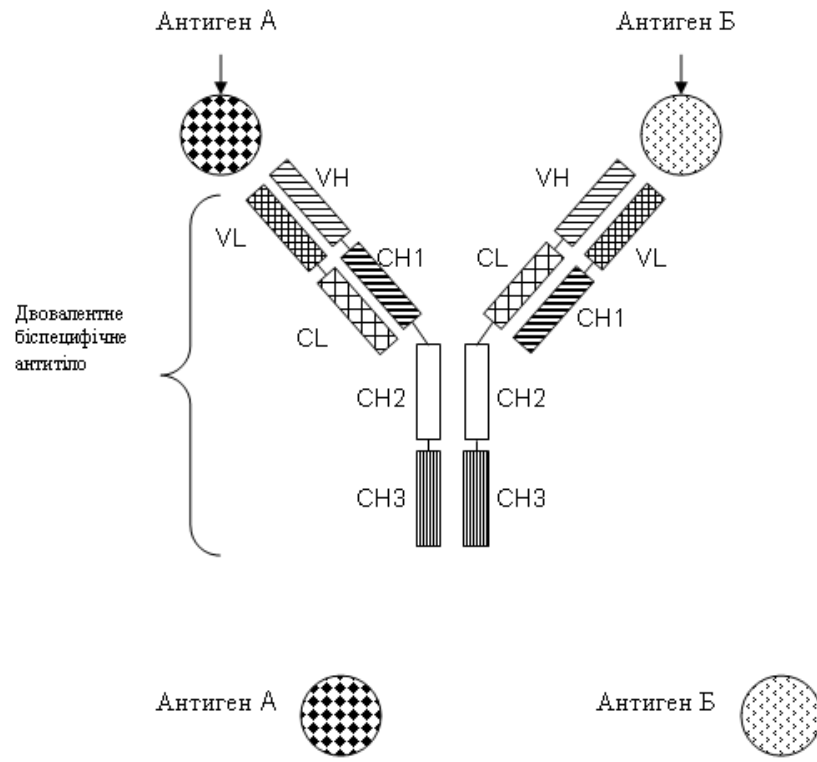
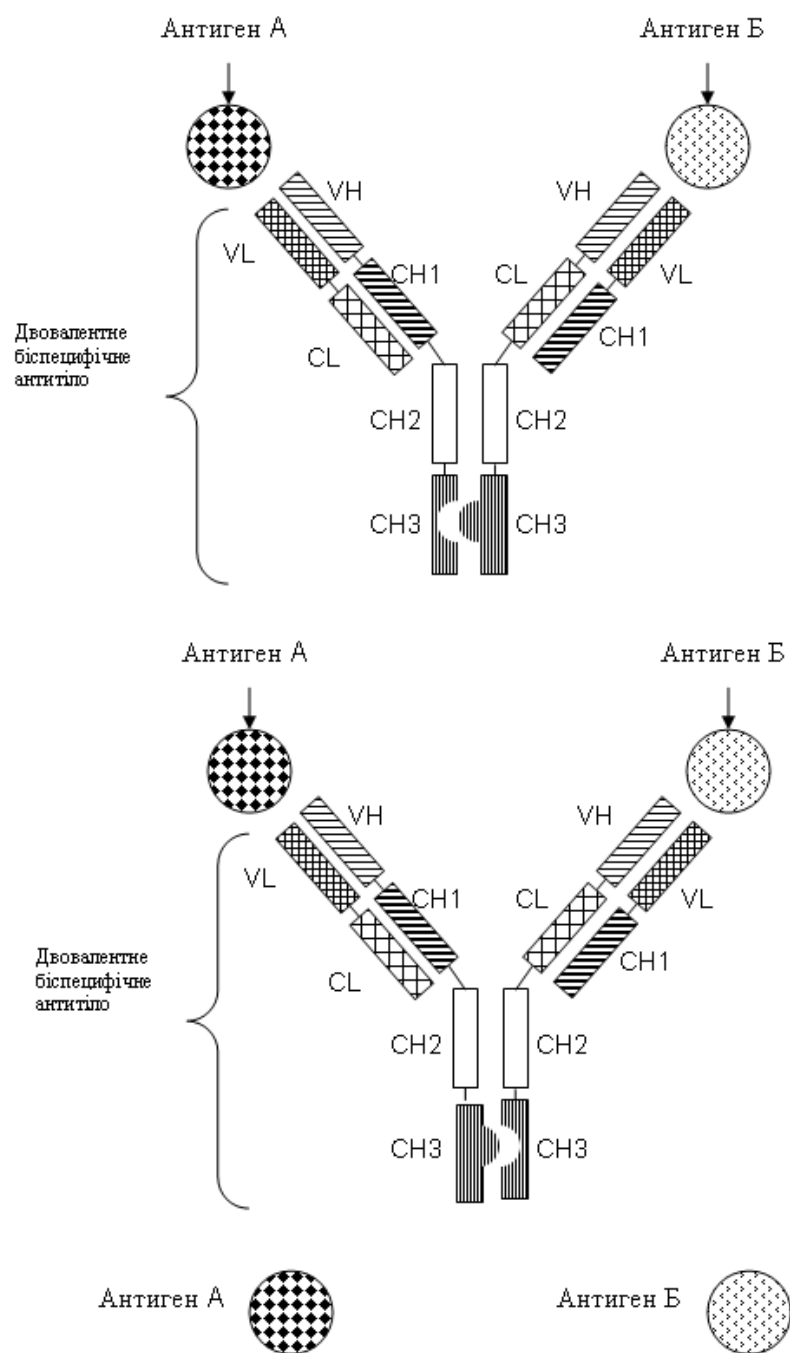
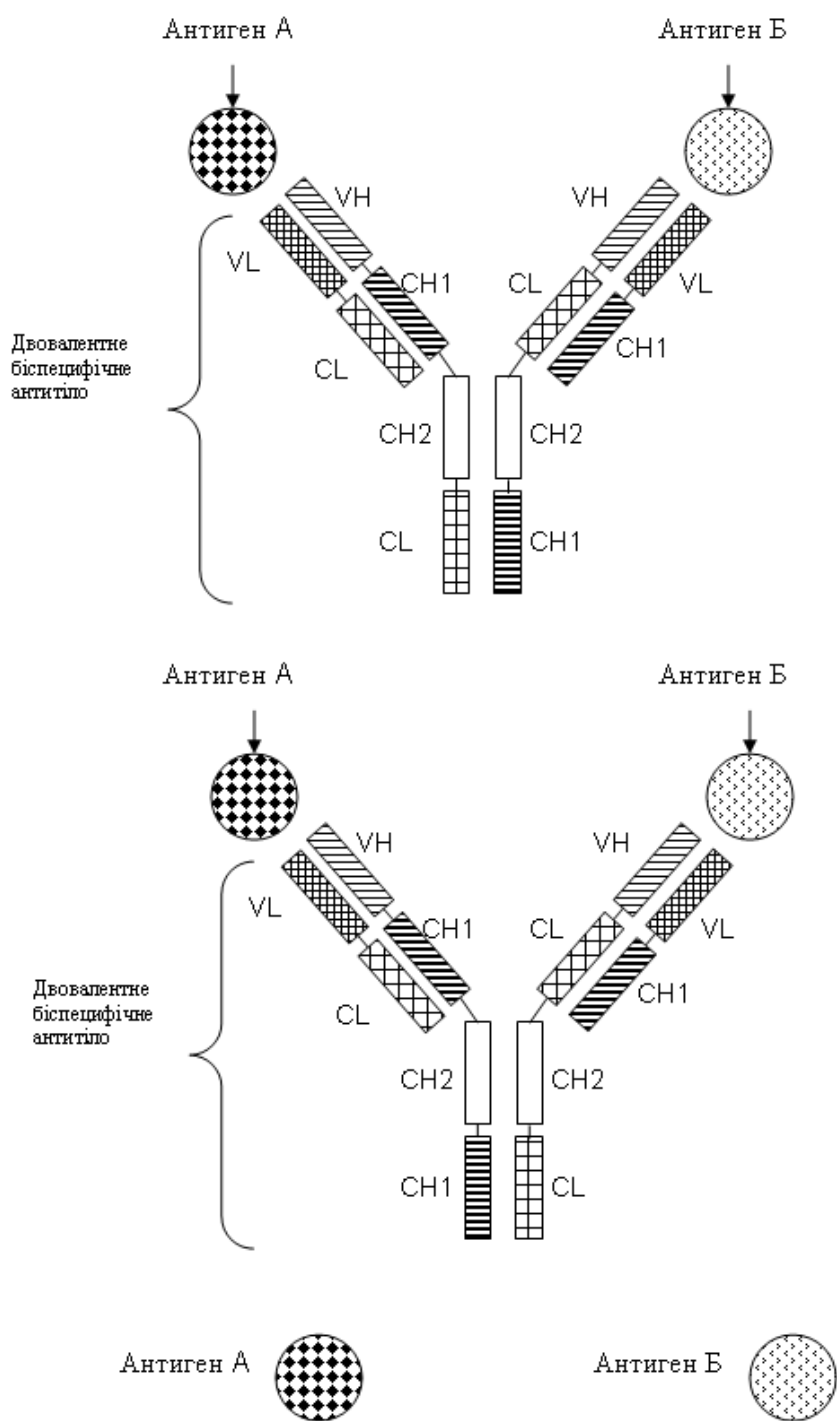


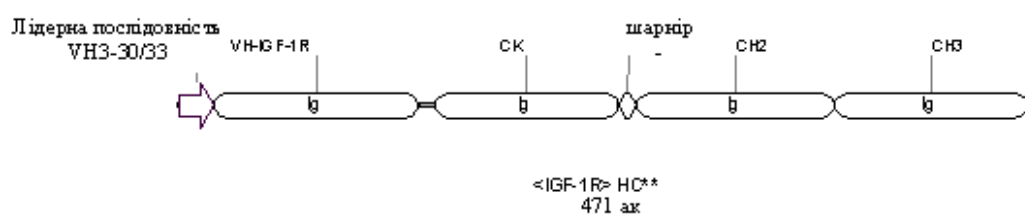
Fig.2



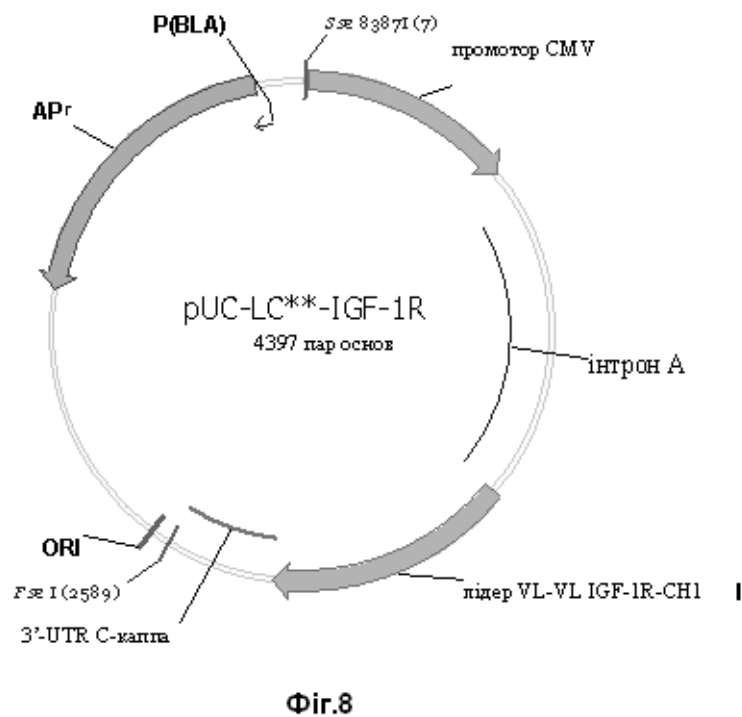
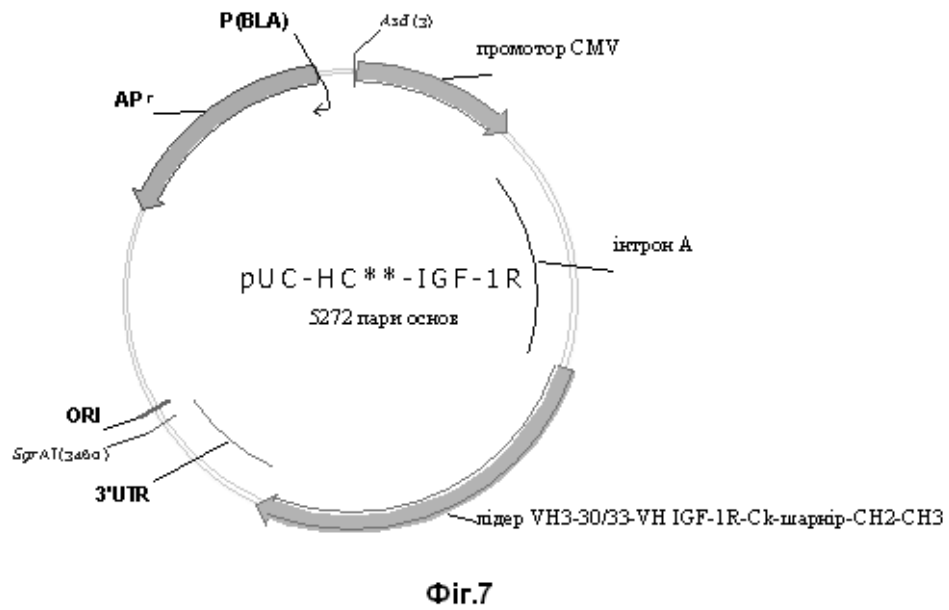
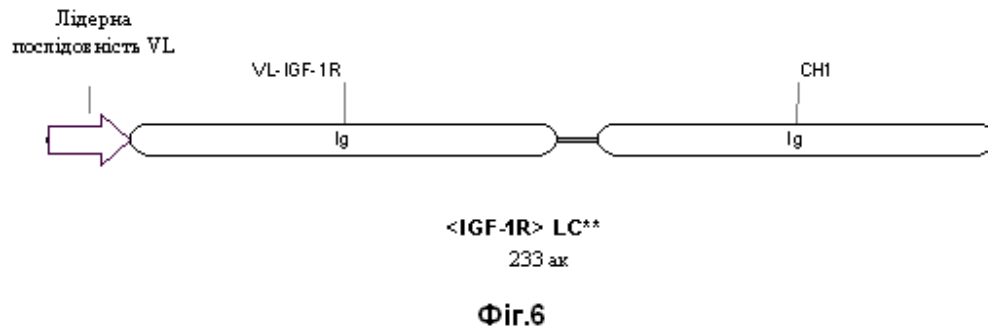
Фиг.3

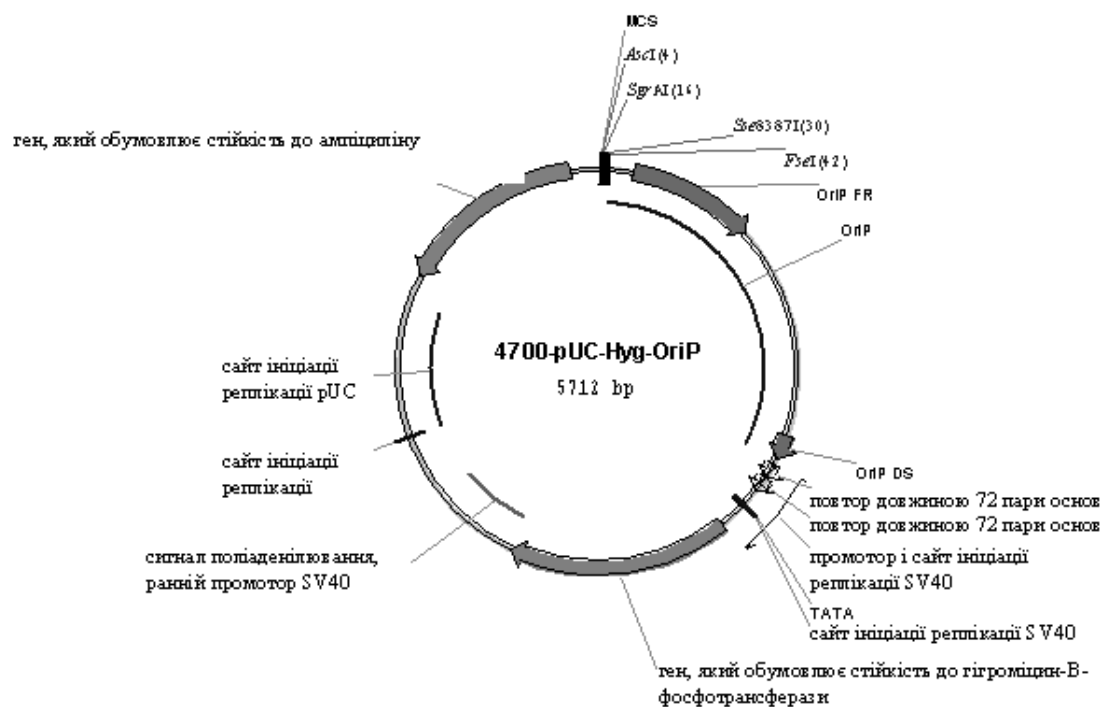


Фиг.4

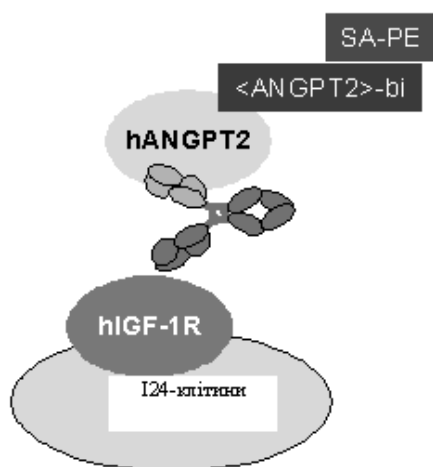


Фиг.5

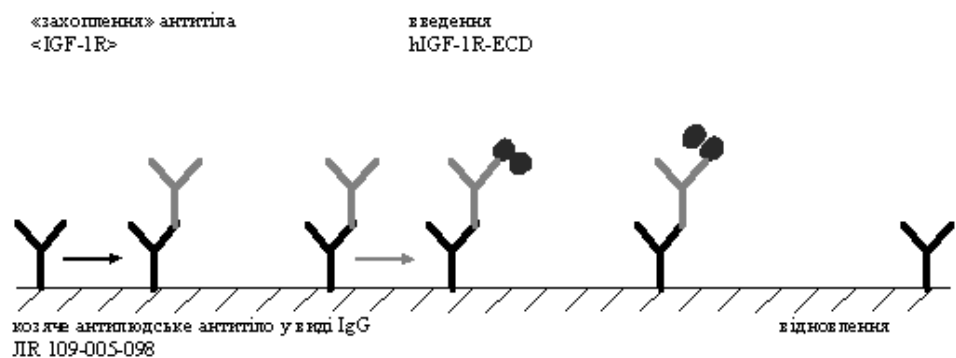




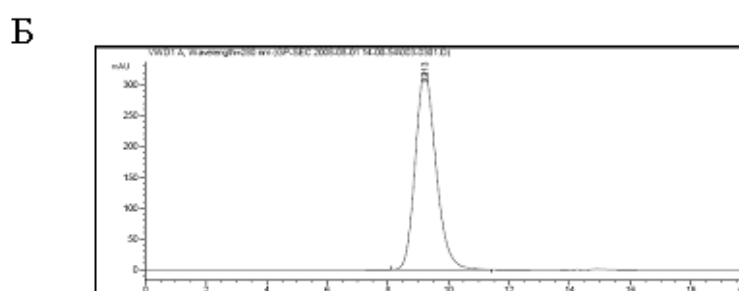
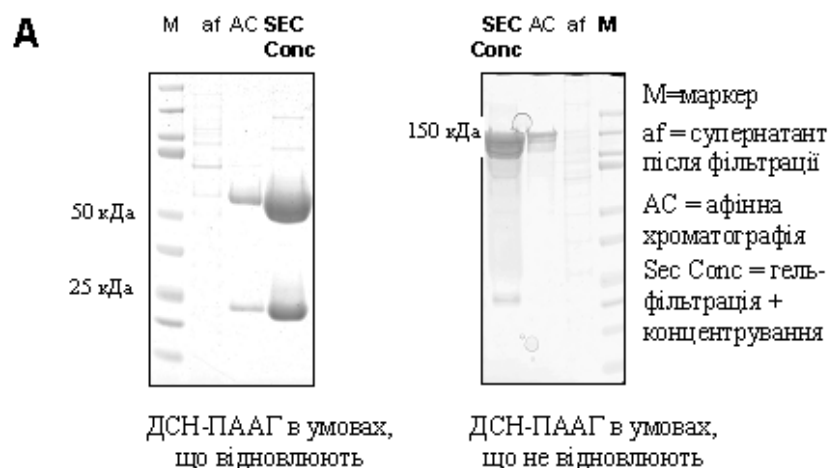
Фіг.9



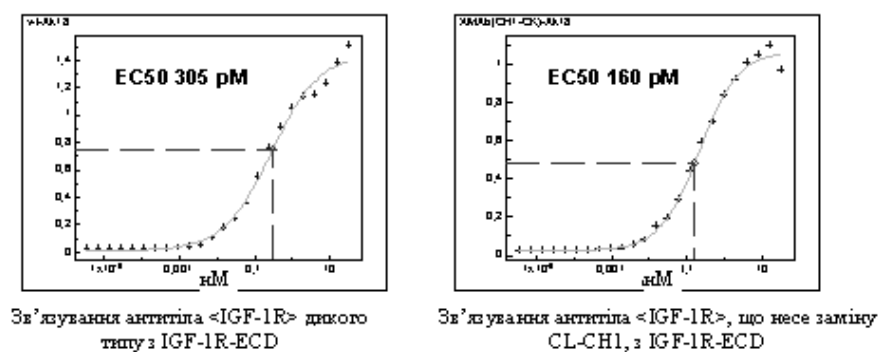
Фіг.10



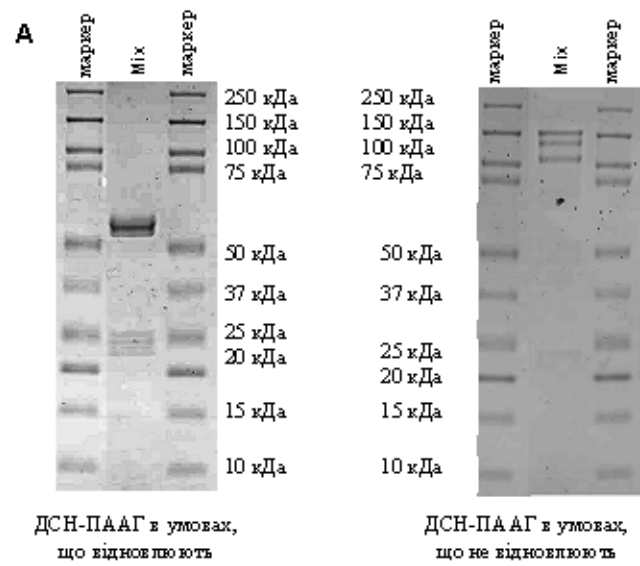
Фіг.11



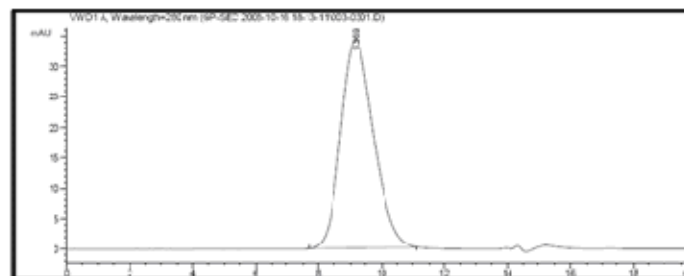
Фиг.12



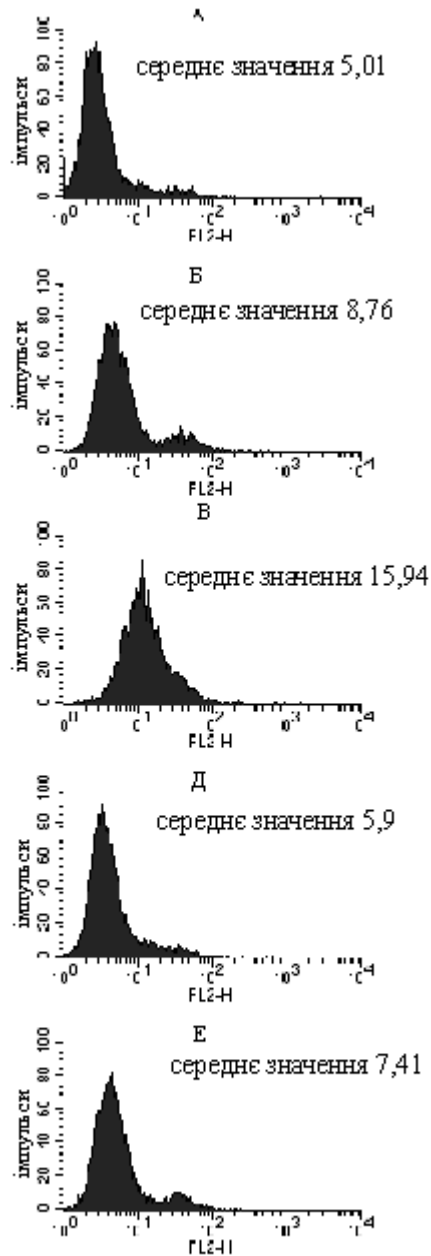
Фиг.13



B



Фиг.14



Фіг.15

Комп'ютерна верстка М. Ломалова

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

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