



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2020.03.17

(21) Номер заявки

201591113

(22) Дата подачи заявки

2013.12.10

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ АНТИГЕНА 2 ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК КРОВИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 61/735,362; 61/763,270

(32) 2012.12.10; 2013.02.11

(33) US

(43) 2015.09.30

(86) PCT/US2013/074208

(87) WO 2014/093396 2014.06.19

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
БАЙОДЖЕН МА ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

**Каравелла Джастин А., Гарбер
Эллен А., Рабах Даниа Мунир, Тэйлор
Фредерик Р. (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) DZIOANEK A. ET AL.: "BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction", THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS, US, vol. 194, no. 12, 17 December 2001 (2001-12-17), pages 1823-1834, XP002277387, ISSN: 0022-1007, DOI: 10.1084/JEM.194.12.1823, the whole document

DZIOANEK A. ET AL.: "BDCA-2, BDCA-3, AND BDCA-4: THREE MARKERS FOR DISTINCT SUBSETS OF DENDRITIC CELLS IN HUMAN PERIPHERAL BLOOD", IMMUNOLOGY, BLACKWELL PUBLISHING, OXFORD, GB, vol. 165, no. 11, 1 December 2000 (2000-12-01), pages 6037-6046, XP000986292, ISSN: 0019-2805, the whole document

JAHN P.S. ET AL.: "BDCA-2 signaling inhibits TLR-9-agonist-induced plasmacytoid dendritic cell activation and antigen presentation", CELLULAR IMMUNOLOGY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA,

US, vol. 265, no. 1, 1 January 2010 (2010-01-01), pages 15-22, XP027236570, ISSN: 0008-8749, [retrieved on 2010-07-06], the whole document

WO-A2-0136487

NESTLE F.O. ET AL.: "Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production", THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS, US, vol. 202, no. 1, 4 July 2005 (2005-07-04), pages 135-143, XP002364226, ISSN: 0022-1007, DOI: 10.1084/JEM.20050500, the whole document

BLOMBERG S. ET AL.: "Expression of the markers BDCA-2 and BDCA-4 and production of interferon-alpha by plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus", ARTHRITIS & RHEUMATISM, J.B. LIPPINCOTT CO, vol. 48, no. 9, 1 September 2003 (2003-09-01), pages 2524-32, XP002991721, ISSN: 0004-3591, DOI: 10.1002/ART.11225, the whole document

WU P. ET AL.: "TLR9/TLR7-triggered downregulation of BDCA2 expression on human plasmacytoid dendritic cells from healthy individuals and lupus patients", CLINICAL IMMUNOLOGY, ACADEMIC PRESS, US, vol. 129, no. 1, 1 October 2008 (2008-10-01), pages 40-48, XP025408487, ISSN: 1521-6616, DOI: 10.1016/J.CLIM.2008.06.004, [retrieved on 2008-08-05], the whole document

RIBOLDI E. ET AL.: "Engagement of BDCA-2 blocks TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells", IMMUNOBIOLOGY, URBAN UND FISCHER VERLAG, DE, vol. 214, no. 9-10, 1 September 2009 (2009-09-01), pages 868-876, XP026467210, ISSN: 0171-2985, DOI: 10.1016/J.IMBIO.2009.06.016, [retrieved on 2009-07-04], the whole document

WEI CAO ET AL.: "BDCA2/Fc γ 2B; RI[gamma] Complex Signals through a Novel BCR-Like Pathway in Human Plasmacytoid Dendritic Cells", PLOS BIOLOGY, vol. 100, no. 10, 1 January 2007 (2007-01-01), page 183, XP055105679, ISSN: 1091-6490, DOI: 1091-6490(2003)100[0183:INIHT]2.0.CO;2, the whole document

(57) Изобретение относится к антителу, которое связывается с BDCA2. Также описаны фармацевтическая композиция для лечения системной красной волчанки (СКВ), содержащая указанное антитело, и ее варианты. Кроме того, описаны способы применения и получения указанного антитела, а также нуклеиновая кислота, кодирующая антитело, вектор экспрессии и клетка-хозяин.

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки США № 61/735362, поданной 10 декабря 2012 года, и предварительной заявки США 61/763270, поданной 11 февраля 2013 года, содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Уровень изобретения

Антиген 2 дендритных клеток крови (BDCA2) представляет собой лектин С-типа, экспрессируемый на плазмацитоидных дендритных клетках человека (pDC) (Dzionic et al., *J. Immunol.*, 165:6037-6046(2000)), специализированной популяции клеток, происходящих из костного мозга, которые секретируют интерфероны I типа (ИФН) в ответ на лиганды Toll-подобных рецепторов (TLR). BDCA2 состоит из единственного внеклеточного домена распознавания углеводов (CRD), который относится к группе лектина С-типа II типа, расположенного на его С-конце в трансмембранной области, и из короткого цитоплазматического хвоста на его N-конце, который не несет сигнального мотива. BDCA2 передает внутриклеточные сигналы посредством ассоциированного трансмембранного адаптора FcεR1γ и индуцирует каскад сигналов, подобный В-клеточному рецептору (BCR).

Сущность изобретения

Изобретение основано, по меньшей мере отчасти, на идентификации и определении свойств антител, которые связываются с BDCA2. Такие антитела могут уменьшать или ингибировать секрецию воспалительных цитокинов и хемокинов. Антитела против BDCA2 по изобретению также способны истощать клетки pDC посредством антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) или комплемент-опосредованной цитотоксичности (CDC). Дополнительно антитела против BDCA2 по изобретению могут снижать уровни CD32a и/или CD62L на поверхности клеток pDC. Кроме того, антитела против BDCA2 по изобретению могут опосредовать интернализацию BDCA2 из клеточной поверхности pDC. По меньшей мере, этим обусловлена эффективность антител против BDCA2 по изобретению, для лечения или профилактики аутоиммунных и воспалительных заболеваний. В настоящем описании также показано, что антитела против BDCA2 по изобретению можно комбинировать с противомаларийным средством для улучшения эффектов.

В одном из аспектов изобретение относится к выделенному антителу, которое селективно связывается с эктодоменом BDCA2 человека (SEQ ID NO: 1) и конкурирует с В1В059 за связывание с внеклеточным доменом BDCA2 человека.

Антитело против BDCA2 конкурирует с В1В059 за связывание с BDCA2, если антитело против BDCA2 перед связыванием с BDCA2 полностью или частично ингибирует последующее связывание с В1В059 в BDCA2. Например, антитело против BDCA2 конкурирует с В1В059 за связывание с BDCA2, если антитело против BDCA2 перед связыванием с BDCA2 полностью ингибирует последующее связывание В1В059 с BDCA2. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело против BDCA2 перед связыванием с BDCA2 вызывает ингибирование последующего связывания В1В059 с BDCA2 по меньшей мере на 30, 50, 70, 80, 90, 95, 98 или на 99%.

В другом аспекте изобретение относится к выделенному антителу, которой селективно связывается с эктодоменом BDCA2 человека (SEQ ID NO: 1) и (i) ингибирует секрецию интерферонов I типа и/или интерферонов III типа в дополнение к другим цитокинам и хемокинам из плазмацитоидных дендритных клеток; или (ii) индуцирует или усиливает истощение плазмацитоидных дендритных клеток *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления антитело против BDCA2 подавляет CD32a и/или CD62L на поверхности pDC. В некоторых вариантах осуществления антитело против BDCA2 опосредует интернализацию BDCA2 с клеточной поверхности pDC. В некоторых вариантах осуществления указанное антитело связывается с BDCA2 обезьян циномолгус (SEQ ID NO: 72) и с BDCA2 резусов (SEQ ID NO: 72). В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело ингибирует секрецию или продукцию интерферона I типа, интерлейкина-6 (ИЛ-6), фактора некроза опухолей α (ФНО-α), интерферона III типа, макрофагального воспалительного белка-1 (MIP-1)-α/CCL3, MIP-1-β/CCL4, лиганда 5 хемокина (мотив С-С) (CCL5/RANTES) или белка-10, индуцируемого интерфероном γ (IP10/CXCL10).

В некоторых вариантах осуществления двух вышеуказанных аспектов выделенное антитело необязательно дополнительно содержит или состоит из одного, двух, трех, четырех, пяти или шести следующих признаков: EC₅₀ (BDCA2 человека) составляет от 0,5 до 3 мкг/мл или от 4 до 10 нМ; EC₅₀ (BDCA2 обезьян циномолгус) составляет от 0,5 до 3 мкг/мл или от 5 до 10 нМ; pI составляет от 7 до 7,5; не связывается с Clec4b2 крысы или связывается с Clec4b2 крысы с более низкой аффинностью связывания, чем с BDCA2 человека, макака резус или циномолгус; ингибирует продукцию или секрецию хемокинов, таких как (MIP-1)-α/CCL3, MIP-1-β/CCL4, CCL5/RANTES, IP10/CXCL10; имеет область, определяющую комплементарность (CDR), а именно CDR1 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи и CDR3 тяжелой цепи, при этом CDR1 тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9; CDR2 тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10; и CDR3 тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11; и вариативная тяжелая цепь содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело имеет EC₅₀ (BDCA2 человека), значение

которой составляет 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4 или 5,5 нМ. В конкретном варианте осуществления EC₅₀ (BDCA2 человека) выделенного антитела составляет 4,9 нМ. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело имеет EC₅₀ (BDCA2 циномоглуса), значение которой составляет 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9 или 5,0 нМ. В конкретном варианте осуществления выделенное антитело имеет EC₅₀ 4,4 нМ (BDCA2 циномоглуса). В некоторых вариантах осуществления этого аспекта указанное антитело имеет константную область тяжелой цепи и легкой цепи человека. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи содержит домен CH1 и шарнирную область. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи содержит домен CH3. Если константная область тяжелой цепи включает замены, такие замены модифицируют свойства антитела (например, увеличивают или уменьшают одно или несколько из следующих свойств: связывание с Fc-рецептором, гликозилирование антитела, число цистеиновых остатков, функцию эффекторных клеток или функцию комплемента). В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой IgG антитело. В конкретных вариантах осуществления антитело выбрано из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc область человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с EC₅₀ от 7 до 15 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc область человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с EC₅₀ 10 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc область человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с EC₅₀ 11 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc область человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с EC₅₀ 12 мкг/мл.

В другом аспекте изобретение относится к выделенному антителу, который селективно связывается с эктодоменом BDCA2 человека (SEQ ID NO: 1) и содержит CDR1 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи и CDR3 тяжелой цепи. CDR1 тяжелой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности GFTFSTYTMS (SEQ ID NO: 9). CDR2 тяжелой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности TISPGDSFGYYYPDSVQG (SEQ ID NO: 10). CDR3 тяжелой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности DIYYNYGAWFAY (SEQ ID NO: 11).

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело, специфично связывающееся с BDCA2 человека, имеет CDR1 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности GFTFSTYTMS (SEQ ID NO: 9); CDR2 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности TISPGDSFGYYYPDSVQG (SEQ ID NO: 10); и CDR3 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности DIYYNYGAWFAY (SEQ ID NO: 11). В других вариантах осуществления этого аспекта выделенное антитело имеет CDR1 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности GFTFSTYTMS (SEQ ID NO: 9); CDR2 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности TISPGDSFGYYYPDSVQG (SEQ ID NO: 10); и CDR3 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности DIYYNYGAWFAY (SEQ ID NO: 11). В других вариантах осуществления этого аспекта выделенное антитело содержит CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи. CDR1 легкой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности KASQSVVDYDGDSYMN (SEQ ID NO: 5). CDR2 легкой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности AASTLES (SEQ ID NO: 6). CDR3 легкой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности QQANEDPRT (SEQ ID NO: 7). В некоторых вариантах осуществления CDR1 легкой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности KASQSVVDYDGDSYMN (SEQ ID NO: 5); CDR2 легкой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности AASTLES (SEQ ID NO: 6); и CDR3 легкой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности QQANEDPRT (SEQ ID NO: 7). В других вариантах осуществления выделенное антитело имеет CDR1 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности GFTFSTYTMS (SEQ ID NO: 9); CDR2 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности TISPGDSFGYYYPDSVQG (SEQ ID NO: 10); CDR3 тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности DIYYNYGAWFAY (SEQ ID NO: 11); CDR1 легкой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности KASQSVVDYDGDSYMN (SEQ ID NO: 5); CDR2 легкой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности AASTLES (SEQ ID NO: 6); и CDR3 легкой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности QQANEDPRT (SEQ ID NO: 7).

В некоторых вариантах осуществления указанных выше аспектов антитело имеет константные области тяжелой цепи и легкой цепи человека. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи содержит домен CH1 и шарнирную область. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи содержит домен CH3. Если константная область тяжелой цепи включает замены, такие замены модифицируют свойства антитела (например, увеличивают или уменьшают одно или несколько из следующих свойств: связывание с Fc рецептором, гликозилирование антител, число цистеиновых остатков, функцию эффекторных клеток или функцию комплемента). В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG. В конкретных вариантах осуществления антитело выбрано из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc-область человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с EC₅₀ от 7 до 15

мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc-область человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с EC₅₀ 10 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc-область человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с EC₅₀ 11 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc-область человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с EC₅₀ 12 мкг/мл.

В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи содержит домен CH3. Если константная область тяжелой цепи включает замены, такие замены модифицируют свойства антитела (например, увеличивают или уменьшают одно или несколько следующих свойств: связывание с Fc рецептором, гликозилирование антитела, число цистеиновых остатков, функции эффекторных клеток или функции комплемента). В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой IgG антитело. В конкретных вариантах осуществления антитело выбрано из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc-область человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с EC₅₀ от 7 до 15 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc-область человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с EC₅₀ 10 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc-область человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с EC₅₀ 11 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc-область человека человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с EC₅₀ 12 мкг/мл.

В некоторых вариантах осуществления этого аспекта антитело содержит или состоит из домена VH, который по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности домена VH ВПВ059 (SEQ ID NO: 24). В других вариантах осуществления этого аспекта домен VH выделенного антитела идентичен аминокислотной последовательности домена VH ВПВ059 (SEQ ID NO: 24). В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления этого аспекта антитело содержит или состоит из домена VL, который по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности домена VL ВПВ059 (SEQ ID NO: 23). В некоторых вариантах осуществления этого аспекта антитело содержит или состоит из домена VH, который идентичен аминокислотной последовательности домена VH ВПВ059 (SEQ ID NO: 24). В конкретном варианте осуществления антитело содержит или состоит из тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, и легкой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3. Эти варианты осуществления относятся ко всем вышеуказанным аспектам и их вариантам. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой гуманизированное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело является одноцепочечным антителом. В других вариантах осуществления изобретения антитело представляет собой поликлональное антитело, химерное антитело, F_{ab}-фрагмент, F_{(ab)2}-фрагмент, F_{ab}-фрагмент, F_{sc}-фрагмент, F_v-фрагмент, scFv, sc(Fv)₂ или диатело. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело имеет константную область тяжелой цепи IgG1.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к выделенной клетке, которая продуцирует какое-либо из вышеописанных антител.

В других вариантах осуществления изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей какое-либо из вышеописанных антител, и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит какое-либо из вышеописанных антител или, созданных в виде композиции, которая содержит от 10 до 25 мМ цитрата, от 100 до 200 мМ хлорида натрия и имеет уровень pH 5,5-6,5. В некоторых вариантах фармацевтическая композиция дополнительно содержит Твин-80 (от 0,01 до 0,3%, например, 0,03%). В других вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит какое-либо из описанных выше антител, созданных в виде композиции, которая содержит 20 мМ цитрата натрия, 150 мМ хлорида натрия и имеет уровень pH 6,0.

В другом аспекте изобретение относится к способу получения антитела против BDCA2. Способ включает получение клетки, содержащей тяжелую цепь и/или легкую цепь антитела BDCA2, инкубацию этой клетки в условиях, которые позволяют экспрессию антитела, и выделение антитела. Способ дополнительно содержит очистку антитела. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку CHO. В других вариантах осуществления клетка представляет собой клетку 293. В конкретном варианте осуществления антитело против BDCA2 представляет собой ВПВ059. В одном из вариантов осуществления антитело против BDCA2 имеет тяжелую цепь и легкую цепь, при этом тяжелая цепь содержит или состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4, и легкая цепь содержит или состоит из последовательности SEQ ID NO: 3. В другом варианте антитело против BDCA2 содержит или состоит из CDR1 VH, содержащей или состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, CDR2 VH, содержащей или состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10, и CDR3 VH, содержащей или состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11. В другом варианте осуществления антитело против BDCA2 содержит или состоит из CDR1 VH, содержащей или состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, CDR2 VH, содержащей или состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10, CDR3 VH, содержащей или состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11, CDR1 VL, содержащей или состоящей из аминокис-

лотной последовательности SEQ ID NO: 5, CDR2 VL, содержащей или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6, и CDR3 VL, содержащей или состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7.

В дополнительном аспекте изобретение относится к способу лечения воспалительного заболевания у нуждающегося в этом индивида. Способ включает введение нуждающемуся в этом индивиду эффективного количества любого из описанных в изобретении антител против BDCA2. В некоторых вариантах осуществления воспалительное заболевание выбирают из группы, состоящей из системной красной волчанки (СКВ), кожной волчанки, дискоидной волчанки, волчаночного нефрита. В одном конкретном варианте осуществления воспалительным заболеванием является СКВ. В другом конкретном варианте осуществления воспалительным заболеванием является дискоидная волчанка. Еще в одном конкретном варианте осуществления воспалительным заболеванием является волчаночный нефрит. В другом конкретном варианте осуществления воспалительным заболеванием является кожная волчанка. В некоторых вариантах осуществления индивид имеет генерализованную СКВ. В некоторых вариантах осуществления индивид имеет СКВ умеренной степени тяжести. В некоторых вариантах осуществления индивид имеет умеренную СКВ без тяжелого активного вовлечения ЦНС и/или тяжелого активного вовлечения почек. В некоторых вариантах осуществления индивид имеет умеренную СКВ с тяжелым активным поражением ЦНС и/или тяжелым активным поражением почек. В некоторых вариантах осуществления индивид имеет кожные проявления СКВ (например, скуловую или дискоидную сыпь). В некоторых вариантах осуществления индивид страдает тяжелой формой СКВ. В некоторых вариантах осуществления индивид имеет тяжелую форму СКВ без серьезного активного поражения ЦНС и/или тяжелого активного поражения почек. В некоторых вариантах осуществления индивид страдает тяжелой формой СКВ с тяжелым активным поражением ЦНС и/или тяжелым активным поражением почек. Системная красная волчанка в средней или тяжелой форме являются стадиями развития этого заболевания (см., например, Руководство Guidelines for Referral and Management of Systemic Lupus Erythematosus in Adults, Arthritis & Rheumatism, 42(9): 1785-1795 (1999); Gladman, Prognosis and treatment of systemic lupus erythematosus, Curr. Opin. Rheumatol., 8:430-437 (1996); Kalunian et al., Definition, classification, activity and damage indices. В книге: Dubois' lupus erythematosus. 5th ed., Baltimore: Williams and Wilkins; стр. 19-30 (1997)).

В некоторых вариантах осуществления, в любом из относящихся к способам вышеуказанных аспектов, индивидом является человек. В некоторых вариантах осуществления, в любом из относящихся к способам вышеуказанных аспектов, антитело против BDCA2 вводят в комбинации по меньшей мере с одним из следующих средств: противомаларийное средство (например гидроксихлорохин), ингибитор сигнального пути TLR7, ингибитор сигнального пути TLR9 или кортикостероид. В конкретном варианте осуществления антитело против BDCA2 содержит области CDR тяжелой и легкой цепей В1В059. В одном из вариантов осуществления антитело против BDCA2 содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 8, 10 и 11, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 5, 6 и 7, соответственно. В конкретном варианте осуществления антитело против BDCA2 представляет собой В1В059.

В другом аспекте изобретение относится к комбинации, содержащей противомаларийное средство (например, гидроксихлорохин) и антитело против BDCA2. В конкретном варианте осуществления антитело против BDCA2 содержит области CDR тяжелых цепей SEQ ID NO: 24. В другом варианте антитело против BDCA2 содержит CDR легких цепей SEQ ID NO: 23. В конкретном варианте осуществления антитело против BDCA2 содержит области CDR тяжелых и легких цепей В1В059. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело против BDCA2 дополнительно содержит Fc-область, которая связывается с CD32a с EC₅₀ по меньшей мере приблизительно от 7 до 15 мкг/мл (например 9, 10, 11, 12, 13, 14 мкг/мл). В конкретном варианте осуществления антитело против BDCA2 представляет собой В1В059.

Если не указано иное, все технические и научные термины, как они используются в изобретении, имеют такие же значения, которые обычно понимаются рядовым специалистом в области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение. На практике или при тестировании настоящего изобретения могут быть использованы способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в изобретении, но при этом описанные ниже способы и материалы приведены в качестве примеров. Все указанные публикации, патентные заявки, патенты и другие ссылки включены в изобретение в качестве ссылки во всей их полноте. В случае противоречий приоритет остается за настоящей заявкой, включающей в себя определения. Материалы, способы и примеры являются исключительно иллюстративными и не предназначены для ограничения объема изобретения.

Другие признаки и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из следующего подробного описания и из формулы изобретения.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 схематически изображает сигнальный путь BDCA2 в плазмоцитоидных дендритных клетках (см. Geijtenbeek et al., Nature Reviews Immunology, 9:465-479 (2009));

фиг. 2 представляет диаграмму, показывающую связывание вариантов hu24F4 Hx/L1 с BDCA2 человека;

фиг. 3 - диаграмму, показывающую связывание вариантов hu24F4 Hx/L1 с BDCA2 обезьян цино-могус;

фиг. 4 представляет собой схематическую карту плазмиды рJP009, которая кодирует легкую цепь анти-BDCA2. Последовательность нуклеиновых кислот легкой цепи анти-BDCA2 находится под транскрипционным контролем промотора HCMV IE и последовательностей полиаденилирования hGH. Ген аминогликозид-фосфотрансферазы (устойчивости к неомицину) находится под транскрипционным контролем промотора фосфоглицеринкиназы мыши (muPGK) и последовательностей полиаденилирования. Остальные последовательности, включающие ген бета-лактамазы, предназначены для размножения и селекции в *E.coli*;

фиг. 5 - схематическую карту плазмиды рJP010, которая кодирует тяжелую цепь анти-BDCA2. Последовательность нуклеиновых кислот тяжелой цепи анти-BDCA2 находится под транскрипционным контролем промотора HCMV IE и последовательностей полиаденилирования роста человека hGH. Ген дигидрофолатредуктазы (DHFR) находится под транскрипционным контролем промотора SV40E и последовательностей полиаденилирования. Остальные последовательности, включающие в себя ген бета-лактамазы, предназначены для размножения и селекции в *E.coli*;

фиг. 6 - линейную диаграмму, показывающую связывание ВПВ059 на плазмитоидных дендритных клетках обезьяны циномогус (А) и человека (В). Цельную кровь обезьяны циномогус (А) или человека (В) инкубировали на льду с разными концентрациями антитела ВПВ059, меченного красителем Alexa647 (кружки) или человеческим изотипом IgG (квадраты). Данные были получены с использованием устройства LSRII-4 для цветной сортировки клеток с возбуждением флуоресценции (FACS), и проанализированы с помощью программного обеспечения FlowJo и GraphPad Prism;

фиг. 7 - диаграмму, показывающую результаты анализа самоассоциации AlphaScreen. Обозначения: ромб - ВПВ059, квадрат - 5с8 и треугольник - LT105;

фиг. 8 - диаграмму, показывающую результаты дифференциальной сканирующей флуорометрии по тестированию устойчивости ВПВ059 в разных условиях. Эта диаграмма показывает данные при 150 мМ хлорида натрия и 250 мМ сахарозы в зависимости от уровня pH;

фиг. 9 - диаграмму, показывающую влияние перемешивания в течение продолжительного времени на агрегацию. Агрегацию подавляли путем добавления Твин 80;

фиг. 10 - диаграмму, показывающую прямое связывание AC144 с поверхностным BDCA2 человека и обезьяны циномогус;

фиг. 11 - серию диаграмм, показывающих результаты гель-хроматографического анализа слитых белков Fc;

фиг. 12 - диаграмму, показывающую влияние кальция на связывание ВПВ059 с BDCA2. Связывание ВПВ059 с BDCA2 усиливается путем добавления кальция, что дает сигнал, который примерно в 2 раза выше по сравнению с ЭДТА;

фиг. 13 - диаграмму, показывающую результаты ОСТЕТ-связывания ВПВ059 с эктодоменами BDCA2 человека и обезьяны циномогус;

фиг. 14 - диаграмму, показывающую, что ВПВ059 мощно ингибирует ИФНа мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), стимулированных агонистом TLR9. Каждый символ представляет показатель половины ингибирующей концентрации (IC_{50}) из независимого эксперимента, вертикальные линии отображают стандартную ошибку средней величины (SEM);

фиг. 15 А-С - серию диаграмм, показывающих, что ВПВ059 мощно ингибирует цитокины и хемокины цельной крови, стимулированной лигандом TLR9. фиг. 15А показывает ингибирование ИФНа с использованием гепаринизированной венозной крови здоровых доноров. фиг. 15В показывает ингибирование ИФНа с использованием цельной крови двух больных СКВ (верхние диаграммы) по сравнению с результатами использования цельной крови 2 здоровых доноров (нижние диаграммы). фиг. 15С представляет ряд гистограмм, показывающих, что лечение ВПВ059 приводит к ингибированию большого массива цитокинов и хемокинов;

фиг. 16 - гистограмму, показывающую, что ВПВ059 ингибирует экспрессию интерферона I типа;

фиг. 17 включает две линейных диаграммы, показывающих, что лигирование BDCA2 с ВПВ059 ингибирует TLR9-индуцированную продукцию цитокинов в очищенных клетках рDC;

фиг. 18 представляет собой гистограмму, показывающую, что лигирование BDCA2 подавляет продукцию выработки ИФНа при СКВ в сыворотке крови, стимулированной плазмитоидными дендритными клетками;

фиг. 19А - диаграмму, показывающую интернализацию BDCA2 после лигирования с ВПВ059. фиг. 19В представляет собой линейную диаграмму, показывающую, что интернализация не влияет на продукцию ИФНа, которая опосредована ингибированием ВПВ059;

фиг. 20 - серию диаграмм, показывающих связывание ВПВ059 с рецепторами Fcγ;

фиг. 21 представляет результаты C1q ELISA, где показано связывание C1q человека с покрытым антителом в возрастающих концентрациях (от 0 до 15 мкг/мл);

фиг. 22А-Д представляют собой серию диаграмм, показывающих, что ВПВ059 опосредует уничтожение клеток посредством ADCC. В качестве мишеней использовали клеточную линию CHO (клон 34.16.7 EAG2456 T1F2). Уровень экспрессии BDCA2 на поверхности клеток CHO определяли с помощью FACS с использованием APC-меченного анти-BDCA2 моноклонального антитела (МКА) (клон AC144,

Miltenyi). В качестве эффекторных клеток использовали клетки-натуральные киллеры (НК-клетки). Оценку ADCC проводили с помощью набора для анализа цитотоксичности Vybrant (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя. В анализе выявляют глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу Г-6-ФД поврежденных клеток, на основе Г-6-ФД-зависимого восстановления резазурина, который после возбуждения при 530 нм, излучает флуоресценцию при 590 нм. Анализ ADCC, представленный на фиг. 22А, проводили с использованием клеток CHO с высокой экспрессией BDCA2 (фиг. 22С), а в анализе ADCC, представленном на фиг. 22В, использовали клетки CHO с более низкой экспрессией BDCA2 (фиг. 22D);

фиг. 23 - диаграмму, показывающую, что ВІВ059 опосредует уничтожение клеток посредством CDC. Клетки CHO (клон 34.16.7 EAG2456 T1F2) высевали в количестве 5×10^4 клеток в 96-луночные коллагеновые планшеты с черными лунками и инкубировали при 37°C в течение 48 ч. Затем планшеты промывали и инкубировали с комплементом кроличьей сыворотки и пропидиййодидом (PI) в течение 1 ч при 37°C в присутствии эффекторных компетентных анти-BDCA2 моноклональных антител (24F4S и ВІВ059), моноклональных антител с дефицитом эффекторной функции (24F4S-Agly и 24F4A-Agly) или контрольного изотипа IgG1. Отрицательный контроль состоял из лунок, содержащих клетки CHO, комплемент кроличьей сыворотки и PI, при отсутствии антител;

фиг. 24 - серию диаграмм, используемых для определения EC_{50} при связывании ВІВ059 ("прямом связывании") и конкурентном связывании ВІВ059- $\alpha 647$ ("непрямым") на плазмоцитойдных дендритных клетках обезьян циномоглус. Перед инъекцией ВІВ059 *in vivo* у двенадцати обезьян циномоглус забирали кровь один раз в неделю в течение всего трех недель. Применяли проточную цитометрию для определения EC_{50} при связывании ВІВ059 с BDCA2 на поверхности клеток рDC ("прямой" способ), и определяли количество BDCA2 рецептора, доступного в присутствии ВІВ059 ("непрямой" способ). Кровь инкубировали с шестикратным титрованием ВІВ059 в диапазоне от 40 до 0,04 мкг/мл. Клетки рDC идентифицировали с помощью проточной цитометрии как CD20-CD14-CD123+HLA-DR+, и обрабатывали или вторичным анти-человеческим IgG, меченным фикоэритрином (PE), или меченным ВІВ059- $\alpha 647$, в концентрации 10 мкг/мл. Среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) PE (незакрашенные обозначения, графически на левой оси ординат) или A647 (закрашенные обозначения, графически на правой оси ординат) рассчитывали с помощью программного обеспечения FlowJo и графически отображали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism (четырёх-параметрическая кривая нелинейной регрессионной аппроксимации логарифмически преобразованных данных). В изобретении показаны репрезентативные диаграммы от четырех из двенадцати обезьян циномоглус;

фиг. 25 - репрезентативную диаграмму, показывающую плато связывания антитела против BDCA2 ВІВ059 с BDCA2 на клеточной поверхности рDC в цельной крови обезьян циномоглус. Кровь инкубировали с шестикратным титрованием ВІВ059 в диапазоне от 40 до 0,04 мкг/мл. Клетки рDC идентифицировали с помощью проточной цитометрии как CD20-CD14-CD123+HLA-DR+, и обрабатывали вторичным анти-IgG человека, меченным фикоэритрином (PE). Определяли среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) PE и рассчитывали процент максимального связывания, используя значение в точке 40 мкг/мл как 100%. Каждая строка представляет данные от одной отдельной обезьяны циномоглус, в общей сложности использовали двенадцать обезьян циномоглус, и полученные данные графически отображали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism (четырёх-параметрическая кривая нелинейной регрессионной аппроксимации логарифмически преобразованных данных). Окрашивание повторяли один раз в неделю всего в течение трех недель. Пунктирные линии показывают, что при концентрации ВІВ059 10 мкг/мл связывание с рецептором BDCA2 было насыщенным у всех обезьян циномоглус;

фиг. 26А-С - окрашивания связанного ВІВ059 и свободного BDCA2 у обезьян циномоглус, которым вводили носитель. фиг. 26А представляет собой серию гистограмм FACS, показывающих исходное окрашивание PE у обезьян циномоглус после введения носителя. Обезьянам циномоглус № 1, 4 и 12 делали однократную внутривенную (в/в) инъекцию контрольного носителя (цитрат натрия) в точке времени 0. Через 1 ч забирали цельную кровь и с помощью проточной цитометрии определяли рDC, как CD20-CD14-CD123+HLA-DR+, после чего обрабатывали их античеловеческим IgG PE (незаштрихованные гистограммы) или FACS-буфером в качестве контроля PE-флуоресценции минус один (FMO) (заштрихованные гистограммы). Фиг. 26В представляет диаграмму PE-окрашивания рDC крови, полученной от трех обезьян циномоглус после введения носителя в указанные точки времени. Рассчитывали MFI от PE с помощью программного обеспечения FlowJo, и графически отображали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. фиг. 26С представляет диаграмму окрашивания A647 клеток рDC крови обезьян циномоглус после введения носителя в указанные точки времени. В образцы крови обезьян циномоглус после введения носителя в указанные точки времени добавляли ВІВ059-A647 в количестве 10 мкг/мл, и анализировали клетки рDC на A647-окрашивание. Рассчитывали MFI от PE с помощью программного обеспечения FlowJo, и графически отображали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism;

фиг. 27А-С показывают, что связанные ВІВ059 и рецептор BDCA2 становятся недоступными на поверхности клеток рDC обезьян циномоглус после однократного введения 10 мг/кг ВІВ059. фиг. 27А представляет собой серию гистограмм FACS, показывающих окрашивание ВІВ059 у обезьян циномоглус после введения 10 мг/кг ВІВ059. Обезьянам циномоглус № 3, 8 и 10 делали однократную в/в инъек-

цию ВПВ059 в дозе 10 мг/кг в точке времени 0. Через 1 ч проводили забор цельной крови и клетки рDC идентифицировали как CD20-CD14-CD123+HLA-DR+, после чего их обрабатывали анти-человеческим IgG PE (незаштрихованные гистограммы) или FACS-буфером в качестве PE-FMO контроля (заштрихованные гистограммы). фиг. 27В представляет собой диаграмму PE-окрашивания клеток рDC крови, полученной от трех обезьян циномогус после введения ВПВ059 в указанные точки времени. Рассчитывали MFI от PE с помощью программного обеспечения FlowJo, и графически отображали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. фиг. 27С представляет диаграмму А647-окрашивания клеток рDC крови, полученной от трех обезьян циномогус после введения ВПВ059 в указанные точки времени. ВПВ059-α647 в количестве 10 мкг/мл добавляли к крови, полученной от трех обезьян циномогус после введения ВПВ059 в каждой из указанных точек времени, и анализировали А647-окрашивание на клетках рDC. Рассчитывали MFI от PE с помощью программного обеспечения FlowJo, и графически отображали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism;

фиг. 28А-С показывают, что связанные ВПВ059 и рецептор BDCA2 становятся недоступными на поверхности клеток рDC после однократного введения 1 мг/кг ВПВ059 обезьянам циномогус. Фиг. 28А представляет серию гистограмм FACS, показывающих окрашивание ВПВ059 у обезьян циномогус после введения 1 мг/кг ВПВ059. Обезьянам циномогус № 3, 8 и 10 делали однократную в/в инъекцию ВПВ059 в дозе 1 мг/кг в точке времени 0. Через 1 ч проводили забор цельной крови, идентифицировали клетки рDC как CD20-CD14-CD123+HLA-DR+, после чего их обрабатывали античеловеческим IgG PE (незаштрихованные гистограммы) или FACS-буфером в качестве PE-FMO контроля (заштрихованные гистограммы). Фиг. 28В представляет диаграмму PE-окрашивания клеток рDC крови, полученной от трех обезьян циномогус после введения ВПВ059 в указанные точки времени. Рассчитывали MFI от PE с помощью программного обеспечения FlowJo, и графически отображали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. Фиг. 28С представляет диаграмму окрашивания А647 клеток рDC крови, полученной от обезьян циномогус, которым вводили ВПВ059 в указанные точки времени. ВПВ059-α647 в количестве 10 мкг/мл добавляли в кровь, полученную от трех обезьян циномогус после введения ВПВ059 в каждой из указанных точек времени, и анализировали А647-окрашивание на клетках рDC. Рассчитывали MFI от PE с помощью программного обеспечения FlowJo, и графически отображали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism;

фиг. 29А-С показывают, что связанные ВПВ059 и рецептор BDCA2 становятся недоступными на поверхности клеток рDC после однократного подкожного (п/к) введения дозы 0,2 мг/кг ВПВ059 обезьянам циномогус. Фиг. 29А представляет серию гистограмм FACS, показывающих окрашивание ВПВ059 при п/к введении обезьянам циномогус 0,2 мг/кг ВПВ059. Обезьянам циномогус № 4, 6 и 12 делали однократную подкожную инъекцию ВПВ059 в дозе 0,2 мг/кг в точке времени 0. Через 1 ч проводили забор цельной крови, идентифицировали клетки рDC как CD20-CD14-CD123+HLA-DR+, и обрабатывали их анти-человеческим IgG PE (незаштрихованные гистограммы) или FACS-буфером в качестве PE-FMO контроля (заштрихованные гистограммы). Фиг. 29В представляет диаграмму PE-окрашивания на клетках рDC крови, полученной от трех обезьян циномогус после введения ВПВ059 в указанные точки времени. Рассчитывали MFI от PE с помощью программного обеспечения FlowJo, и графически отображали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. Фиг. 29С представляет диаграмму А647-окрашивания на клетках рDC крови, полученной от трех обезьян циномогус после введения ВПВ059 в указанные точки времени. ВПВ059-А647 в количестве 10 мкг/мл добавляли в кровь, полученную от трех обезьян циномогус после введения ВПВ059 в каждой их указанных точек времени, и анализировали А647-окрашивание на клетках рDC. Рассчитывали MFI от PE с помощью программного обеспечения FlowJo, и графически отображали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism;

фиг. 30 - серию диаграмм, показывающих наблюдаемые фармакокинетические/фармакодинамические (ФК/ФД) корреляции у обезьян циномогус, которым в/в вводили ВПВ059 в дозе 1 мг/кг, и у обезьян циномогус, которым в/в вводили ВПВ059 в дозе 10 мг/кг. В каждой диаграмме на этой фигуре концентрация сывороточного ВПВ059 показана на левой оси ординат (незакрашенные обозначения), и плотность BDCA2-рецептора показана на правой оси ординат (закрашенные обозначения). Ускоренный клиренс был выявлен у обезьяны циномогус № 5, вероятнее всего, по причине иммуногенности к ВПВ059;

фиг. 31 - серию диаграмм, показывающих наблюдаемые ФК/ФД корреляции у обезьян циномогус, которым вводили ВПВ059 п/к в дозе 0,2 мг/кг. В каждой диаграмме на этой фигуре концентрация сывороточного ВПВ059 показана на левой оси ординат (незакрашенные обозначения), и плотность BDCA2-рецептора показана на правой оси ординат (закрашенные обозначения);

фиг. 32 - серию столбчатых гистограмм, показывающих результаты анализов ELISA или мультиплексных анализов для измерения концентрации воспалительных цитокинов и хемокинов, продуцируемых клетками рDC, которые обработаны CpG-A, CpG-A в присутствии анти-BDCA2, и CpG-A в присутствии контрольного изотипа. Каждый столбец представляет собой среднее значение и стандартное отклонение (SD) для дублированных лунок от репрезентативного здорового донора-человека из 5 испытуемых. Вертикальные линии обозначают SD;

фиг. 33 - серию столбчатых гистограмм, показывающих результаты анализов ELISA или мультип-

лексных анализов для измерения концентрации воспалительных цитокинов и хемокинов, продуцируемых клетками pDC, которые были обработаны иммунными комплексами Sm/RNP, иммунными комплексами Sm/RNP в присутствии анти-BDCA2 и иммунными комплексами Sm/RNP в присутствии контрольного изотипа. Каждый столбец представляет собой среднее значение и стандартное отклонение (SD) для дублированных лунок от репрезентативного здорового донора-человека из 5 испытуемых. Вертикальные линии обозначают SD;

фиг. 34 - серию столбчатых гистограмм, показывающих результаты анализов количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР) для определения эффекта ВПВ059 на транскрипцию подтипов ИФН I типа в клетках pDC, стимулированных иммунным комплексом (IC) Sm/RNP, у здоровых доноров. Каждый столбец представляет собой среднее относительное кратное изменение с повторами в четырех лунках от репрезентативного донора из 3 испытуемых (n=3), и вертикальные линии обозначают стандартное отклонение (SD);

фиг. 35А показывает ВПВ059-опосредованное дозозависимое ингибирование ИФН α , индуцированное TLR9, посредством PVMC от одного репрезентативного здорового донора-человека из 18 испытуемых. Каждое обозначение представляет собой среднее и стандартное отклонение (SD) для дубликатов лунок. Фиг. 35В показывает ВПВ059-опосредованное дозозависимое ингибирование ИФН α , индуцированное TLR9, посредством PVMC от одного репрезентативного больного СКВ из 11 испытуемых. Каждое обозначение представляет среднее и стандартное отклонение (SD) для дубликатов лунок. Фиг. 35С показывает IC₅₀ для ингибирования с помощью ВПВ059 TLR9-индуцированной продукции ИФН α посредством PVMC у здоровых доноров (ЗД) по сравнению с больными СКВ (СКВ). Каждое обозначение относится к отдельному донору, вертикальные линии обозначают SD;

фиг. 36А - ВПВ059-опосредованное дозозависимое ингибирование TLR9-индуцированного ИФН α одного репрезентативного анализа цельной крови от 12 испытуемых. Каждое обозначение представляет собой среднее и стандартное отклонение (SD) для дубликатов лунок. Фиг. 36В показывает IC₅₀ для ингибирования с помощью ВПВ059 TLR9-индуцированной продукции ИФН α в анализах цельной крови по сравнению с анализами PVMC. Каждое обозначение относится к отдельному донору, вертикальные линии обозначают SD;

фиг. 37. PVMC от здоровых доноров-людей были стимулированы с помощью 1 мкМ лиганда TLR3 (Poly I:C) и обработаны ВПВ059 в концентрациях в диапазоне от 10 мкг/мл до 0,5 нг/мл в общем анализируемом объеме 250 мкл на лунку в 96-луночном планшете. Планшеты инкубировали в течение ночи (18 часов) при температуре 37°C и 5% CO₂. 200 мкл супернатанта собирали для оценки уровней ИФН α с помощью анализа ELISA. Каждое обозначение представляет средние уровни ИФН α , полученные при каждом условии обработки. Показаны данные от двух независимых доноров. Вертикальные линии обозначают стандартное отклонение (SD);

фиг. 38А показывает дозозависимую ВПВ059-опосредованную интернализацию BDCA2 от репрезентативного здорового донора-человека. Кружки обозначают MFI при 2D6-окрашивании, и при разных дозах ВПВ059. Треугольник обозначает MFI от 2D6 в присутствии контрольного изотипа (максимальное окрашивание). Ромб обозначает MFI контроля FMO (фоновое окрашивание). Фиг. 38В показывает значения EC₅₀ от ВПВ059-индуцированной интернализации BDCA2 на клетках pDC в анализах цельной крови у здоровых доноров-людей (закрашенные кружки; n=10 доноров). Среднее значение EC₅₀ составляет 0,017±0,005 мкг/мл;

фиг. 39 представляет собой графическое изображение значений средней интенсивности флуоресценции (MFI) при 2D6-FITC окрашивании клеток pDC CD14-CD20-HLA-DR+CD123+, дающих сигнал выше порогового значения. Изотип (iso) демонстрирует максимальное окрашивание, FMO (контроль-флуоресценция минус один) состоит из коктейля FACS окрашивания минус 2D6-FITC, что представляет фоновое окрашивание. На этой фигуре показан репрезентативный эксперимент от 4 выполненных независимых экспериментов;

фиг. 40 - конфокальные изображения человеческих pDC, очищенных из периферической крови, и затем инкубированных с 10 мкг/мл ВПВ059-AF647 (показано белым) при 4°C (слева) или при 37°C в 5% CO₂ (справа) в течение 15 мин. Распределение клеток ВПВ059 оценивали с помощью конфокальной микроскопии, и репрезентативное изображение показано для каждого условия;

фиг. 41 представляет собой графическое изображение эффекта интернализации BDCA2 на ингибирование продукции ИФН α . Эта фигура является репрезентативным изображением 3 независимых экспериментов;

фиг. 42 - графическое изображение, показывающее, что значения EC₅₀ ВПВ059-опосредованной интернализации BDCA2 коррелируют с показателями IC₅₀ ВПВ059-опосредованного ингибирования TLR9-индуцированного ИФН α в анализах цельной крови (n=10). Значение R2 составляет 0,57;

фиг. 43А показывает результаты, выраженные в виде среднего и стандартного отклонения (SD) коэффициентов колокализации Мандерса для локализации TLR9 в компартменте LAMP1+. Фиг. 43В показывает результаты, выраженные в виде среднего отклонения и SD коэффициентов колокализации Мандерса для локализации ВПВ059/BDCA2 в компартменте TLR9+. Фиг. 43С показывает результаты, выраженные в виде среднего отклонения и SD коэффициентов колокализации Мандерса для локализации

ВІВ059/BDCA2 в компартменте LAMP1+. Каждое обозначение представляет отдельную клетку; горизонтальные линии представляют среднее отклонение, вертикальные линии представляют SD;

фиг. 44А представляет собой гистограмму репрезентативного эксперимента с цельной кровью, обработанной 10 мкг/мл ВІВ059 (заштрихованная гистограмма), 10 мкг/мл контрольного изотипа (пунктирная линия) или с цельной кровью, стимулированной лигандом TLR9, CpG-(сплошная линия). Фиг. 44В представляет собой графическое изображение эффекта обработки ВІВ059 цельной крови, что вызывает шеддинг CD62L (закрашенные квадраты). Незакрашенный квадрат обозначает обработку изотипом (10 мкг/мл). Эта фигура является репрезентативной для 3 независимых экспериментов;

фиг. 45 - графическое изображение поверхностной экспрессии CD62L, анализированной с помощью проточной цитометрии. Экспрессию CD62L измеряли в присутствии ВІВ059 единственного, и в присутствии GM6001 в возрастающих концентрациях (обозначено кружками). Незаштрихованный квадрат обозначает обработку изотипом в качестве контроля (10 мкг/мл). Перевернутый треугольник обозначает ВІВ059, обработанные контрольным ДМСО. Эта фигура является репрезентативной для 2 независимых экспериментов;

фиг. 46А представляет собой графическое изображение ВІВ059 и 24F4A-Agly-опосредованной дозозависимой интернализации BDCA2 на поверхности клеток рDC одного репрезентативного здорового донора-человека (n=5). Клетки рDC от здоровых доноров-людей выделяли с использованием технологии двухэтапного разделения магнитными шариками (набор MACS, Miltenyi Biotec). Клетки рDC обрабатывали ВІВ059 в возрастающих концентрациях (обозначено кружками) или антителом 24F4-Agly в агликозилированной форме (обозначено квадратами). Клетки также обрабатывали 10 мкг/мл контрольного изотипа (обозначено треугольником) и инкубировали в течение 16 ч при 37°C. Затем рDC окрашивали на поверхностную экспрессию BDCA2 и CD32. Фиг. 46В является гистограммой, показывающей уровни CD32 на выделенных рDC, которые были обработаны 10 мкг/мл ВІВ059 (заштриховано) или контрольным изотипом (обозначено пунктиром) (n=5). Фиг. 46С является гистограммой, показывающей уровни CD32 на выделенных рDC, которые были обработаны агликозилированной формой 24F4-A в дозе 10 мкг/мл (заштриховано) или контрольным изотипом (обозначено пунктиром). Сплошная линия относится к неокрашенным клеткам (n=5). Фиг. 46D представляет собой графическое изображение ВІВ059-опосредованной дозозависимой понижающей модуляции CD32 на поверхности клеток рDC от одного репрезентативного здорового донора-человека (n=5). Фиг. 46Е является гистограммой, показывающей уровни CD32 на выделенных рDC, обработанных в течение 1 ч при 4°C в присутствии 10 мкг/мл ВІВ059 (заштриховано), агликозилированной формы (обозначено пунктиром) или контрольного изотипа (обозначено точками). После инкубации проводили оценку рDC на поверхностную экспрессию CD32. Сплошная черная линия относится к неокрашенным клеткам (n=3). Фиг. 46F является гистограммой, показывающей уровни CD32 на выделенных рDC, обработанных в течение 1 ч при 37°C в присутствии 10 мкг/мл ВІВ059 (заштриховано), агликозилированной формы (обозначено пунктиром) или контрольного изотипа (обозначено точками). После инкубации проводили оценку рDC на поверхностную экспрессию CD32. Сплошная черная линия относится к неокрашенным клеткам (n=3);

фиг. 47А - графическое изображение уровней ИФНа из выделенных рDC, которые были обработаны ВІВ059 в возрастающих концентрациях (квадраты), агликозилированной формой антитела 24F4-A в возрастающих концентрациях (кружки), или контрольным изотипом в количестве 10 мкг/мл (треугольники). Клетки рDC стимулировали в присутствии CpG-A (75 мкг/мл) или оставляли без стимуляции (перевернутый треугольник). Клетки рDC инкубировали в течение 16 ч при 37°C, собирали супернатанты и анализировали на ИФНа с помощью ELISA. Показан репрезентативный эксперимент из 2 выполненных анализов. Фиг. 47В представляет графическое изображение уровней ИФНа в выделенных рDC после их обработки ВІВ059 в возрастающих концентрациях (квадраты), агликозилированной формой антитела 24F4-A в возрастающих концентрациях (кружки), контрольным изотипом в количестве 10 мкг/мл (треугольники) или анти-CD32 человеческим мАт (моноклональным антителом) в количестве 10 мкг/мл. Предварительно получали иммунные комплексы (IC) Sm/RNP путем смешивания SM-RNP из тимуса теленка и анти-RNP антител, очищенных из сыворотки больных СКВ, в течение 30 мин в бессывороточной среде. Выделенные клетки стимулировали иммунными комплексами или обрабатывали только антигеном (без стимуляции). Клетки инкубировали в течение 16 ч при 37°C, собирали супернатанты и анализировали на ИФНа с помощью ELISA. На фигуре показан репрезентативный анализ из 3 проведенных анализов. Каждое обозначение представляет собой среднее и стандартное отклонение (SD) для дубликатов лунок;

фиг. 48А - столбчатую гистограмму, показывающую экспрессию CD32 на выделенных рDC, которые обработали иммунными комплексами в присутствии 10 мкг/мл ВІВ059, 24F4-A, анти-CD32 мАт (клон АТ10), гуманизированным анти-CD40-антителом или контрольным изотипом. Клетки инкубировали в течение 16 ч при 37°C. рDC окрашивали на поверхностную экспрессию CD32 и CD40. Фиг. 48В представляет столбчатую гистограмму, на которой показаны уровни ИФНа, измеренные с помощью ELISA в супернатантах, собранных в А. Показано репрезентативное изображение (n=3). Фиг. 48С представляет гистограмму, показывающую экспрессию CD40 на поверхности рDC. Пунктирная линия обозначает экспрессию CD40 на поверхности клеток. Заштрихованная гистограмма представляет уровни CD40

на pDC после обработки анти-CD40-антителом. Сплошная линия относится к неокрашенным клеткам;

фиг. 49 показывает влияние гидроксихлорохина (HCQ) на потенциал ВПВ059. Каждое обозначение представляет концентрации ИФНа, измеренные у отдельных здоровых доноров-людей, вертикальные линии обозначают SD. Клетки РВМС от здоровых доноров были обработаны ВПВ059 единственным в разных концентрациях, HCQ единственным или комбинацией (ВПВ059+ HCQ), при общем анализируемом объеме 250 мкг на лунку. Концентрации ВПВ059 варьировались от 10 мкг/мл до 0,1 нг/мл. Концентрации HCQ варьировались от 10 мкМ до 156 нМ. Клетки РВМС в количестве 1×10^6 на лунку стимулировали 5 мкМ лиганда TLR7 (R848). Планшеты, содержащие РВМС, инкубировали в течение ночи (18 ч) при температуре 37°C и 5% CO₂. Собирали 200 мкл супернатантов для оценки в анализе ИФНа ELISA (PBL InterferonSource);

фиг. 50 - влияние HCQ на потенциал ВПВ059. Каждое обозначение представляет концентрации ИФНа, измеренные у репрезентативного донора из 2 тестированных здоровых доноров, вертикальные линии обозначают стандартное отклонение (SD). Клетки РВМС из гепаринизированной венозной крови здоровых доноров и больших СКВ выделяли путем прерывистого градиентного центрифугирования с Фиколлом, промывали в фосфатно-буферном растворе (ФБР) и ресуспендировали в полной культуральной среде (RPMI с 3% эмбриональной бычьей сывороткой-FBS). Клетки РВМС обрабатывали ВПВ059 единственным в разных концентрациях, HCQ единственным или комбинацией (ВПВ059+HCQ), при общем анализируемом объеме 250 мкл на лунку. Концентрации ВПВ059 варьировались от 10 мкг/мл до 0,1 нг/мл. Концентрации HCQ варьировались от 10 мкМ до 156 нМ. Клетки РВМС в количестве 1×10^6 на лунку стимулировали 1 мкМ лиганда TLR9 (CPG-A). Планшеты, содержащие РВМС, инкубировали в течение ночи (18 часов) при температуре 37°C и 5% CO₂. Собирали 200 мкл супернатантов для оценки в анализе ИФНа ELISA (PBL InterferonSource);

фиг. 51 - распределение процентов циркулирующих pDC в цельной крови здоровой обезьяны цино-молгус в оригинальном масштабе (схема слева) и в логарифмической шкале (схема справа). Цельную кровь забирали от двенадцати обезьян циномолгус один раз в неделю всего в течение четырех недель. Путем проточной цитометрией идентифицировали клетки pDC как CD20-CD14-CD123+HLA-DR+. Процент pDC от CD20-CD14-клеток рассчитывали с помощью программного обеспечения FlowJo. Диаграмму выполняли с использованием языка R для статистических расчетов;

фиг. 52 представляет собой графическое изображение процента циркулирующих pDC (по логарифмической шкале) в цельной крови здоровых обезьян циномолгус в разные точки времени перед внутривенной инъекцией ВПВ059. В указанные точки времени проводили забор цельной крови, и путем проточной цитометрии определяли клетки pDC как CD20-CD14-CD123+HLA-DR+. Процент клеток pDC рассчитывали с помощью программного обеспечения FlowJo и графически отображали с помощью программного обеспечения R;

фиг. 53 демонстрирует конечную подогаданную модель, соответствующую проценту циркулирующих pDC (по логарифмической шкале) в цельной крови здоровой обезьяны циномолгус в разные точки времени перед в/в инъекцией ВПВ059. Линейная модель со смешанными эффектами для логарифмического значения (% pDC) в разные точки времени в качестве фиксированных факторов и обезьян цино-молгус в качестве случайных отрезков, показывает отсутствие различий между соотношениями геометрических средних значений % pDC, измеряемых по недельным различиям (p-значение на основе F-теста для всех временных эффектов, равных нулю, составляет 0,67). Диаграмма и статистический анализ были рассчитаны с использованием языка R для статистических расчетов. Сплошная линия обозначает конечную подогаданную модель, которая включает только фиксированный отрезок и случайные отрезки для обезьян циномолгус. Был использован пакет lme4 в языке R для соответствия линейной модели со смешанными эффектами;

фиг. 54 обозначает процент циркулирующих pDC по логарифмической шкале до и после в/в введения обезьянам циномолгус дозы цитрата натрия как носителя, ВПВ059 в дозе 1 мг/кг или ВПВ059 в дозе 10 мг/кг. Дозы вводили в точке времени 0 трем обезьянам циномолгус в каждой группе. В указанные точки времени забирали цельную кровь и способом проточной цитометрии идентифицировали клетки pDC как CD20-CD14-CD123+HLA-DR+. Процент клеток pDC рассчитывали в программном обеспечении FlowJo и графически с помощью программного обеспечения R;

фиг. 55 - конечную подогаданную модель процентов циркулирующих pDC по логарифмической шкале до и после в/в введения обезьянам циномолгус дозы цитрата натрия как носителя, 1 и 10 мг/кг ВПВ059. Использовали линейную модель со смешанными эффектами для логарифмических (% pDC) значений с фиксированными факторами для группы по дозе, значений времени 1, 6 ч и более 28 дней, и со случайным отрезком для обезьян циномолгус. Сплошная линия обозначает конечную подогаданную модель. Был использован пакет lme4 в языке R для соответствия линейной модели со смешанными эффектами. Диаграмма и статистический анализ были рассчитаны с использованием языка R для статистических расчетов;

фиг. 56 показывает процент циркулирующих pDC после п/к введения обезьянам циномолгус ВПВ059 в дозе 0,2 мг/кг. Обезьянам циномолгус № 4, 6 и 12 проводили однократную подкожную инъекцию ВПВ059 в дозе 0,2 мг/кг в точке времени 0. Обезьяне циномолгус № 6 из этих трех обезьян в преды-

дущем исследовании вводили ВПВ059. Обезьянам циномоглус № 4 и 12 в предыдущем исследовании вводили носитель. В указанные моменты времени проводили забор цельной крови и способом проточной цитометрии идентифицировали рDC как CD20-CD14-CD123+HLA-DR+. Процент клеток рDC рассчитывали в программном обеспечении FlowJo, и графически с помощью программного обеспечения R;

фиг. 57 обозначает конечную подогапанную модель процентов циркулирующих рDC по логарифмической шкале после п/к введения обезьянам циномоглус ВПВ059 в дозе 0,2 мг/кг. Использовали линейную модель со смешанными эффектами для логарифмических (% рDC) значений с фиксированными эффектами для непрерывного времени и точки времени 1 ч, и со случайным отрезком для обезьян циномоглус. Сплошная линия обозначает конечную подогапанную модель. Был использован пакет lme4 в языке R для соответствия линейной модели со смешанными эффектами. Диаграмма и статистический анализ были рассчитаны с использованием языка R для статистических расчетов;

фиг. 58 является схематическим представлением схемы ФК/ФД эксперимента с обезьянами циномоглус. Исследование с внутривенным (в/в) введением завершили девять обезьян циномоглус. У обезьян циномоглус брали кровь до и после внутривенного введения носителя, 1 мг/кг ВПВ059 или 10 мг/кг ВПВ059 в соответствии с показанной схемой забора крови. После завершения этого исследования 3 обезьяны циномоглус продолжили участие в исследовании с подкожным (п/к) введением дозы, в котором они получали однократную подкожную инъекцию 0,2 мг/кг ВПВ059. Во время каждого забора крови проводили анализ цельной крови, при этом цельную кровь обезьян циномоглус разводили 1:4 полной средой RPMI 1640, стимулировали CpG-A до конечной концентрации 200 мкг/мл в 96-луночных круглодонных планшетах для тканевых культур, и инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 18-20 ч. В конце культивирования стимулированную цельную кровь центрифугировали для получения сыворотки. В биоанализе MxA клетки A549 стимулировали собранной сывороткой в течение 19-20 ч при 37°C и 5% CO₂, чтобы индуцировать белок MxA. Через 20 ч клетки A549 подвергали лизису и проводили сэндвич-ELISA для определения концентраций белка MxA. Выполняли обратный расчет уровней ИФНа (Ед/мл) по стандартной кривой, полученной при обработке клеток A549 возрастающими дозами гИФНа;

фиг. 59 представляет собой графическое представление тенденции к снижению TLR9-индуцированной продукции ИФНа у обезьян циномоглус, получавших однократную внутривенную дозу ВПВ059, по сравнению со средними показателями перед введением. Цельную кровь обезьян циномоглус, получивших однократную внутривенную дозу носителя, 1 мг/кг ВПВ059 или 10 мг/кг ВПВ059, разводили 1:4 полной средой RPMI 1640, стимулировали CpG-A (2216) до конечной концентрации 200 мкг/мл в 96-луночных круглодонных планшетах для тканевых культур, и инкубировали при 37°C 5% CO₂ в течение 18-20 ч. В конце культивирования стимулированную цельную кровь центрифугировали для получения сыворотки. Клетки A549 стимулировали собранной сывороткой в течение 18-20 ч при 37°C и 5% CO₂ для индуцирования белка MxA. Через 20 ч клетки A549 подвергали лизису и проводили сэндвич-ELISA для определения концентраций белка MxA. Выполняли обратный расчет уровней ИФНа (Ед/мл) по стандартной кривой, полученной при обработке клеток A549 возрастающими дозами гИФНа. Среднюю концентрацию ИФНа перед забором крови рассчитывали для каждой обезьяны путем усреднения всех измерений ИФНа в точках времени перед забором крови (дни 21, 14, 7 и точке времени 0). Затем рассчитывали % ИФНа для каждой точки времени забора крови после введения ВПВ059 до дня 14 путем деления концентрации ИФНа, установленной на тот момент, на средний показатель для этого животного перед забором крови, и умножения на 100. Получали усредненные значения для каждой группы введения. Диаграммы обозначают среднее значение ± стандартная ошибка среднего отклонения. Диаграмма и статистический анализ были рассчитаны с использованием программного обеспечения Excel и GraphPad 6.0 (GraphPad, Сан-Диего, Калифорния);

фиг. 60 - графическое изображение уменьшенной TLR9-индуцированной продукции ИФНа в анализе ex vivo цельной крови обезьян циномоглус, получавших внутривенно ВПВ059. Цельную кровь обезьян циномоглус, получивших однократную внутривенную дозу носителя (верхняя диаграмма), 1 мг/кг ВПВ059 (средняя диаграмма) или 10 мг/кг ВПВ059 (нижняя диаграмма), разводили 1:4 полной средой RPMI 1640, стимулировали CpG-A (2216) до конечной концентрации 200 мкг/мл в 96-луночных круглодонных планшетах для тканевых культур и инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 18-20 ч. В конце культивирования стимулированную цельную кровь центрифугировали для получения сыворотки. Клетки A549 стимулировали собранной сывороткой в течение 19-20 ч при 37°C и 5% CO₂, чтобы индуцировать белок MxA. Через 20 ч клетки A549 подвергали лизису и проводили сэндвич-ELISA для определения концентраций белка MxA. Выполняли обратный расчет уровней ИФНа (Ед/мл) по стандартной кривой, полученной при обработке клеток A549 возрастающими дозами гИФНа. Двусторонний дисперсионный анализ смешанных эффектов (ANOVA) был подобран для значений log₁₀ рассчитанных концентраций ИФНа. Значения ИФНа выстраивали (по шкале log₁₀) в зависимости от дня забора крови для каждого животного в каждой группе введения. Вертикальные линии обозначают дни забора крови, сгруппированные по принципу перед введением, после введения дозы до дня 31, и после введения дозы позднее дня 31. Забор крови в срок позднее дня 31 в данном анализе не производился. Оценки на основе модели геометрических средних значений ИФНа обозначены толстыми черными горизонтальными линиями в области каждой диаграммы, относящейся к показателям перед введением дозы и после введения. Расчеты

диаграмм и статистический анализ проводили с использованием языка R для статистических расчетов;

фиг. 61 - графическое изображение уменьшенной TLR9-индуцированной продукции ИФНа в анализе *ex vivo* цельной крови обезьян циномоглус после подкожного введения ВПВ059. Цельную кровь от обезьян циномоглус, получивших однократную подкожную дозу 0,2 мг/кг ВПВ05910, разводили 1:4 полной средой RPMI 1640, стимулировали CPG-A (2216) до конечной концентрации 200 мкг/мл в 96-луночных круглодонных планшетах для тканевых культур и инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 19-20 ч. В конце культивирования стимулированную цельную кровь центрифуговали для получения сыворотки. Клетки A549 стимулировали собранной сывороткой в течение 19-20 часов при 37°C и 5% CO₂, чтобы индуцировать белок МхА. Через 20 ч клетки A549 подвергали лизису и проводили сэндвич-ELISA для определения концентраций белка МхА. Выполняли обратный расчет уровней ИФНа (Ед/мл) по стандартной кривой, полученной при обработке клеток A549 возрастающими дозами гИФНа. Двусторонний дисперсионный анализ смешанных эффектов (ANOVA) был подобран для значений log₁₀ рассчитанных концентраций ИФНа. Значения ИФНа выстраивали (по log₁₀) в зависимости от дня забора крови для каждого животного в каждой группе введения. Вертикальные линии обозначают дни забора крови, сгруппированные по принципу перед введением, после введения дозы до дня 33, и после введения дозы позднее дня 33. Забор крови в срок позднее дня 33 в данном анализе не производился. Оценки на основе модели геометрических средних значений ИФНа обозначены толстыми черными горизонтальными линиями в области каждой диаграммы, относящейся к показателям перед введением дозы и после введения. Расчеты диаграмм и статистический анализ проводили с использованием языка R для статистических расчетов.

Подробное описание

ВПВ059 является репрезентативным моноклональным антителом, которое специфично связывается с BDCA2 человека. Антитела против BDCA2 по изобретению ингибируют продукцию рDC и/или секрецию цитокинов и хемокинов. Кроме того, антитела против BDCA2 по изобретению могут понижаяюще регулировать уровни CD32a и/или CD62L на поверхности клеток рDC. Также антитела против BDCA2 по изобретению могут опосредовать интернализацию BDCA2 с поверхности клеток рDC. Дополнительно антитела против BDCA2 по изобретению можно использовать для истощения клеток рDC посредством ADCC или CDC, и их можно применять для лечения или профилактики иммунологических заболеваний, таких как воспалительные и аутоиммунные состояния. В настоящем изобретении также показано, что комбинация противомаларийного агента и антитела против BDCA2 по изобретению может дать улучшенные эффекты по сравнению с лечением каждым препаратом в отдельности. BDCA2 представляет собой лектин С-типа II типа, который специфично экспрессируется на клетках рDC. BDCA2 состоит из единственного внеклеточного домена распознавания углеводов (CRD) на его С-конце, трансмембранной области и короткого цитоплазматического хвоста на его N-конце, который не содержит сигнальный мотив. BDCA2 передает внутриклеточные сигналы посредством ассоциированного трансмембранного адаптора FcεRIγ (фиг. 1). Антитело-опосредованное лигирование BDCA2 приводит к рекрутингу селезеночной тирозинкиназы (SYK) в активирующий мотив на основе фосфорилированного иммуно-рецепторного тирозина (ITAM) в FcεRIγ. Активация SYK приводит к активации В-клеточного линкера (Blnk), тирозинкиназы Брутона (BTK) и фосфолипазы Cγ2 (PLCγ2), что приводит к мобилизации Ca₂⁺.

Аминокислотная последовательность человеческого белка BDCA2 (номер доступа в Genbank NP_569708.1) показана ниже (трансмембранный домен выделен курсивом; эктодомен подчеркнут)

```

1  MVPEEPPQDR EKGLWWFQLK VWSMAVVSIL LLSVCFTVSS VVPHNEMYSK
51  TVKRLSKLRE YQQYHPSLTC VMEGKDIEDW SCCPTPWTSE QSSCYFISTG
101  MQSWTKSQKN CSVMGADLVV INTREEQDFI IQNLKRNSY FLGLSDPGR
151  RHWQWVDQTP YNENVTFWHS GEPNNLDERC AINFRSSEE WGWNDIHCHV
201  POKSICKMCK IYI* (SEQ ID NO:1)

```

Аминокислотная последовательность человеческого FcεRIγ (номер доступа в Genbank NP_004097.1) показана ниже

```

1  MIPAVVLLLL LLVEQAAALG EPQLCYILDA ILFLYGIVLT LLYCRLKIQV
51  RKAAITSYEK SDGVYTGSLT RNQETYETLK HEKPPQ* (SEQ ID NO:2)

```

Ближайший гомолог крысиного BDCA2, крысиный Clec4b2 (номер доступа в Genbank NM_001005896), имеет только 51,0% идентичности с BDCA2 человека. В противоположность этому BDCA2 обезьян циномоглус и резус имеют 90,6% идентичности с BDCA2 человека. В дополнение, последовательность белка FcεRIγ обезьян циномоглус и резус, которые идентичны друг другу, имеет 98,9% идентичности с человеческим белком FcεRIγ.

Белки BDCA2 человека, обезьян циномоглус и резус могут быть использованы в качестве иммуногенов для получения антител против BDCA2. Для создания человеческих антител против BDCA2 можно использовать человеческий белок BDCA2 в качестве иммуногена. Затем античеловеческие BDCA2 антитела можно подвергать скринингу для выявления антител, имеющих один или несколько признаков, описанных в настоящем изобретении (например, уменьшение продукции/секреции одного или нескольких

интерферонов типа I или типа III, ИЛ-6, ФНО- α , MIP-1 α , MIP-1 β , CCL5 и IP10/CXCL10; истощение клеток pDC; конкурирование с ВПВ059 за связывание с внеклеточным доменом BDCA2; селективное связывание с эктодоменом BDCA2 человека, обезьян циномогус и резус, но при этом отсутствие связывания с Сlec4b2 крысы; ингибирование развития заболевания в модели псориатического ксенотрансплантата у человека).

Антитела против BDCA2.

Настоящее изобретение включает последовательности моноклонального антитела ВПВ059, которое связывается с BDCA2 человека, обезьян циномогус и резус, но не связывается с Сlec4b2 крысы. ВПВ059 не связывается или показывает незначительное связывание с BDCA2 от филогенетических видов нижеуказанных приматов.

ВПВ059.

ВПВ059 представляет собой гуманизированное IgG1 антитело, которое специфично распознает BDCA2 на поверхности плазматоидных дендритных клеток. Оно было получено из мышиногеного антитела (24F4), которое связывается с BDCA2 следующим образом. Плазмиду, кодирующую полноразмерный человеческий BDCA2, вводили мышам с помощью генной пушки. Спленоциты из этой мыши были слиты с клетками миеломы, и полученная гибридома продуцировала антитела 24F4. С помощью генноинженерных технологий вставляли антитела 24F4 в каркас человеческого IgG1 дикого типа для поддержания полной эффекторной функции. Предсказанные аминокислотные последовательности тяжелых и легких цепей зрелого ВПВ059 представлены ниже.

Области, определяющие комплементарность (CDR) 1, 2 и 3 варибельной легкой цепи (VL) и варибельной тяжелой цепи (VH), приведены в порядке от N-концу к C-концу зрелых последовательностей VL и VH, и обе из них подчеркнуты и выделены жирным шрифтом. Ниже приведены последовательности зрелой тяжелой цепи (SEQ ID NO: 4) и зрелой легкой цепи (SEQ ID NO: 3), составляющие антитело, которое называется ВПВ059.

Легкая цепь (LC) зрелого ВПВ059

DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQSVD YDGDSYMNWY QQKPGKAPKL LIYAASTLES
GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLQPEDFATY YCQOANEDPR TFGQGTKVEI KRTVAAPSVF
IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS
STLTLSKADY EKHVKYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC (SEQ ID NO:3)

Тяжелая цепь (HC) зрелого ВПВ059

DVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS TYTMSWVRQA PGKGLEWVAT ISPGDSFGYY
YPDSVQGRFT ISRDNAKNSL YLQMNSLRAE DTAVYYCTRD IYYNYGAWFA YWGQGLTLVTV
SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ
SSGLYSLSV VTPVSSSLGT QTYICNVNHK PSNTKVDKKV EPKSCDKTHT CPPCPAPELL
GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ
YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR
DELTKNQVSL TCLVKGFPYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTT PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS
RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP G (SEQ ID NO:4)

Варибельная легкая цепь (VL) ВПВ059 имеет следующую аминокислотную последовательность

DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQSVD YDGDSYMNWY QQKPGKAPKL LIYAASTLES
GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLQPEDFATY YCQOANEDPR TFGQGTKVEI K (SEQ ID
NO:23)

Варибельная тяжелая цепь (VH) ВПВ059 имеет следующую аминокислотную последовательность

DVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS TYTMSWVRQA PGKGLEWVAT ISPGDSFGYY
YPDSVQGRFT ISRDNAKNSL YLQMNSLRAE DTAVYYCTRD IYYNYGAWFA YWGQGLTLVTV
SS (SEQ ID NO:24)

Аминокислотные последовательности областей CDR VL в ВПВ059 перечислены ниже

VL CDR1: KASQSDYDGDSYMN (SEQ ID NO:5);
VL CDR2: AASTLES (SEQ ID NO:6); и
VL CDR3: QOANEDPRT (SEQ ID NO:7).

Аминокислотные последовательности областей CDR VH в ВПВ059 перечислены ниже

VH CDR1: TYTMS (SEQ ID NO:8) (CDR1 по Kabat) или
GFTFSTYTMS (SEQ ID NO:9) (расширенная по Chothia/AbM
CDR1);
VH CDR2: TISPGDSFGYYYPDSVQG (SEQ ID NO:10);
VH CDR3: DIYY YGAWFAY (SEQ ID NO:11).

Как указано выше, согласно расширенному определению по Chothia/AbM CDR область VH CDR1 на 5 аминокислот длиннее, чем по определению этой области CDR по Kabat. Пять дополнительных аминокислот VH CDR1 согласно расширенному определению по Chothia/AbM представляют собой GFTFS (SEQ ID NO: 12).

Антитела против BDCA2 по изобретению также могут содержать в ВПВ059 "альтернативные области CDR". "Альтернативными" CDR считаются CDR (CDR1, CDR2 и CDR3), которые определены в соответствии с любой одной из систем Chothia, AbYsis, расширенной Chothia/AbM CDR или контактных определений. Эти альтернативные CDR могут быть получены, например, с помощью базы данных AbYsis (www.bioinf.org.uk/abysis/sequence_input/key_annotation/key_annotation.cgi). Аминокислотные последовательности из "альтернативных" областей CDR 1, 2 и 3 из варибельного участка тяжелой цепи и варибельного участка легкой цепи ВПВ059 сравниваются с областями CDR, определенными в соответствии с нумерацией по Kabat в таблице ниже

Домен	Определение по Kabat	Определение по Chothia от Abysis	Расширенное определение по Chothia/AbM	Контакт
VH CDR1	TYTMS (SEQ ID NO:8)	GFTFSTY (SEQ ID NO:89)	GFTFSTYTMS (SEQ ID NO:9)	STYTMS (SEQ ID NO:90)
VH CDR2	TISPGDSFGYYYP DSVQG (SEQ ID NO:10)	SPGDSFG (SEQ ID NO:91)	TISPGDSFGYY (SEQ ID NO:92)	WVATISPGDSF GYY (SEQ ID NO:93)
VH CDR3	DIYYNYGAWFAY (SEQ ID NO:11)	DIYYNYGAWFAY (SEQ ID NO:11)	DIYYNYGAWFAY (SEQ ID NO:11)	TRDIYYNYGAW FA (SEQ ID NO:94)
VL CDR1	KASQSVDYDGDSY MN (SEQ ID NO:5)	KASQSVDYDGDS YMN (SEQ ID NO:5)	KASQSVDYDGDS YMN (SEQ ID NO:5)	DYDGDYSYMNWY (SEQ ID NO:95)
VL CDR2	AASTLES (SEQ ID NO:6)	AASTLES (SEQ ID NO:6)	AASTLES (SEQ ID NO:6)	LLIYAASTLE (SEQ ID NO:96)
VL CDR3	QQANEDPRT (SEQ ID NO:7)	QQANEDPRT (SEQ ID NO:7)	QQANEDPRT (SEQ ID NO:7)	QQANEDPR (SEQ ID NO:97)

Антитела против BDCA2 могут включать CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и легкой цепи в соответствии с определением по Kabat, определением по Chothia от Abysis, расширенным определением по Chothia/AbM CDR или контактным определением. Эти антитела обладают следующими свойствами (i) связываются с BDCA2 человека или обезьян циномогус, но не показывают значительного связывания с BDCA2 от филогенетических видов нижеуказанных приматов; и/или (ii) ингибируют продукцию TLR7/TLR9-индуцированного интерферона I типа и продукцию других цитокинов или хемокинов посредством человеческих pDC; и/или (iii) опосредуют интернализацию BDCA2 с поверхности клеток pDC; и/или (iv) подавляют CD32a и/или CD62L на поверхности pDC; и/или (v) истощают клетки pDC in vitro посредством ADCC или CDC.

Антитела IgG человека представляют собой тетрамерные молекулы, содержащие две легкие цепи и две тяжелые цепи. Каждая легкая цепь ВПВ059 ковалентно связана с тяжелой цепью посредством межцепочечной дисульфидной связи (LC Cys 218 - HC Cys 225), и тяжелые цепи спарены друг с другом с помощью двух межцепочечных дисульфидов (HC Cys 231-Cys 231 и Cys 234-Cys 234). Все остальные цистеины образуют внутримолекулярные дисульфиды, которые стабилизируют константные и варибельные домены.

В некоторых вариантах осуществления антитела против BDCA2 включают константную область тяжелой цепи и легкой цепи человека. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи содержит домен CH1 и шарнирную область. В некоторых вариантах осуществления констант-

ная область тяжелой цепи содержит домен СН3. Если константная область тяжелой цепи включает замены, то такие замены модифицируют свойства антитела (например, увеличивают или уменьшают одно или несколько из следующих свойств: связывание с Fc-рецептором, гликозилирование антитела, число цистеиновых остатков, функцию эффекторных клеток или функцию комплемента). В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой IgG антитело. В конкретных вариантах осуществления антитело выбрано из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc-область человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с аффинностью от 7 до 15 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc-область человека, которая связывается с FcγRII (CD32a) с EC₅₀ 10 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc-область человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с EC₅₀ 11 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело включает Fc-область человека, которая связывается с FcγRIIa (CD32a) с EC₅₀ 12 мкг/мл. В табл. 1 приведен перечень свойств антитела ВІІВ059.

Таблица 1

Молекулярная масса (рассчитанная/фактическая дегликозилированная)	146348,2 Да/146352 Да
Молекулярная масса (дегликозилированная тяжелая цепь, предполагаемая/фактическая)	49425,8 Да/49424 Да
Молекулярная масса (легкая цепь, предполагаемая/ фактическая)	23764,3 Да/23765 Да
Молекулярная масса (SDS-PAGE)	150000 Да
Коэффициент экстинкции (1 мг/мл)	1,46 мл/мг/см при 280 нм
Максимальная абсорбция	275 нм
pI (рассчитанная)	7,26
pI (изоэлектрическое фокусирование IEF)	Основной компонент 7,01 Минорные компоненты 6,90, 6,81, 6,78, 7,09
EC ₅₀ BDCA2 человека (FACS)	7 нМ
EC ₅₀ BDCA2 цинолгус (FACS)	7 нМ
Модуляция температуры в дифференциальной сканирующей калориметрии (Tm - DSC)	СН2: 72°C Fab: 68,6°C, 75,9°C СН3: 85°C
Свободный SH	0,4/моль (1,1%)
Гликация	0,1 моль/моль ВІІВ059
N-связанное гликозилирование RRS1	G0 (69%) G1 (23,9%) G2 (2,2%) A-гликозилированные (1%)
Образец буфера для композиции	20 мМ цитрата натрия, 150 мМ NaCl, pH 6,0
Растворимость в буфере композиции	>150 мг/мл
Агрегация (SEC)	0,2%
Агрегация (AUC)	0,3% (в основном димеры)
T _{1/2}	7,3 дня у крыс
Эндотоксин	0,05 EU/мг белка

В1В059 проявляет подходящие физико-химические свойства для терапевтического антитела. Это антитело показывает низкие уровни агрегации. Каркас IgG1 дикого типа содержит в молекуле один N-связанный сайт гликозилирования и В1В059 связывается с Fc-рецепторами с аффинностью, которая типична для этого класса молекул. Расчетный индекс pI 7,26 является несколько низким для антитела. Исходя из гетерогенности заряда, выявленной у В1В059, предполагается, что значительная часть В1В059 содержит модификации. Такая гетерогенность заряда обусловлена, по меньшей мере частично, уровнем гликации примерно до 10%, который был определен в очищенных партиях В1В059. Показатель сворачивания T_m для В1В059 находится на нижнем конце типичных значений, наблюдаемых у антител, тогда как эти показатели для доменов СН2 и СН3 характерны для полностью гликозилированного мАТ IgG1. На основании дифференциальной сканирующей флуориметрии и измерений вязкости можно создавать рецептуру В1В059, например, с концентрацией 50 мг/мл, в 20 мМ цитрата натрия, 150 мМ NaCl, с уровнем pH 6,0. Это антитело может быть также приготовлено в более высоких концентрациях, например, от 150 до 300 мг/мл (например, 150, 200, 250, 300 мг/мл).

В1В059 является полностью гуманизированным, Fc-функционально компетентным мАТ IgG1, которое демонстрирует высокую аффинность к BDCA2 и связывается одинаково хорошо с нативным BDCA2 человека и BDCA2 обезьян циномоглус. В1В059 является мощным ингибитором всех TLR9-индуцированных интерферонов I типа, а также других цитокинов и хемокинов посредством клеток рDC. У здоровых доноров и больных СКВ антитело В1В059 проявляет одинаковый потенциал ингибирования TLR9-индуцированного интерферона I типа посредством клеток рDC. В1В059 посредством рDC специфично ингибирует TLR9-индуцированный ИФН типа I и не влияет на продукцию ИФН посредством других типов клеток, которая запускается другим TLR лигандом. В1В059 вызывает быструю интернализацию BDCA2 с клеточной поверхности. При стимуляции BDCA2 колокализуются с TLR9 в эндосомальном/лизосомальном компартменте, который представляется необходимым для ингибирования сигнального пути TLR9. Было установлено, что В1В059 вызывает шеддинг CD62L с поверхности человеческих рDC, что может повлиять на их возвращение в органы-мишени (хоуминг). В исследованиях *in vitro* антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) и комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) было показано, что В1В059 может проявлять действие истощения клеток в клеточных линиях с гиперэкспрессией BDCA2. Однако тот факт, что В1В059 вызывает быструю и полную интернализацию BDCA2 с поверхности клеток рDC, снижает вероятность эффекта В1В059 в виде устойчивого истощения рDC *in vivo*. Комбинация В1В059 и гидроксихлорохина (HCQ) вызывает эффект аддитивного ингибирования TLR7- и TLR9-индуцированной продукции ИФН α посредством РВМС у здоровых доноров. Эти данные подчеркивают потенциальный аддитивный терапевтический эффект при введении В1В059 с противомаларийными соединениями, такими как HCQ.

Антитела, такие как В1В059, можно создавать, например, путем подготовки и экспрессии синтетических генов, которые кодируют перечисленные аминокислотные последовательности, или путем мутации генов зародышевой линии человека, чтобы получить ген, который кодирует перечисленные аминокислотные последовательности. Кроме того, это антитело и другие антитела против BDCA2 могут быть получены, например, с использованием одного или нескольких из указанных ниже способов.

Способы получения антител против BDCA2.

Существует множество способов получения антител, в частности антител человека. Один способ, в качестве примера, включает скрининг библиотек экспрессии белка, например библиотек фаговых или рибосомных дисплеев. Способ фагового дисплея описан, например, в патенте US 5223409, Smith, Science, 228: 1315-1317 (1985), в патентах WO 92/18619, WO 91/17271, WO 92/20791, WO 92/15679, WO 93/01288, WO 92/01047, WO 92/09690, WO 90/02809. Способ дисплея Fab на фагах описан, например, в патентах США № 5658727, 5667988 и 5885793.

В дополнение к использованию дисплейных библиотек, можно задействовать другие способы для получения BDCA2-связывающего антитела. Например, можно использовать белок BDCA2 или его пептид в качестве антигена у животного нечеловеческого происхождения, например у грызунов, таких как мышь, хомяк или крыса. Дополнительно, клетки, трансфицированные кДНК, которая кодирует BDCA2, можно вводить животному нечеловеческого происхождения в качестве способа получения антител, которые эффективно связываются с белком BDCA2 клеточной поверхности.

В одном из вариантов осуществления животное, не являющееся человеком, включает по меньшей мере часть гена иммуноглобулина человека. Например, можно создать линию мышей с дефицитом продукции антитела мыши с большими фрагментами локусов человеческого Ig. С помощью технологии гибридомы можно получать и проводить селекцию антиген-специфичных моноклональных антител, полученных из генов с желаемой специфичностью. См., например, публикации XENOMOUSE™, Green et al. Nature Genetics 7: 13-21 (1994), патенты US 2003-0070185, WO 96/34096 и WO 96/33735.

В другом варианте осуществления моноклональное антитело получают из животного нечеловеческого происхождения, после чего его модифицируют, например проводят гуманизацию или деиммунизацию. В патенте US 5225539 автор Winter описывает в качестве примера способ трансплантации CDR, который может быть использован для получения гуманизированных антител по изобретению. Все или некоторые из областей CDR конкретного антитела человека могут быть заменены по меньшей мере ча-

стью из нечеловеческого антитела. Для получения эффективного гуманизованного антитела, которое связывается с BDCA2, может потребоваться только замена областей CDR, необходимых для связывания, или замена связывающих детерминант таких CDR.

Гуманизованные антитела могут быть получены путем замены последовательностей варибельной области Fv, которые непосредственно не вовлечены в связывание антигена, на эквивалентные последовательности из варибельных областей Fv человека. Общие способы создания гуманизованных антител представлены в публикациях Morrison S.L., *Science*, 229: 1202-1207 (1985), Oi et al., *BioTechniques* 4:214 (1986), и в патентах US 5585089, US 5693761, US 5693762, US 5859205 и US 6407213. Эти способы включают выделение, обработку и экспрессию последовательностей нуклеиновых кислот, которые кодируют все или часть варибельных областей Fv иммуноглобулина, по меньшей мере из одной тяжелой или легкой цепи. Источники таких нуклеиновых кислот хорошо известны специалистам в данной области техники и могут быть получены, например, из гибридомы, продуцирующей антитело против заранее определенной мишени, как описано выше, из генов иммуноглобулина зародышевой линии или из синтетических конструкций. Затем можно клонировать рекомбинантную ДНК, кодирующую гуманизованное антитело, в соответствующий вектор экспрессии.

Последовательности зародышевой линии человека раскрыты, например, в публикациях Tomlinson L.A. et al., *J. Mol. Biol.*, 227:776-798 (1992); Cook G.P. et al., *Immunol. Today*, 16: 237-242 (1995); Chothia D. et al., *J. Mol. Biol.* 227:799-817 (1992); и Tomlinson et al., *EMBO J.*, 14:4628-4638 (1995). Каталог V Base представляет полный справочник варибельных областей последовательности иммуноглобулина человека (составленный авторами Tomlinson L.A. et al., MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK). Эти последовательности могут быть использованы в качестве источника последовательности человека, например, для каркасных областей и CDR. Также можно использовать консенсусные каркасные области человека, например, как описано в патенте США № 6300064.

BDCA2-связывающие антитела нечеловеческого происхождения также могут быть модифицированы путем специфичной делеции эпитопов человеческих Т-клеток или способами "деиммунизации", описанными в патентах WO 98/52976 и WO 00/34317. Коротко, можно проводить анализ варибельных областей тяжелой и легкой цепей антитела на пептиды, которые связываются с главным комплексом гистосовместимости (МНС) класса II; эти пептиды представляют собой потенциальные Т-клеточные эпитопы (как определено в WO 98/52976 и WO 00/34317). Для обнаружения потенциальных Т-клеточных эпитопов можно применять подход компьютерного моделирования, называемый "протягивание пептида", и, дополнительно, можно проводить поиск в базе человеческих пептидов, связывающихся с МНС класса II, для выявления мотивов, присутствующих в последовательностях VH и VL, как описано в патентах WO 98/52976 и WO 00/34317. Эти мотивы связываются с каким-либо из 18 основных DR аллотипов МНС класса II и таким образом представляют собой потенциальные Т-клеточные эпитопы. Обнаруженные потенциальные Т-клеточные эпитопы могут быть удалены путем замены небольшого числа аминокислотных остатков в варибельных областях или предпочтительно путем единичных аминокислотных замен. Насколько это возможно, выполняют консервативные замены. Часто, но не исключительно, можно использовать аминокислоты, обычные для положения в человеческой последовательности зародышевой линии антитела. После идентификации деиммунизирующих изменений можно конструировать нуклеиновые кислоты, кодирующие VH и VL, с помощью мутагенеза или другими способами синтеза (например, путем синтеза *de novo*, замены кассеты и т.д.). Мутагенизированная варибельная последовательность может быть слита, если это желательно, с человеческой константной областью, например, с константными областями человеческого IgG1 или каппа.

В некоторых случаях потенциальный Т-клеточный эпитоп включает остатки, которые являются важными для функции антитела или предполагаются таковыми. Например, потенциальные Т-клеточные эпитопы обычно смещены в сторону CDR. Дополнительно, потенциальные Т-клеточные эпитопы могут встречаться в каркасных остатках, важных для структуры антитела и связывания антитела. Для изменений в целях удаления этих потенциальных эпитопов в некоторых случаях могут потребоваться более тщательные манипуляции, например получение и тестирование цепей с изменениями и без изменений. Где это возможно, потенциальные Т-клеточные эпитопы, которые накладываются на области CDR, могут быть удалены путем замены за пределами CDR. В некоторых случаях изменение в CDR представляет собой единственный вариант, и таким образом варианты с такой заменой и без замены можно подвергать тестированию. В других случаях замещение, необходимое для удаления потенциального Т-клеточного эпитопа, находится в положении остатка в пределах каркаса, что может иметь решающее значение для связывания антитела. В этих случаях проводят тестирование вариантов с такой заменой и без замены. Таким образом, в некоторых случаях разрабатывают несколько вариантов деиммунизированной варибельной области тяжелой и легкой цепи и проводят тестирование разных комбинаций тяжелых/легких цепей для идентификации оптимального деиммунизованного антитела. Затем можно проводить отбор конечного деиммунизованного антитела с учетом аффинности связывания различных вариантов в комбинации со степенью деиммунизации, в частности, с количеством потенциальных Т-клеточных эпитопов, оставшихся в варибельной области. Деиммунизация может быть использована для модификации любого антитела, например, антитела, которое включает последовательность человеческого происхож-

дения, например, синтетического антитела, мышиноного антитела, отличного от нечеловеческого моноклонального антитела, или антитела, выделенного из библиотеки дисплеев.

Также можно использовать другие способы гуманизации антител. Например, другие способы могут учитывать трехмерную структуру антитела, каркасные положения, которые находятся в трехмерной близости к связывающим детерминантам, и иммуногенные пептидные последовательности. См., например, патенты WO 90/07861, патенты США № 5693762, 5693761, 5585089, 5530101 и 6407213, и публикацию Tempest et al. (1991) *Biotechnology* 9: 266-271. Еще один способ, называемый "гуманирингом", описан, например, в патенте США 2005-008625.

Антитело может включать Fc-область человека, например Fc-область дикого типа или Fc-область, которая включает одну или несколько изменений. В одном из вариантов осуществления константная область является измененной, например мутантной, для модификации свойств антитела (например, для увеличения или уменьшения одного или нескольких из следующих свойств: связывание с Fc-рецептором, гликозилирование антител, число цистеиновых остатков, функции эффекторных клеток или функции комплемента). Например, константная область IgG1 человека может подвергаться мутации в одном или нескольких остатках, например в одном или нескольких остатках 234 и 237 (на основе нумерации Kabat). Антитела могут нести мутации в области тяжелой цепи CH2, которые уменьшают или изменяют эффекторную функцию, например связывание Fc-рецептора и активацию комплемента. Например, антитела могут нести мутации, такие как мутации, описанные в патентах США № 5624821 и 5648260. Антитела могут также иметь мутации, которые стабилизируют дисульфидную связь между двумя тяжелыми цепями иммуноглобулина, такие как мутации в шарнирной области IgG4, как описано в области, к которой относится настоящее изобретение (например, Angal et al. (1993) *Mol. Immunol.* 30: 105-08). См. также, например, US 2005-0037000.

Созревание аффинности.

В одном из вариантов осуществления антитело против BDCA2 подвергается модификации, например путем мутагенеза, для получения пула модифицированных антител.

В отличие от областей CDR, в структуре каркасных областей (FR) можно делать более существенные изменения без неблагоприятного эффекта на свойства связывания антитела. Изменения в областях FR включают без ограничения гуманизацию каркаса нечеловеческого происхождения или конструирование определенных каркасных остатков, которые важны для контакта с антигеном или для стабилизации сайта связывания, например, для изменения класса или подкласса константной области, изменения специфичных аминокислотных остатков, которые могут изменять эффекторную функцию, такую как связывание с Fc-рецептором (Lund et al., *J. Immunol.*, 147:2657-62 (1991); Morgan et al., *Immunology*, 86:319-24 (1995)), или для изменения видов, из которых получают константную область.

В изобретении рассмотрены композиции, содержащие смесь из антитела против BDCA2, и одного или нескольких его кислотных вариантов, например, смесь, в которой количество кислотного варианта (вариантов) составляет менее чем приблизительно 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5 или 1%. Также рассматриваются композиции, содержащие антитело против BDCA2, содержащее по меньшей мере один сайт деаμίдирования, при этом уровень pH композиции составляет от приблизительно 5,0 до приблизительно 6,5, таким образом, что, например, по меньшей мере приблизительно 90% антител против BDCA2 не деаμίдированы (т.е. менее чем приблизительно 10% антител являются деаμίдированными). В некоторых вариантах осуществления менее чем приблизительно 5, 3, 2 или 1% антител деаμίдированы. Уровень pH может составлять от 5,0 до 6,0, например, 5,5 или 6,0. В некоторых вариантах осуществления уровень pH композиции составляет 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4 или 6,5.

"Кислотный вариант" является вариантом представляющего интерес полипептида, который имеет более высокую кислотность (например, определяемую с помощью катионообменной хроматографии), чем представляющий интерес полипептид. Примером кислотного варианта является деаμίдированный вариант.

"Деаμίдированный" вариант полипептидной молекулы представляет собой полипептид, в котором один или несколько остатков аспарагина из исходного полипептида был преобразован в аспартат, т.е. нейтральный амид боковой цепи был преобразован в остаток с общим кислотным характером.

Термин "смесь", используемый в изобретении по отношению к композиции, содержащей антитело против BDCA2, означает присутствие как желаемого антитела против BDCA2, так и одного или нескольких его кислотных вариантов. Кислотные варианты могут содержать преимущественно деаμίдированное антитело против BDCA2, с незначительными количествами другого кислотного варианта (вариантов).

В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания (K_D), скорость ассоциации ($K_{D\ on}$) и/или скорость диссоциации ($K_{D\ off}$) антитела, которое подверглось мутации с устранением деаμίдирования, аналогична аффинности связывания антитела дикого типа, то есть, например, разница составляет менее чем приблизительно 5, 2, 1 раз (100%), 50, 30, 20, 10, 5, 3, 2 или 1%.

В некоторых вариантах осуществления антитело против BDCA2, или его низкомолекулярные антитела связываются с BDCA2 на клетках pDC, и посредством pDC ингибируют или уменьшают продукцию и/или секрецию интерферонов I типа или III типа, ИЛ-6, ФНО- α , MIP-1- α /CCL3, MIP-1- β /CCL4, CCL5/RANTES или IP10/CXCL10; и/или истощают клетки pDC посредством ADCC или CDC или апоп-

тоза; и/или уменьшают степень тяжести симптомов при введении пациентам-людям или животным моделям, у которых имеется одно или несколько из следующих заболеваний: системная красная волчанка, кожная волчанка, дискоидная волчанка, волчаночный нефрит. В одном из вариантов осуществления антитела против BDCA2 тормозит развитие болезни в модели псориазического ксенотрансплантата у человека (Nestle et al., J. Exp. Med., 202 (1): 135-143. (2005)). Эти свойства антитела против BDCA2 могут быть измерены в соответствии со способами, описанными в разделе примеров, а также с помощью других способов, известных в данной области техники.

Биспецифичные антитела.

Биспецифичные антитела представляют собой антитела, которые обладают специфичностью связывания, по меньшей мере, в отношении двух разных эпитопов. Приведенные в качестве примера биспецифичные антитела могут связываться с двумя разными эпитопами белка BDCA2. В других таких антителах может комбинироваться сайт связывания BDCA2 с сайтом связывания для другого белка. Биспецифичные антитела можно получать в виде полноразмерных антител или их низкомолекулярных форм (например, биспецифичные антитела $F(ab')_2$, биспецифичные антитела $sc(Fv)_2$, бивалентные биспецифичные антитела-диатела).

Общепринятое получение полноразмерных биспецифичных антител основано на совместной экспрессии двух пар тяжелой-легкой цепи иммуноглобулина, при этом эти две цепи обладают разной специфичностью (Millstein et al., Nature, 305: 537-539. (1983)). В другом подходе вариабельные домены антитела с желаемой специфичностью связывания сливаются с последовательностями константных доменов иммуноглобулинов. ДНК, кодирующие слияния иммуноглобулиновой тяжелой цепи и, если это желательно, иммуноглобулиновой легкой цепи, встраивают в отдельные экспрессирующие векторы и ко-трансфицируют в подходящую клетку-хозяина. Это дает большую гибкость в подборе пропорций трех полипептидных фрагментов. Вместе с тем, можно вставлять кодирующие последовательности для двух или всех трех полипептидных цепей в один вектор экспрессии, если экспрессия по меньшей мере двух полипептидных цепей в равных соотношениях приводит к высоким результатам.

В соответствии с другим подходом, описанным в патенте США № 5731168, можно создавать поверхность раздела между парой молекул антител, чтобы максимизировать процент гетеродимеров, которые выделяют из культуры рекомбинантных клеток. Предпочтительная поверхность раздела содержит по меньшей мере часть домена СН3. В этом способе одну или несколько небольших боковых аминокислотных цепей из поверхности раздела первой молекулы антитела заменяют несколькими крупными боковыми цепями (например, тирозином или триптофаном). На поверхности раздела второй молекулы антитела создаются компенсационные "полости" для большой боковой цепи (цепей) идентичного или сходного размера путем замены крупных боковых аминокислотных цепей на цепи меньшего размера (например, на аланин или треонин). Так создается механизм для увеличения образования гетеродимера по сравнению с другими нежелательными конечными продуктами, такими как гомодимеры.

Биспецифичные антитела включают шитые или "гетероконъюгированные" антитела. Например, одно из антител в гетероконъюгате может быть связано с авидином, а другое с биотином. Гетероконъюгированные антитела могут быть получены с использованием любых удобных способов сшивания.

Технология "диатела" обеспечивает альтернативный механизм получения фрагментов биспецифичных антител. Эти фрагменты содержат VH, соединенный с VL посредством линкера, который является слишком коротким, чтобы позволить спаривание между двумя доменами на одной и той же цепи. Соответственно, домены VH и VL одного фрагмента вынуждены спариваться с комплементарными VL и VH доменами другого фрагмента, тем самым образуя два антигенсвязывающих участка.

Поливалентные антитела.

Поливалентное антитело быстрее, чем бивалентное антитело может подвергаться интернализации (и/или катаболизироваться) клеткой, экспрессирующей антиген, с которым связываются антитела. Антитела по изобретению могут представлять собой поливалентные антитела с тремя или несколькими антигенсвязывающими участками (например, тетравалентные антитела), которые могут быть легко созданы посредством рекомбинантной экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептидные цепи антитела. Поливалентное антитело может содержать домен димеризации и три или несколько антигенсвязывающих участков. Приведенный в качестве примера домен димеризации содержит (или состоит из) Fc-области или шарнирной области. Поливалентное антитело может содержать (или состоять из) от трех примерно до восьми (например, четыре) антигенсвязывающих участков. Поливалентное антитело дополнительно содержит по меньшей мере одну полипептидную цепь (например, по меньшей мере две полипептидные цепи), при этом полипептидная цепь (цепи) содержит два или несколько вариабельных доменов. Например, полипептидная цепь (цепи) может содержать $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$, где VD1 представляет собой первый вариабельный домен, VD2 представляет собой второй вариабельный домен, Fc представляет собой полипептидную цепь Fc-области, X1 и X2 представляют собой аминокислоту или пептидный спейсер и $n=0$ или 1.

Конъюгированные антитела.

Антитела, раскрытые в изобретении, могут представлять собой конъюгированные антитела, которые связаны с различными молекулами, включающими макромолекулярные субстанции, такие как по-

лимеры (например, полиэтиленгликоль (ПЭГ), полиэтиленимин (ПЭИ), модифицированный ПЭГ (ПЭИ-ПЭГ), полиглутаминовая кислота (PGA), сополимеры (N-(2-гидроксипропил)метакриламида (HPMA), гиалуроновая кислота, радиоактивные материалы (например, ^{90}Y , ^{131}I), флуоресцентные вещества, люминесцентные вещества, гаптены, ферменты, хелаты металлов, лекарства и токсины (например, калихеамицин, синегнойный экзотоксин, рицин (например, дегликозилированная цепь А рицина)).

В одном из вариантов осуществления для улучшения действия цитотоксических антител против BDCA2 и, следовательно, их терапевтической эффективности, антитела конъюгируют с высокотоксичными веществами, включающими радиоактивные изотопы и цитотоксические агенты. Эти конъюгаты могут селективно доставлять токсические агенты к месту мишени (т.е. в клетки, экспрессирующие антиген, который распознается антителом), не задевая клетки, которые не распознаются антителом. Чтобы минимизировать токсичность, конъюгаты обычно делают на основе молекул с коротким периодом полувыведения из сыворотки крови (т.е. с использованием последовательностей мышей и изотипов IgG3 или IgG4).

В некоторых вариантах осуществления антитело против BDCA2 модифицируют с фрагментом, который улучшает его стабилизацию и/или удержание в циркуляторном русле, например в крови, сыворотке или в других тканях, например по меньшей мере в 1,5, 2, 5, 10 или 50 раз. Например, антитело против BDCA2 могут быть связаны (например, конъюгированы) с полимером, например, по существу, с неантигенным полимером, таким как полиалкиленоксид или полиэтиленоксид. Подходящие полимеры варьируются в основном в зависимости от веса. Можно использовать полимеры, имеющие среднечисловую молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 200 до приблизительно 35000 Да (или от приблизительно 1000 до приблизительно 15000 и от 2000 до приблизительно 12500 Да). Например, антитело против BDCA2 могут быть конъюгированы с водорастворимым полимером, например, с гидрофильным поливиниловым полимером, например с поливиниловым спиртом или поливинилпирролидоном. Примеры таких полимеров включают гомополимеры полиалкиленоксида, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ) или полипропиленгликоли, полиоксиэтилированные полиолы, их сополимеры и блок-сополимеры, при условии, что эти блок-сополимеры сохраняют растворимость в воде. Дополнительные эффективные полимеры включают полиоксиалкилены, такие как полиоксиэтилен, полиоксипропилен и блок-сополимеры полиоксиэтилена и полиоксипропилена, полиметакрилаты, карбомеры и разветвленные или неразветвленные полисахариды.

Вышеописанные конъюгированные антитела могут быть получены путем осуществления химических модификаций на описанных в изобретении антителах или их низкомолекулярных формах. Способы модификации антител хорошо известны в настоящей области (например, патенты США 5057313 и США 5156840).

Способы получения антител.

Антитела могут быть получены в бактериальных или эукариотических клетках. Некоторые антитела, например Fab, могут быть получены в бактериальных клетках, например, клетках *E.coli*. Антитела могут быть также получены в эукариотических клетках, таких как трансформированные клеточные линии (например, CHO, 293E, COS). Дополнительно, антитела (например, ScFv) могут быть экспрессированы в дрожжевой клетке, такой как клетки *Pichia* (см., например, Powers et al., *J. Immunol. Methods*. 251:123-35. (2001)), *Hansenula* или *Saccharomyces*. Для получения представляющего интерес антитела полинуклеотид, кодирующий антитело, конструируют, встраивают в вектор экспрессии, а затем экспрессируют в подходящих клетках-хозяевах. Для получения рекомбинантного вектора экспрессии, трансфекции клеток-хозяев, выбора трансформантов, культивирования клеток-хозяев и восстановления антитела применяют стандартные технологии молекулярной биологии.

Если необходимо экспрессировать антитело в бактериальных клетках (например, *E.coli*), вектор экспрессии должен обладать свойствами, которые позволяют амплифицировать этот вектор в бактериальных клетках. Дополнительно, когда в качестве хозяина используются *E.coli*, такие как JM109, HB101, DH5 α или XL1-Blue, вектор должен иметь промотор, например, промотор LacZ (Ward et al., 341: 544-546 (1989), промотор araB (Better et al., *Science*, 240:1041-1043 (1988)) или промотор T7, которые могут позволить эффективную экспрессию в *E.coli*. Примеры таких векторов включают, например, векторы M13-серии, векторы pUC-серии, pBR322, pBluescript, pCR-Script, pGEX-5X-1 (Pharmacia), "QIAexpress system" (QIAGEN), pEGFP и pET (при использовании этого вектора экспрессии хозяином предпочтительно является BL21, экспрессирующий T7 РНК-полимеразу). Вектор экспрессии может содержать сигнальную последовательность для секреции антитела. В качестве сигнальной последовательности для секреции антитела в целях продуцирования в периплазме *E.coli* можно использовать сигнальную последовательность *pelB* (Lei S.P. et al., *J. Bacteriol.* (1987) 169, 4379). Для экспрессии в бактериях можно применять способы с хлоридом кальция или способы электропорации для введения вектора экспрессии в бактериальную клетку.

Если антитело предназначено для экспрессии в животных клетках, таких как клетки CHO, COS и NIH3T3, то экспрессионный вектор включает промотор, необходимый для экспрессии в этих клетках, например промотор SV40 (Mulligan et al., *Nature* (1979) 277, 108), промотор MMLV-LTR, промотор EF1 α (Mizushima et al., *Nucleic. Acids. Res.* (1990) 18, 5322) или промотор CMV. В дополнение к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуноглобулин или его домен, рекомбинантные экс-

прессурирующие векторы могут нести дополнительные последовательности, такие как последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, точки начала репликации) и селективные маркерные гены. Селективный маркерный ген облегчает селекцию клеток-хозяев, в которые был встроены вектор (см., например, патенты США № 4399216, 4634665 и 5179017). Например, обычно ген селектируемого маркера придает устойчивость к лекарствам, таким как G418, гигромицин или метотрексат, для клетки-хозяина, в которую был встроены вектор. Примеры векторов с селектируемыми маркерами включают рMAM, рDR2, рBK-RSV, рBK-CMV, рOPRSV и рOP13.

В одном из вариантов осуществления антитела продуцируют в клетках млекопитающих. В качестве примера клетки млекопитающих для экспрессии антитела включают клетки яичника китайского хомячка (CHO-клетки) (в том числе клетки CHO dhfr⁻, описанные авторами Urlaub and Chasin (1980), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, используемые с селектируемым маркером DHFR, например, согласно описанию в публикации Kaufman and Sharp (1982) Mol. Biol. 159: 601-621), почечные эмбриональные клетки человека 293 (например, 293, 293E, 293T), клетки COS, клетки NIH3T3, лимфоцитарные клеточные линии, например клетки миеломы NS0 и клетки SP2, и клетки от трансгенного животного, например трансгенного млекопитающего. Например, клетка представляет собой эпителиальную клетку млекопитающего.

В примере системы для экспрессии антитела в клетки CHO dhfr⁻ вводят рекомбинантный вектор экспрессии, кодирующий и тяжелую цепь антитела и легкую цепь антитела из антитела против BDCA2 (например, ВПВ059) с помощью опосредованной фосфатом кальция трансфекции. В рекомбинантном векторе экспрессии каждый из генов тяжелой и легкой цепей антитела функционально связан с энхансерными/промоторными регуляторными элементами (например, полученными из SV40, цитомегаловируса, аденовируса и т.п., такими как CMV энхансерный/промоторный регуляторный элемент AdMLP или SV40 энхансерный/промоторный регуляторный элемент AdMLP) для запуска транскрипции генов на высоком уровне. Рекомбинантный вектор экспрессии также несет ген DHFR, позволяющий проводить селекцию клеток CHO, которые были трансфицированы вектором с селекцией/амплификацией с использованием метотрексата. После селекции трансформированные клетки-хозяева культивируют для экспрессии тяжелых и легких цепей антитела, и антитело выделяют из культуральной среды.

Антитела могут быть также получены с помощью трансгенного животного. Например, в патенте США № 5849992 описан способ экспрессии антитела в молочной железе трансгенного млекопитающего. Конструируют трансген, который включает специфичный к молоку промотор и нуклеиновые кислоты, кодирующие представляющее интерес антитело и сигнальную последовательность для секреции. Молоко, полученное от самок таких трансгенных млекопитающих, включает представляющее интерес антитело, которое секретируется в нем. Антитело может быть очищено от молока, или, для некоторых применений, используется непосредственно. Также описаны животные, содержащие одну или несколько нуклеиновых кислот по изобретению.

Антитела согласно настоящему изобретению могут быть выделены изнутри или снаружи (например, из среды) клетки-хозяина, и очищены с получением, по существу, очищенных и однородных антител. Способы выделения и очистки, обычно используемые для очистки антител, могут применяться для выделения и очистки антител и не ограничены каким-либо конкретным способом. Антитела могут быть выделены и очищены путем соответствующего выбора и комбинирования способов, таких как колончатая хроматография, фильтрация, ультрафильтрация, высаливание, осаждение растворителем, экстракция растворителем, дистилляция, иммунопреципитация, электрофорез в SDS-полиакриламидном геле, электрофокусирование, диализ и рекристаллизация. Хроматография включает, например, аффинную хроматографию, ионообменную хроматографию, гидрофобную хроматографию, гель-фильтрацию, хроматографию с обращенной фазой и адсорбционную хроматографию (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed. Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996). Можно проводить хроматографию с использованием жидкой фазы, например высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) и жидкостную экспресс-хроматографию белков (ЖЭХБ). Колонки, используемые для аффинной хроматографии, включают колонку белка А и колонку белка G. Примеры колонок с использованием колонки белка А включают Nupur D, POROS и Sepharose FF (GE Healthcare Biosciences). Настоящее изобретение также включает антитела с высокой степенью очистки, полученные с использованием указанных способов очистки.

Характеристика антител.

Свойства описанных в настоящем изобретении антител, относящиеся к связыванию с BDCA2, могут быть измерены с помощью любого стандартного способа, например, одного или нескольких из следующих способов: ОСТЕТ®, поверхностный плазмонный резонанс (SPR), анализ BIACORE™, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), ИФА (иммуноферментный анализ), РИА (радиоиммуноанализ) и передача энергии посредством флуоресцентного резонанса (FRET).

Связывающее взаимодействие рассматриваемого белка (антитела против BDCA2) и мишени (например, BDCA2) можно проанализировать с помощью систем ОСТЕТ®. В этом способе используется один из нескольких вариантов инструментов (например, ОСТЕТ® QK^c и QK), производимые компанией ForteBio, для определения белковых взаимодействий, специфичности связывания и картирования эпитопов. Системы ОСТЕТ® представляют легкий способ мониторинга связывания в режиме реального вре-

мени путем измерения изменений в поляризованном свете, который проходит через специальный накопитель, а затем возвращается к датчику.

Связывающее взаимодействие рассматриваемого белка (антитела против BDCA2) и мишени (например, BDCA2) можно проанализировать с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Анализ SPR или анализ биомолекулярного взаимодействия (BIA) выявляет биоспецифичные взаимодействия в режиме реального времени, без выделения какого-либо из взаимодействующих элементов. Изменения массы на поверхности связывания (что является индикатором факта связывания) на матрице BIA вызывает изменения показателя преломления света вблизи поверхности (оптическое явление поверхностного плазмонного резонанса (SPR)). Изменения преломления генерируют детектируемый сигнал, которые измеряют как показатель реакций между биологическими молекулами в реальном времени. Способы с использованием SPR описаны, например, в патенте США № 5641640; в публикациях Raether (1988) *Surface Plasmons* Springer Verlag; Sjolander and Urbaniczky (1991) *Anal. Chem.* 63: 2338-2345; Szabo et al. (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699-705, и в он-лайн ресурсах, предоставленных BIAcore International AB (Упсала, Швеция). Информацию, полученную в анализе SPR, можно использовать для точного и количественного измерения константы равновесной диссоциации (K_d) и кинетических параметров связывания биомолекулы с мишенью, в том числе K_{on} и K_{off} .

Эпитопы также можно непосредственно картировать путем оценки способности различных антител конкурировать друг с другом за связывание с BDCA2 человека, с помощью хроматографических способов (*Pharmacia BIAtechnology Handbook*, "Epitope Mapping", раздел 6.3.2, (май 1994 года); также см. Johnes et al. (1993) *J. Immunol. Methods*, 160: 191-198).

При проведении иммуноферментного анализа образец, содержащий антитело, например супернатант культуры антитело-продуцирующих клеток или очищенные антитела, добавляют в планшет, покрытый антигеном. Добавляют вторичное антитело, меченное ферментом, например щелочной фосфатазой, планшет инкубируют, после промывки добавляют ферментный субстрат, такой как р-нитрофенилфосфат, и измеряют коэффициент поглощения для оценки активности связывания антигена.

Дополнительно, общее руководство по оценке антител, например информацию об анализах вестерн-блоттинга и иммунопреципитации, можно найти в издании *Antibodies: A Laboratory Manual*, Ed. By Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Press (1988)).

Антитела с измененной эффекторной функцией.

Взаимодействие антител и комплексов антитело-антиген с клетками иммунной системы запускает множество ответов, называемых в изобретении эффекторными функциями.

Иммуноопосредованные эффекторные функции включают два основных механизма: антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) и комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC). Оба механизма опосредуются константной областью иммуноглобулинового белка. Таким образом, Fc домен антитела является частью, которая определяет взаимодействие с иммунными эффекторными механизмами.

Антитела IgG активируют эффекторные пути иммунной системы путем связывания с членами семейства рецепторов Fc γ клеточной поверхности и с C1q из системы комплемента. Лигирование эффекторных белков кластерными антителами запускает множество ответов, включающих высвобождение воспалительных цитокинов, регуляцию продукции антигена, эндоцитоз и гибель клеток. Для некоторых клинических применений эти ответы имеют решающее значение для эффективности моноклонального антитела. В других клинических применениях они вызывают нежелательные побочные эффекты, такие как воспаление и устранение антиген-несущих клеток. Таким образом, настоящее изобретение дополнительно относится к связывающимся с BDCA2 белкам, включающим антитела, с измененными, например, с увеличенными или уменьшенными эффекторными функциями.

Эффекторную функцию антитела против BDCA2 по настоящему изобретению можно определять с помощью одного из множества известных анализов. Эффекторная функция антитела против BDCA2 может быть увеличена или снижена по сравнению со вторым антителом против BDCA2. В некоторых вариантах осуществления вторым антителом против BDCA2 может быть любое антитело, которое специфично связывается с BDCA2. В других вариантах осуществления вторым BDCA2-специфичным антителом может быть любое из антител по изобретению, такое как В1В059. В других вариантах осуществления, где рассматриваемое антитело против BDCA2 было модифицировано для увеличения или уменьшения эффекторной функции, второе антитело против BDCA2 может представлять собой немодифицированную или исходную версию антитела.

Эффекторные функции включают антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC), в результате чего антитела связываются с Fc рецепторами на цитотоксических Т-клетках, клетках-натуральных киллерах (НК), макрофагах, что приводит к гибели клеток, и комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC), которая вызывает гибель клеток, индуцированную посредством активации каскада комплемента (см. публикации Daeron, *Annu. Rev. Immunol.*, 15:203-234 (1997); Ward and Ghetie, *Therapeutic. Immunol.*, 2:77-94 (1995); и Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991)). Для этих эффекторных функций обычно необходимо, чтобы Fc-область была объединена со связывающим доменом (например, с переменным доменом антитела) и могла быть оценена с помощью стандартных

анализов, которые известны в данной области техники (см., например, патенты WO 05/018572, WO 05/003175 и US 6242195).

Можно избежать эффекторных функций путем использования фрагментов антител, лишенных Fc-домена, таких как Fab, Fab₂ или одноцепочечного Fv. В качестве альтернативы, можно использовать антитело подтипа IgG4, которое связывается с FcγRI, но плохо связывается с C1q и FcγRII и RIII. Подтип IgG2 также проявляет уменьшенное связывание с Fc рецепторами, но сохраняет значительное связывание с аллотипом H131 из FcγRIIa и C1q. Таким образом, требуются дополнительные изменения в последовательности Fc для устранения связывания со всеми Fc рецепторами и с C1q.

Несколько эффекторных функций антитела, в том числе ADCC, опосредуются рецепторами Fc (FcR), которые связываются с Fc-областью антитела. Можно модулировать аффинность антитела для конкретного FcR, и, следовательно, эффекторную активность, опосредуемую этим антителом, путем изменения аминокислотной последовательности и/или путем посттрансляционных модификаций в Fc-области и/или в константной области антитела.

Классификация FcR сделана по их специфичности для изоформ иммуноглобулинов: Fc рецепторы для IgG антител называются FcγR, для IgE они называются FcεR, для IgA они называются FcαR и так далее. Были определены три подкласса FcγR: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16). Существует два типа FcγRII и FcγRIII: FcγRIIa (CD32a) и FcγRIIb (CD32b); и FcγRIIIa (CD16a) и FcγRIIIb (CD16b). Поскольку каждый подкласс FcγR кодируется двумя или тремя генами, и альтернативный сплайсинг РНК дает в результате множество транскриптов, существует широкое разнообразие изоформ FcγR. Например, FcγRII (CD32) включает изоформы IIa, IIb1, IIb2, IIb3 и IIc.

Сайт связывания с FcγR на антителах человека и мыши уже был картирован на так называемой "нижней шарнирной области", состоящей из остатков 233-239 (нумерация по индексу EU в соответствии со следующими публикациями: Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), Woof et al., Molec. Immunol. 23:319-330 (1986); Duncan et al., Nature 332:563 (1988); Canfield and Morrison, J. Exp. Med. 173: 1483-1491 (1991); Chappel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9036-9040 (1991)). Среди остатков 233-239, остатки P238 и S239 входят в число тех, которые, возможно, являются вовлеченным в связывание. Другие ранее указанные области, возможно, участвующие в связывании с FcγR, представляют собой: G316-K338 (IgG человека) с человеческим FcγRI (Woof et al., Mol. Immunol., 23:319-330 (1986)); K274-R301 (IgG1 человека) с человеческим FcγRIII (Sarmay et al. Molec. Immunol. 21:43-51 (1984)), и Y407-R416 (IgG человека) с человеческим FcγRIII (Gergely et al., Biochem. Soc. Trans. 12:739-743 (1984) и Shields et al., J. Biol. Chem. 276: 6591-6604 (2001), Lazar G.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 103:4005-4010(2006)). Эти и другие участки или области аминокислотных остатков, участвующих в связывании с FcR, могут быть очевидными для специалиста после изучения кристаллических структур комплексов Ig-FcR (см., например, Sondermann et al. 2000 Nature 406(6793):267-73, и Sondermann et al. 2002 Biochem. Soc. Trans. 30(4):481-6). Соответственно, антитела против BDCA2 по настоящему изобретению включают модификации одного или нескольких из вышеуказанных остатков (для увеличения или уменьшения эффекторной функции, когда это необходимо).

Другой подход для изменения эффекторной функции моноклонального антитела включает мутации аминокислот на поверхности моноклонального антитела, которое вовлечено в эффекторные связывающие взаимодействия (Lund L. et al. (1991) J. Immunol. 147(8):2657-62; Shields R.L. et al. (2001) J. Biol. Chem. 276(9): 6591-604).

Способы повышения эффекторной функции антител хорошо известны в данной области техники (см., например, Kelley et al., Methods Mol. Biol., 901:277-93(2012); Natsume et al., Drug Des. Devel. Ther., 3:7-16 (2009), US 8188231, US 7960512). В одном из вариантов осуществления BDCA2 антитела имеют одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь или больше аминокислотных замен в положениях, которые выбирают из группы, состоящей из

221, 222, 223, 224, 225, 227, 228, 230, 231, 232, 233, 234,
235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 246, 247,
249, 255, 258, 260, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269,
270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 278, 280, 281, 282, 283,
284, 285, 286, 288, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297,
298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 313, 317, 318, 320,
322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333,
334, 335, 336 и 337,

где нумерация остатков в Fc-области соответствует индексу EU по Kabat. В некоторых вариантах осуществления антитела BDCA2 имеют одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь или больше аминокислотных замен, выбираемых из группы, состоящей из

034757

D221K, D221Y, K222E, K222Y, T223E,
T223K, H224E, H224Y, T225E, T225K, T225W, P227E, P227G, P227K,
P227Y, P228E, P228G, P228K, P228Y, P230A, P230E, P230G, P230Y,
A231E, A231G, A231K, A231P, A231Y, P232E, P232G, P232K, P232Y,
E233A, E233D, E233F, E233G, E233H, E233I, E233K, E233L, E233M,
E233N, E233Q, E233R, E233S, E233T, E233V, E233W, E233Y, L234A,
L234D, L234E, L234F, L234G, L234H, L234I, L234K, L234M, L234N,
L234P, L234Q, L234R, L234S, L234T, L234V, L234W, L234Y, L235A,
L235D, L235E, L235F, L235G, L235H, L235I, L235K, L235M, L235N,
L235P, L235Q, L235R, L235S, L235T, L235V, L235W, L235Y, G236A,
G236D, G236E, G236F, G236H, G236I, G236K, G236L, G236M, G236N,
G236P, G236Q, G236R, G236S, G236T, G236V, G236W, G236Y, G237D,
G237E, G237F, G237H, G237I, G237K, G237L, G237M, G237N, G237P,
G237Q, G237R, G237S, G237T, G237V, G237W, G237Y, P238D, P238E,
P238F, P238G, P238H, P238I, P238K, P238L, P238M, P238N, P238Q,
P238R, P238S, P238T, P238V, P238W, P238Y, S239D, S239E, S239F,
S239G, S239H, S239I, S239K, S239L, S239M, S239N, S239P, S239Q,
S239R, S239T, S239V, S239W, S239Y, V240A, V240I, V240M, V240T,
F241D, F241E, F241L, F241R, F241S, F241W, F241Y, F243E, F243H,
F243L, F243Q, F243R, F243W, F243Y, P244H, P245A, K246D, K246E,
K246H, K246Y, P247G, P247V, D249H, D249Q, D249Y, R255E, R255Y,
E258H, E258S, E258Y, T260D, T260E, T260H, T260Y, V262A, V262E,
V262F, V262I, V262T, V263A, V263I, V263M, V263T, V264A, V264D,
V264E, V264F, V264G, V264H, V264I, V264K, V264L, V264M, V264N,
V264P, V264Q, V264R, V264S, V264T, V264W, V264Y, D265F, D265G,
D265H, D265I, D265K, D265L, D265M, D265N, D265P, D265Q, D265R,
D265S, D265T, D265V, D265W, D265Y, V266A, V266I, V266M, V266T,
S267D, S267E, S267F, S267H, S267I, S267K, S267L, S267M, S267N,
S267P, S267Q, S267R, S267T, S267V, S267W, S267Y, H268D, H268E,
H268F, H268G, H268I, H268K, H268L, H268M, H268P, H268Q, H268R,
H268T, H268V, H268W, E269F, E269G, E269H, E269I, E269K, E269L,
E269M, E269N, E269P, E269R, E269S, E269T, E269V, E269W, E269Y,
D270F, D270G, D270H, D270I, D270L, D270M, D270P, D270Q, D270R,
D270S, D270T, D270W, D270Y, P271A, P271D, P271E, P271F, P271G,
P271H, P271I, P271K, P271L, P271M, P271N, P271Q, P271R, P271S,
P271T, P271V, P271W, P271Y, E272D, E272F, E272G, E272H, E272I,
E272K, E272L, E272M, E272P, E272R, E272S, E272T, E272V, E272W,
E272Y, V273I, K274D, K274E, K274F, K274G, K274H, K274I, K274L,
K274M, K274N, K274P, K274R, K274T, K274V, K274W, K274Y, F275L,

034757

F275W, N276D, N276E, N276F, N276G, N276H, N276I, N276L, N276M,
N276P, N276R, N276S, N276T, N276V, N276W, N276Y, Y278D, Y278E,
Y278G, Y278H, Y278I, Y278K, Y278L, Y278M, Y278N, Y278P, Y278Q,
Y278R, Y278S, Y278T, Y278V, Y278W, D280G, D280K, D280L, D280P,
D280W, G281D, G281E, G281K, G281N, G281P, G281Q, G281Y, V282E,
V282G, V282K, V282P, V282Y, E283G, E283H, E283K, E283L, E283P,
E283R, E283Y, V284D, V284E, V284L, V284N, V284Q, V284T, V284Y,
H285D, H285E, H285K, H285Q, H285W, H285Y, N286E, N286G, N286P,
N286Y, K288D, K288E, K288Y, K290D, K290H, K290L, K290N, K290W,
P291D, P291E, P291G, P291H, P291I, P291Q, P291T, R292D, R292E,
R292T, R292Y, E293F, E293G, E293H, E293I, E293L, E293M, E293N,
E293P, E293R, E293S, E293T, E293V, E293W, E293Y, E294F, E294G,
E294H, E294I, E294K, E294L, E294M, E294P, E294R, E294S, E294T,
E294V, E294W, E294Y, Q295D, Q295E, Q295F, Q295G, Q295H, Q295I,
Q295M, Q295N, Q295P, Q295R, Q295S, Q295T, Q295V, Q295W, Q295Y,
Y296A, Y296D, Y296E, Y296G, Y296H, Y296I, Y296K, Y296L, Y296M,
Y296N, Y296Q, Y296R, Y296S, Y296T, Y296V, N297D, N297E, N297F,
N297G, N297H, N297I, N297K, N297L, N297M, N297P, N297Q, N297R,
N297S, N297T, N297V, N297W, N297Y, S298D, S298E, S298F, S298H,
S298I, S298K, S298M, S298N, S298Q, S298R, S298T, S298W, S298Y,
T299A, T299D, T299E, T299F, T299G, T299H, T299I, T299K, T299L,
T299M, T299N, T299P, T299Q, T299R, T299S, T299V, T299W, T299Y,
Y300A, Y300D, Y300E, Y300G, Y300H, Y300K, Y300M, Y300N, Y300P,
Y300Q, Y300R, Y300S, Y300T, Y300V, Y300W, R301D, R301E, R301H,
R301Y, V302I, V303D, V303E, V303Y, S304D, S304H, S304L, S304N,
S304T, V305E, V305T, V305Y, W313F, K317E, K317Q, E318H, E318L,
E318Q, E318R, E318Y, K320D, K320F, K320G, K320H, K320I, K320L,
K320N, K320P, K320S, K320T, K320V, K320W, K320Y, K322D, K322F,
K322G, K322H, K322I, K322P, K322S, K322T, K322V, K322W, K322Y,
V323I, S324D, S324F, S324G, S324H, S324I, S324L, S324M, S324P,
S324R, S324T, S324V, S324W, S324Y, N325A, N325D, N325E, N325F,
N325G, N325H, N325I, N325K, N325L, N325M, N325P, N325Q, N325R,
N325S, N325T, N325V, N325W, N325Y, K326I, K326L, K326P, K326T,
A327D, A327E, A327F, A327H, A327I, A327K, A327L, A327M, A327N,
A327P, A327R, A327S, A327T, A327V, A327W, A327Y, L328A, L328D,
L328E, L328F, L328G, L328H, L328I, L328K, L328M, L328N, L328P,

L328Q, L328R, L328S, L328T, L328V, L328W, L328Y, P329D, P329E, P329F, P329G, P329H, P329I, P329K, P329L, P329M, P329N, P329Q, P329R, P329S, P329T, P329V, P329W, P329Y, A330E, A330F, A330G, A330H, A330I, A330L, A330M, A330N, A330P, A330R, A330S, A330T, A330V, A330W, A330Y, P331D, P331F, P331H, P331I, P331L, P331M, P331Q, P331R, P331T, P331V, P331W, P331Y, I332A, I332D, I332E, I332F, I332H, I332K, I332L, I332M, I332N, I332P, I332Q, I332R, I332S, I332T, I332V, I332W, I332Y, E333F, E333H, E333I, E333L, E333M, E333P, E333T, E333Y, K334F, K334I, K334L, K334P, K334T, T335D, T335F, T335G, T335H, T335I, T335L, T335M, T335N, T335P, T335R, T335S, T335V, T335W, T335Y, I336E, I336K, I336Y, S337E, S337H и S337N,

где нумерация остатков в Fc Fc-области соответствует индексу EU по Kabat. В конкретном варианте осуществления BDCA2 антитела содержат одну, две или три из следующих мутаций: S239D, S239D/I332E, S239D/I332E/A330L, S239D/I332E/G236A, S298A, A330L I332E, E333A и K334A.

Наличие олигосахаридов, конкретно N-связанного олигосахарида на аспарагине-297 в области CH2 IgG1, является важным для связывания с FcγR, а также с C1q. Уменьшение содержания фукозы в антителах улучшает эффекторную функцию (см., например, US 8163551). В некоторых вариантах осуществления BDCA2 антитела имеют сниженное фукозилрование и аминокислотные замены, которые повышают эффекторную функцию (например, одну, две или три из следующих мутаций S298A, E333A и K334A). Эффекторная функция также может быть достигнута путем получения и экспрессии антител против BDCA2 по изобретению, в присутствии ингибиторов альфа-маннозидазы I (например, кифунензина) в концентрации ингибитора приблизительно от 60 до 200 нг/мл (например, 60, 75, 100, 150 нг/мл). Антитела, экспрессируемые в присутствии ингибиторов альфа-маннозидазы I, содержат в основном гликаны олигоманнозного типа и обычно демонстрируют повышенную активность ADCC и аффинность к FcγRIIIA, но при этом уменьшенное связывание с C1q.

Антитела против BDCA2 по изобретению с повышенной эффекторной функцией включают антитела с повышенной аффинностью связывания с одним или несколькими рецепторами Fc (FcR) по сравнению с исходным или невариантным антителом против BDCA2. Соответственно, антитела против BDCA2 с повышенной аффинностью связывания с FcR включают антитела против BDCA2, которые проявляют аффинность связывания с одним или несколькими рецепторами Fc, увеличенную в 1,5, 2, 2,5, 3, 4 или 5 раз или выше по сравнению с исходным или невариантным антителом против BDCA2. В некоторых вариантах осуществления антитело против BDCA2 с повышенной эффекторной функцией связывается с FcR с аффинностью примерно в 10 раз выше, чем аффинность связывания исходного или невариантного антитела. В других вариантах осуществления антитело против BDCA2 с повышенной эффекторной функцией связывается с FcR с аффинностью приблизительно в 15 раз выше или приблизительно в 20 раз выше, чем аффинность связывания исходного или невариантного антитела. Рецептор FcR может представлять собой один или несколько из FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII, и их изоформ, и FcεR, FcμR, FcδR и/или FcαR. В конкретных вариантах осуществления антитело против BDCA2 с повышенной эффекторной функцией проявляет аффинность связывания с FcγRIIIa, которая ниже в 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5 раз или еще ниже.

Для снижения эффекторной функции можно использовать комбинации сегментов различных подтипов последовательностей (например, комбинации IgG2 и IgG4), чтобы достичь большего снижения связывания с рецепторами Fcγ, чем каждый из этих подтипов по отдельности (Armour et al. Eur. J. Immunol., 29: 2613-1624 (1999); Mol. Immunol., 40: 585-593 (2003)). Дополнительно, можно удалять сайты N-гликозилрования в качестве способа снижения эффекторной функции. В данной области техники известно большое количество вариантов Fc с измененной и/или уменьшенной аффинностью для некоторых или всех подтипов рецепторов Fc (и, следовательно, для эффекторных функций). См., например, патенты US 2007/0224188, US 2007/0148171, US 2007/0048300, US 2007/0041966, US 2007/0009523, US 2007/0036799, US 2006/0275283, US 2006/0235208, US 2006/0193856, US 2006/0160996, US 2006/0134105, US 2006/0024298, US 2005/0244403, US 2005/0233382, US 2005/0215768, US 2005/0118174, US 2005/0054832, US 2004/0228856, US 2004/132101, US 2003/158389; см. также патенты US 7183387, 6737056, 6538124, 6528624, 6194551, 5624821, 5648260.

Антитела против BDCA2 по настоящему изобретению с пониженной эффекторной функцией включают антитела, связывающиеся с одним или несколькими Fc-рецепторами (FcR) с пониженной аффинностью по сравнению с исходным или невариантным антителом против BDCA2. Соответственно, антитела против BDCA2 с пониженной аффинностью связывания с FcR включают антитела против BDCA2, которые проявляют аффинность связывания с одним или несколькими рецепторами Fc, увеличенную в 1,5, 2,

2,5, 3, 4 или 5 раз или выше по сравнению с исходным или невариантным антителом против BDCA2. В некоторых вариантах осуществления антитело против BDCA2 со сниженной эффекторной функцией связывается с FcR с аффинностью примерно в 10 раз ниже, чем аффинность связывания исходного или невариантного антитела. В других вариантах осуществления антитело против BDCA2 со сниженной эффекторной функцией связывается с FcR с аффинностью приблизительно в 15 раз ниже или приблизительно в 20 раз ниже, чем аффинность связывания исходного или невариантного антитела. Рецептор FcR может представлять собой один или несколько из FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII, и их изоформ, и FcεR, FcμR, FcδR и/или FcαR. В конкретных вариантах осуществления антитело против BDCA2 со сниженной эффекторной функцией проявляет аффинность связывания с FcγRIIIa в 1,5, 2, 2,5, 3, 4, в 5 раз или еще ниже.

Механизмом CDC является связывание комплекса антитело-антиген с комплементом, что приводит к активации каскада комплемента и созданию комплекса мембранной атаки. Активация классического пути комплемента инициируется связыванием первого компонента системы комплемента (C1q) с антителами (соответствующего подкласса), которые связаны с их когнатным антигеном; таким образом, активация каскада комплемента частично регулируется аффинностью связывания иммуноглобулина с белком C1q. Чтобы активировать каскад комплемента, для C1q необходимо связываться по меньшей мере с двумя молекулами из IgG1, IgG2 или IgG3, но при этом только с одной молекулой IgM, прикрепленной к антигенной мишени (Ward and Ghetie, *Therapeutic Immunology* 2:77-94 (1995) стр. 80). Для оценки активации комплемента можно выполнять анализ CDC, например, как описано авторами Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods*, 202:163 (1996).

Было высказано предположение, что в связывание с C1q вовлечены различные остатки молекулы IgG, включающие в себя остатки Glu318, Lys320 и Lys322 в домене CH2, аминокислотный остаток 331, расположенный, в свою очередь, в непосредственной близости от той же бета-цепи, остатки Lys235 и Gly237, расположенные в нижней шарнирной области, и остатки от 231 до 238, расположенные в N-концевой области домена CH2 (см., например, Xu et al., *J. Immunol.* 150:152A (Abstract) (1993), WO94/29351; Tao et al., *J. Exp. Med.*, 178:661-667 (1993); Brekke et al., *Eur. J. Immunol.*, 24:2542-47 (1994); Burton et al.; *Nature*, 288:338-344(1980); Duncan and Winter, *Nature* 332:738-40(1988); Idusogie et al. *J. Immunol.* 164:4178-4184 (2000; US 5648260, US 5624821).

Антитела против BDCA2 с улучшенным связыванием с C1q могут содержать аминокислотную замену в одном, двух, трех или четырех положениях аминокислот 326, 327, 333 и 334 Fc-области человеческого IgG, где нумерация остатков в Fc-области IgG соответствует индексу EU по Kabat. В одном из вариантов осуществления антитела против BDCA2 включают следующие аминокислотные замены: K326W/E333S, которые достоверно увеличивают связывание IgG1 антитела с C1q (Steurer W. et al., *J. Immunol.*, 155(3):1165-74(1995)).

Антитела против BDCA2 со сниженным связыванием с C1q могут содержать аминокислотную замену в одном, двух, трех или четырех положениях аминокислот 270, 322, 329 и 331 Fc-области человеческого IgG, где нумерация остатков в Fc-области IgG соответствует индексу EU по Kabat. В качестве примера в IgG1, две мутации в COOH-концевой области CH2-домена человеческого IgG1-K322A и P329A-не активируют путь CDC, и показывают в результате более чем 100-кратное снижение связывания с C1q (US 6242195).

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления антитела против BDCA2 по настоящему изобретению проявляют увеличенное или уменьшенное связывание с белком комплемента по сравнению со вторым антителом против BDCA2. В некоторых вариантах осуществления антитело против BDCA2 по изобретению проявляет повышенное или сниженное связывание с C1q с коэффициентом приблизительно в 1,5 раза или больше, приблизительно в 2 раза или больше, приблизительно в 3 раза или больше, приблизительно в 4 раза или больше, приблизительно в 5 раз или больше, приблизительно в 6 раз или больше, приблизительно в 7 раз или больше, приблизительно в 8 раз или больше, приблизительно в 9 раз или больше, приблизительно в 10 раз или больше, или приблизительно в 15 раз или больше, по сравнению со вторым антителом против BDCA2.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько из этих остатков может быть модифицирован, замещен или удален, или один или несколько аминокислотных остатков могут быть вставлены таким образом, чтобы увеличить или уменьшить CDC активность антител против BDCA2, представленных в изобретении.

В некоторых других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителам против BDCA2, которые проявляют пониженное связывание с одним или несколькими рецепторами FcR, но сохраняют свою способность связываться с комплементом (например, в той же степени, или, в некоторых вариантах осуществления, в меньшей степени, чем нативное, невариантное или исходное антитело против BDCA2).

Соответственно, антитела против BDCA2 по настоящему изобретению могут связываться и активировать комплемент, и в то же время проявлять уменьшенное связывание с Fc-рецептором, таким как, например, FcγRIIIa (например, FcγRIIIa, который экспрессируется на тромбоцитах). Такое антитело с уменьшенным или отсутствующим связыванием с FcγRIIIa (например, с FcγRIIIa, экспрессируемым на

тромбоцитах), но которое может связываться C1q и активировать, по меньшей мере в некоторой степени, каскад комплемента, будет уменьшать риск тромбозомболических осложнений при сохранении возможно желательных эффекторных функций. В альтернативных вариантах осуществления антитела против BDCA2 по настоящему изобретению проявляют уменьшенное связывание с одним или несколькими Fc-рецепторами, но сохраняют свою способность связываться с одним или несколькими другими FcR. См., например, патенты US 2007-0009523, 2006-0194290, 2005-0233382, 2004-0228856 и 2004-0191244, в которых описаны различные модификации аминокислот, создающие антитела с уменьшенным связыванием с FcRI, FcRII и/или FcRIII, а также аминокислотные замены, которые приводят к увеличению связывания с одним FcR, но к снижению связывания с другим FcR.

Соответственно, эффекторные функции, охватывающие константную область антитела против BDCA2, можно модулировать путем изменения свойств константной области и, в частности, Fc-области. В некоторых вариантах осуществления антитело против BDCA2, имеющее увеличенную или уменьшенную эффекторную функцию, сравнивается со вторым антителом с эффекторной функцией, которое может представлять собой невариантное, нативное или исходное антитело, содержащее нативную константную область или Fc-область, которая опосредует эффекторную функцию.

Нативная последовательность Fc-области или константной области содержит аминокислотную последовательность, идентичную цепи аминокислотной последовательности Fc или константной области, встречающейся в природе. Предпочтительно, контрольная молекула, используемая для оценки относительной эффекторной функции, содержит тот же тип/подтип Fc-области, как и тестируемое или вариантное антитело. Вариантная или измененная Fc-область или константная область содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от нативной последовательности области тяжелой цепи вследствие по меньшей мере одной аминокислотной модификации (такой как, например, посттрансляционная модификация, аминокислотная замена, инсерция или делеция). Соответственно, вариантная константная область может содержать одну или несколько аминокислотных замен, делеций или инсерций, которые вызывают изменение посттрансляционных модификаций, в том числе, например, изменение характера гликозилирования. Исходное антитело или Fc-область, например, представляет собой вариант с нормальной эффекторной функцией, который используется для конструирования константной области (т.е. Fc), имеющей измененную, например, увеличенную эффекторную функцию.

Антитела с измененной (например, увеличенной) эффекторной функцией (функциями) можно создавать генноинженерным способом или продуцировать антитела с вариантными константными областями, Fc-областями или областями тяжелых цепей. Можно использовать технологии рекомбинантной ДНК и/или условия культивирования клеток и экспрессии для получения антител с измененной функцией и/или активностью. Например, можно использовать технологии рекомбинантной ДНК для конструирования одной или нескольких аминокислотных замен, делеций или инсерций в областях (таких как, например, Fc или константные области), которые влияют на функцию антител, в том числе на эффекторные функции. Альтернативно, изменения в посттрансляционных модификациях, таких как, например, характеристики гликозилирования, могут быть достигнуты путем манипуляций с клеткой-хозяином и с условиями культивирования и экспрессии, при которых получают антитело.

Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к антителу против BDCA2, содержащему одну или несколько последовательностей CDR тяжелой цепи, выбираемых из VH CDR1 из SEQ ID NO: 9, VH CDR2 из SEQ ID NO: 10 и VH CDR3 из SEQ ID NO: 11; или одну или несколько альтернативных последовательностей CDR тяжелой цепи, выбираемых из VH CDR1 из SEQ ID NO: 8, VH CDR2 из SEQ ID NO: 10 и VH CDR3 из SEQ ID NO: 11; или одну или несколько альтернативных последовательностей CDR тяжелой цепи, выбираемых из: VH CDR1 из SEQ ID NO: 89, VH CDR2 из SEQ ID NO: 91 и VH CDR3 из SEQ ID NO: 11; или одну или несколько альтернативных последовательностей CDR тяжелой цепи, выбираемых из: VH CDR1 из SEQ ID NO: 9, VH CDR2 из SEQ ID NO: 92 и VH CDR3 из SEQ ID NO: 11; или одну или несколько альтернативных последовательностей CDR тяжелой цепи, выбираемых из: VH CDR1 из SEQ ID NO: 90, VH CDR2 из SEQ ID NO: 93 и VH CDR3 из SEQ ID NO: 94, при этом антитело дополнительно содержит вариантную Fc-область, которая обуславливает увеличенную или уменьшенную эффекторную функцию по сравнению с нативной или исходной Fc-областью. В других вариантах осуществления антитело против BDCA2 содержит по меньшей мере две области CDR (или альтернативные CDR), а в других вариантах осуществления антитело содержит все три последовательности CDR тяжелой цепи (или альтернативные CDR). Такие антитела против BDCA2 (i) ингибируют секрецию интерферонов типа I и/или интерферонов типа III в дополнение к другим цитокинам и хемокинам из плазматоидных дендритных клеток; и/или (ii) индуцируют или усиливают истощение плазматоидных дендритных клеток *in vitro*.

Другие варианты осуществления настоящего изобретения относятся к антителу против BDCA2, содержащему последовательности CDR легкой цепи CDR1 VL из SEQ ID NO: 5, CDR2 VL из SEQ ID NO: 6 и CDR3 VL из SEQ ID NO: 7, при этом антитело дополнительно содержит вариантную Fc-область, которая обуславливает повышение или снижение эффекторной функции по сравнению с нативной или исходной Fc-областью. Такие антитела против BDCA2: (i) ингибируют секрецию интерферонов типа I и/или интерферонов типа III в дополнение к другим цитокинам и хемокинам из плазматоидных денд-

ритных клеток; и/или (ii) индуцируют или усиливают истощение плазмцитоподобных дендритных клеток *in vitro*.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения, антитело против BDCA2 с повышенной или пониженной эффекторной функцией содержит все три последовательности CDR легкой цепи или альтернативные CDR легкой цепи из SEQ ID NO: 3 и содержит все три последовательности CDR тяжелой цепи или альтернативные CDR тяжелой цепи из SEQ ID NO: 4.

В других вариантах осуществления изобретение относится к антителу против BDCA2, содержащему последовательность VL, которая содержит SEQ ID NO: 23, при этом антитело дополнительно содержит вариантную Fc-область, которая обуславливает снижение эффекторной функции по сравнению с нативной или исходной Fc-областью. В других вариантах осуществления изобретение относится к антителу против BDCA2, содержащему последовательность VH, которая содержит SEQ ID NO: 24, при этом антитело дополнительно содержит вариантную Fc-область, которая обуславливает снижение эффекторной функции по сравнению с нативной или исходной Fc-областью.

Способы создания какого-либо из вышеуказанных вариантов антител против BDCA2, содержащих аминокислотные замены, хорошо известны в данной области техники. Эти способы включают без ограничения получение с помощью сайт-направленного (или олигонуклеотид-опосредованного) мутагенеза, ПЦР-мутагенеза и кассетного мутагенеза полученной молекулы ДНК, кодирующей это антитело или по меньшей мере константную область этого антитела. Сайт-направленный мутагенез хорошо известен в данной области (см., например, Carter et al., *Nucleic Acids Res.*, 13:4431-4443 (1985) и Kunkel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:488 (1987)). ПЦР-мутагенез также подходит для получения вариантов аминокислотной последовательности исходного полипептида. См. Higuchi, в руководстве *PCR Protocols*, стр. 177-183 (Academic Press, 1990); и Vallette et al., *Nuc. Acids Res.* 17:723-733 (1989). Кассетный мутагенез представляет собой другой способ получения вариантных последовательностей, который основан на методике, описанной Wells et al., *Gene*, 34: 315-323 (1985).

Антитела против BDCA2 с измененным гликозилированием.

Различные гликоформы могут глубоко влиять на свойства лекарства, в том числе на его фармакокинетику, фармакодинамику, взаимодействие с рецептором и специфичность нацеливания на ткани (Graddis et al., 2002, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 3:285-297). В частности, олигосахаридная структура антител может влиять на свойства, относящиеся к устойчивости к протеазе, времени полувыведения из сыворотки антитела, опосредуемого рецептором FcRn, фагоцитозу и обратной связи антитела, в дополнение к эффекторным функциям антитела (например, к связыванию с комплексом комплемента C1, который индуцирует CDC, и к связыванию с рецепторами FcγR, которые отвечают за модулирование пути ADCC) (Nose and Wigzell, 1983; Leatherbarrow and Dwek, 1983; Leatherbarrow et al., 1985; Walker et al., 1989; Carter et al., 1992, *PNAS*, 89:4285-4289).

Соответственно, другие способы модуляции эффекторной функции антител включают изменение гликозилирования константной области антитела. Измененное гликозилирование включает, например, уменьшение или увеличение количества гликозилированных остатков, изменение характера или местоположения гликозилированных остатков, а также изменение структуры сахара (сахаров). Олигосахариды, обнаруживаемые в человеческих IgG, влияют на степень их эффекторной функции (Raju T.S., *Bio-Process International April* 2003, 44-53); микрогетерогенность олигосахаридов человеческих IgG может влиять на биологические функции, такие как CDC и ADCC, связывание с различными Fc-рецепторами и связывание с белком C1q (Wright A. and Morrison S.L. *TIBTECH* 1997, 15 26-32; Shields et al. *J. Biol. Chem.* 2001 276(9):6591-604; Shields et al. *J. Biol. Chem.* 2002; 277(30): 26733-40; Shinkawa et al. *J. Biol. Chem.* 2003 278(5):3466-73; Umana et al. *Nat. Biotechnol.* 1999 Feb; 17(2):176-80). Например, способность IgG связываться с C1q и активировать каскад комплемента может зависеть от присутствия, отсутствия или модификации углеводной группы, расположенной между двумя доменами CH2 (который обычно заякорен на Asn297) (Ward and Ghetie, *Therapeutic Immunology* 2:77-94(1995).

Сайты гликозилирования в Fc-содержащем полипептиде, например в антителе, таком как антитело IgG, можно идентифицировать с помощью стандартных методик. Идентификацию сайта гликозилирования можно осуществлять экспериментальным путем или на основе анализа последовательностей или данных моделирования. Были описаны консенсусные мотивы, т.е. аминокислотная последовательность, распознаваемая различными гликозилтрансферазами. Например, консенсусный мотив для N-связанного мотива гликозилирования часто представляет собой NXT или NXS, где X может быть любой аминокислотой, за исключением пролина. Также был описан ряд алгоритмов для обнаружения потенциального мотива гликозилирования. Соответственно, для идентификации потенциальных сайтов гликозилирования в пределах антитела или фрагмента, содержащего Fc-область, последовательность антитела исследуют, например, с помощью общедоступных баз данных, таких как веб-сайт, предоставленный Центром анализа биологических последовательностей (Center for Biological Sequence Analysis, см. ресурс Nef-NGlyc в отношении предполагаемых сайтов N-связанного гликозилирования и ресурс NetOGlyc в отношении предпологаемых сайтов O-связанного гликозилирования).

В исследованиях *in vivo* было подтверждено снижение эффекторной функции α-гликозилированных антител. Например, α-гликозилированные анти-CD8 антитела не в состоянии истощать мышечные клетки,

несущие CD8 (Isaacs, 1992, *J. Immunol.*, 148: 3062), и α -гликозилированные анти-CD3 антитела не индуцируют синдром высвобождения цитокинов у мышей или людей (Boyd 1995, см. выше; Friend, 1999, *Transplantation* 68:1632). α -гликозилированные формы BDCA2-антитела также имеют сниженную эффекторную функцию.

Важно отметить, что в то время как удаление гликанов в домене CH2, вероятно, оказывает существенное влияние на эффекторную функцию, другие функциональные и физические свойства антитела остаются неизменными. В частности, было показано, что удаление гликанов не влияет или имеет очень незначительный эффект на период полувыведения из сыворотки и связывание с антигеном (Nose, 1983 *supra*; Tao, 1989 *supra*; Dogai, 1991 *supra*; Hand, 1992 *supra*; Hobbs, 1992 *Mol. Immunol.* 29:949).

Можно модифицировать или изменять антитела против BDCA2 по настоящему изобретению, чтобы вызвать увеличение или уменьшение эффекторной функции (функций) (по сравнению со вторым BDCA2-специфичным антителом). Способы изменения гликозилирования антител описаны, например, в патентах US 6350861 и 5714350 US, в WO 05/18572 и WO 05/03175; эти способы можно использовать для получения антител против BDCA2 по настоящему изобретению с измененным, уменьшенным гликозилированием или без гликозилирования.

Показания.

Антитела против BDCA2 по изобретению можно применять для лечения или предотвращения различных иммунологических нарушений, таких как воспалительные расстройства. Антитела против BDCA2 являются полезными для лечения или профилактики таких заболеваний по меньшей мере потому, что они нарушают функцию или истощают клетки рDC, и/или ингибируют воспалительные цитокины и хемокины, продуцируемые клетками рDC, и/или подавляют CD32a, и/или ингибируют стимуляцию иммунных комплексов посредством рDC, и/или подавляют или вызывают шеддинг CD62L. Антитела против BDCA2 по изобретению можно комбинировать с противомаларийным агентом (например, с HCQ) для улучшения терапевтического эффекта при лечении воспалительных и аутоиммунных заболеваний. Антитела против BDCA2 можно использовать для снижения уровня цитокинов и хемокинов, таких как: интерфероны I типа, интерфероны III типа, ИЛ-6, ФНО- α , MIP-1- α /CCL3, MIP-1- β /CCL4, CCL5/RANTES или IP10/CXCL10. Интерфероны I типа составляют многочисленное семейство цитокинов, включающих 13 подтипов ИФН α , ИФН- β , - ϵ , - κ , - ω , - δ и - τ (Theofilopoulos, *Annu. Rev. Immunol.*, 23:307-36 (2005)). Интерфероны типа III состоят из трех молекул ИФН- λ , называемых ИФН- λ 1, ИФН- λ 2 и ИФН- λ 3 (называемых ИЛ-29, ИЛ-28A и ИЛ-28B соответственно). Антитела против BDCA2 по изобретению путем истощения и/или подавления функции рDC обеспечивают более надежный подход к лечению, чем методики лечения, пытающиеся снизить содержание специфичных подтипов ИФН с помощью нейтрализующих антител. Дополнительно, подход с рDC-ориентированным лечением антителами против BDCA2 является более селективным и потенциально безопаснее, чем глобальная блокада ответа ИФН. Например, антитела против BDCA2 по изобретению эффективно устраняют рDC-продуцируемые интерфероны типа I, сохраняя при этом другие источники ИФН, которые могут быть необходимы в случае вирусных инфекций.

Термин "лечение" относится к введению описанной в изобретении композиции в таком количестве, порядке и/или по схеме, которая эффективно улучшает состояние, симптом или параметр, связанный с заболеванием, или служит для профилактики прогрессирования или обострения заболевания (в том числе вторичного нарушения, вызванного заболеванием), как в статистически значимой степени, так и в такой степени, которую может выявить специалист в данной области техники.

Заболевания или состояния, которые можно лечить с помощью антитела против BDCA2 по изобретению, включают, например, системную красную волчанку (СКВ) (например, волчанку в средней и тяжелой степени тяжести), кожную волчанку, дискоидную волчанку, волчаночный нефрит.

СКВ представляет собой хроническое аутоиммунное заболевание, при котором множество органов повреждается иммунными комплексами и аутоантителами, связывающимися с тканями (см. *Guidelines for Referral and Management of Systemic Lupus Erythematosus in Adults, Arthritis & Rheumatism*, 42(9): 1785- 1795 (1999)). Аутоантитела присутствуют при СКВ и могут предшествовать развитию клинического заболевания (Arbuckle et al., *N. Engl. J. Med.*, 349(16):1526-33 (2003)). Интернализация иммунных комплексов, содержащих аутоантитела, посредством Fc-рецепторов приводит к выработке интерферона I типа, что в свою очередь способствует снижению толерантности и закреплению порочного круга аутоиммунитета (Means et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1062:242-51 (2005)). СКВ является гетерогенной в отношении своего клинического проявления, течения и прогноза заболевания и генетических факторов. afroамериканцы имеют повышенный риск развития СКВ, которая часто проявляется в более тяжелой степени по сравнению с белыми пациентами. Ранее было выявлено, что недостаток комплемента является фактором риска для развития СКВ. Еще раньше было описано, что эта предрасположенность обусловлена генетическим полиморфизмом, связанным с сигнальным путем интерферона I типа. Например, антидвухцепочечная ДНК и анти-Ro аутоантитела связаны с определенным гаплотипом регуляторного фактора 5, фактора транскрипции интерферона (IRF5). Этот гаплотип также является прогностическим для высокого уровня ИФН α в сыворотке крови больных СКВ (Niewold et al., *Ann. Rheum. Dis.*, 71(3):463-8 (2012)). Более высокие уровни ИФН α коррелируют с большей распространенностью полиорганного по-

ражения у больных СКВ (Bengtsson et al., *Lupus*, 9(9):664-71 (2000)). Кроме того, заметным фактором при СКВ является так называемая "интерфероновая подпись". Интерфероновая подпись представляет собой паттерн экспрессии мРНК индуцибельных генов интерферона. Подпись интерферона I типа выявляется более чем у половины больных СКВ и связана с более активным развитием заболевания (Baechler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(5):2610-5(2003)). В клиническую практику уже вошли моноклональные антитела ИФН α , и результаты I фазы клинических испытаний сифалимумаба и ронтализумаба показали дозозависимое снижение подписи ИФН типа I в цельной крови больных СКВ (McBride et al., *Arthritis Rheum.*, 64(11): 3666-76 (2012); Yao et al., *Arthritis Rheum.*, (6):1785-96(2009)). Были разработаны достоверные показатели для оценки активности заболевания и степени тяжести заболевания (например, средней степени, тяжелое) (см., например, Gladman, *Prognosis and treatment of systemic lupus erythematosus*, *Curr. Opin. Rheumatol.*, 8:430-437(1996); Kalunian et al., *Definition, classification, activity and damage indices*. в книге: *Dubois' lupus erythematosus*. 5th ed., Baltimore: Williams and Wilkins; стр. 19-30(1997)).

Индивиду, который имеет риск возникновения вышеперечисленных болезней, у которого диагностирована или имеется одна из этих патологий, можно вводить антитела против BDCA2 в таком количестве и в течение такого времени, чтобы достичь общего терапевтического эффекта. Антитела против BDCA2 можно вводить как единственный препарат (монотерапия), так и в комбинации с другими агентами (комбинированная терапия). В одном из вариантов осуществления противомаларийное средство является средством для применения в комбинированной терапии с антителом против BDCA2, описанным в изобретении. В другом варианте осуществления средством для применения в комбинированной терапии с антителом против BDCA2, описанным в изобретении, является ингибитор сигнального пути TLR7 и/или TLR9. В другом варианте осуществления средством для применения в комбинированной терапии с антителом против BDCA2, описанным в изобретении, является кортикостероид. В некоторых вариантах осуществления агент для применения в комбинированной терапии с антителом против BDCA2, описанным в изобретении, представляет собой противомаларийный препарат и/или ингибитор киназы (например, ингибитор ВТК (например, ибрутиниб (PCI-32765), AVI-292, ONOo-WG-307), ингибитор JAK1, ингибитор JAK2, ингибитор JAK3, ингибитор Тук2). В конкретном варианте осуществления агент для применения в комбинированной терапии с антителом против BDCA2, описанным в изобретении, представляет собой гидроксихлорохин. Количество и сроки введения при комбинированной терапии могут быть такими, которые обеспечивают, например, аддитивный или синергический терапевтический эффект.

Фармацевтические композиции.

Можно создавать рецептуру фармацевтической композиции антитела против BDCA2 по изобретению, для введения индивиду, например, для лечения расстройства, описанного в настоящем изобретении. Обычно фармацевтическая композиция включает фармацевтически приемлемый носитель. Используемый в изобретении "фармацевтически приемлемый носитель" включает любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и задерживающие всасывание агенты и т.п., которые являются физиологически совместимыми. Композиция может включать фармацевтически приемлемую соль, например, кислотно-аддитивную соль или основно-аддитивную соль (см., например, Berge S.M. et al., (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19).

Создание фармацевтических композиций представляет собой общепризнанную область техники, и дополнительно описано, например, в следующих руководствах: Gennaro (ed.), *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20th ed., Lippincott, Williams & Wilkins (2000) (ISBN: 0683306472); Ansel et al., *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 7th Ed., Lippincott Williams & Wilkins Publishers (1999) (ISBN: 0683305727); и Kibbe (ed.), *Handbook of Pharmaceutical Excipients American Pharmaceutical Association*, 3rd ed. (2000) (ISBN: 091733096X).

Фармацевтические композиции могут иметь различные формы. Они включают, например, жидкие, полутвердые и твердые лекарственные формы, такие как жидкие растворы (например, инъекционные и инфузионные растворы), дисперсии или суспензии, таблетки, пилюли, порошки, липосомы и суппозитории. Предпочтительная форма может зависеть от предполагаемого способа введения и терапевтического применения. Обычно композиции для агентов по изобретению представлены в форме инъекционных и инфузионных растворов.

В одном из вариантов осуществления композиция антитела против BDCA2 по изобретению сделана с материалами-наполнителями, такими как хлорид натрия, цитрат натрия, двухосновный натрия фосфат гептагидрат, одноосновной натрия фосфат, Твин-80 и стабилизатор. Композицию можно делать, например, в буферном растворе при подходящей концентрации, и ее можно хранить при температуре от 2 до 8°C. В некоторых других вариантах осуществления уровень pH композиции находится в диапазоне приблизительно от 5,8 до 6,6 (например, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6).

Фармацевтические композиции могут также включать агенты, которые уменьшают агрегацию антитела против BDCA2 при получении композиции. Примеры состоящих из метионина, аргинина, лизина, аспарагиновой кислоты, глицина и глутаминовой кислоты. Эти аминокислоты можно добавлять в композицию в концентрации от приблизительно 0,5 мМ до приблизительно 145 мМ (например, 0,5, 1, 2, 5, 10,

25, 50, 100 мМ. Фармацевтические композиции могут также включать сахар (например, сахарозу, трегалозу, маннит, сорбит или ксилит) и/или модификатор тоничности (например, хлорид натрия, маннит или сорбит) и/или поверхностно-активное вещество (например, полисорбат-20 или полисорбат-80).

Такие композиции можно вводить парентеральным путем (например, внутривенно, подкожно, внутрибрюшинно или внутримышечно). В одном из вариантов осуществления композиции антитела против BDCA2 вводят подкожно. В одном из вариантов осуществления композиции антитела против BDCA2 вводят внутривенно. Выражения "парентеральное введение" и "вводят парентерально", как используется в изобретении, означают способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно путем инъекции, и включают, без ограничения, внутривенный, внутримышечный, внутриартериальный, интратекальный, интракапсулярный, интраорбитальный, внутрисердечный, внутрикожный, внутрибрюшинный, транстрахеальный, подкожный, подэпидермисный, внутрисуставной, субкапсулярный, субарахноидальный, интраспинальный, эпидуральный и внутригрудинный путь введения путем инъекции и инфузии.

Композиция может быть приготовлена в виде раствора, микроэмульсии, дисперсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для стабильного хранения при высокой концентрации. Стерильные инъекционные растворы можно приготовить путем включения в них описанного в изобретении агента в необходимом количестве в подходящем растворителе, с одним ингредиентом или с комбинацией перечисленных выше ингредиентов, как это необходимо, с последующей стерилизацией фильтрованием. Обычно дисперсии делают путем включения описанного в изобретении агента в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из вышеперечисленных. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и сушка вымораживанием, в результате чего получают порошок из описанного в изобретении агента плюс какой-либо дополнительный желателный ингредиент из раствора, предварительно стерилизованного фильтрованием. Можно сохранять надлежащую текучесть раствора, например, с помощью использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и с использованием поверхностно-активных веществ. Пролонгированная абсорбция инъекционных композиций может быть достигнута путем включения в композицию агента, который замедляет абсорбцию, например, моностеаратные соли и желатин.

В некоторых вариантах осуществления композицию антитела против BDCA2 можно делать с носителем, который будет защищать соединение от быстрого высвобождения, например в композиции с регулируемым высвобождением, включающей в себя имплантаты и микроинкапсулированные системы доставки. Можно использовать биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, например этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевую кислоту, коллаген, полиортоэфир и полимолочную кислоту. Многие способы получения таких композиций запатентованы или общеизвестны. См., например, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York (1978).

В одном из вариантов осуществления фармацевтическая композиция содержит антитело против BDCA2 (например, В1В059) в концентрации приблизительно от 0,5 до 300 мг/мл (например, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250 мг/мл), с добавлением в рецептуру цитрата натрия, хлорида натрия и необязательно Твин-80 (0,01-0,1%, например, 0,03, 0,05 или 0,7%). Уровень pH композиции может быть в пределах от 5,5 до 7,5 (например, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,3).

Введение.

Антитело против BDCA2 можно вводить индивиду, например, нуждающемуся в этом индивиду, например, индивиду-человека, различными способами. Для многих применений путем введения является один из следующих: внутривенная инъекция или инфузия (в/в), подкожная инъекция (п/к), внутрибрюшинная (в/б) или внутримышечная инъекция. Также можно применять внутрисуставную доставку. Также можно применять другие способы парентерального введения. Примеры таких путей введения включают внутриартериальные, интратекальные, интракапсулярные, внутриорбитальные, внутрисердечные, внутрикожные, транстрахеальные, субкутикулярные, внутрисуставные, субкапсулярные, субарахноидальные, спинальные, эпидуральные и внутригрудинные инъекции. В некоторых случаях введение может быть пероральным.

Путь введения и/или схему введения антитела также можно адаптировать для конкретного случая, например с помощью мониторинга индивида, например с помощью томографического исследования, например для визуализации опухоли.

Антитело можно вводить в виде фиксированной дозы или в дозировке мг/кг. Также можно выбирать дозу с тем, чтобы уменьшить или не допустить выработки антител против антитела против BDCA2. Схемы дозирования регулируют таким образом, чтобы обеспечить желаемую реакцию, например, терапевтический ответ или комбинаторной терапевтический эффект. В общем, дозы антитела против BDCA2 (и необязательно второго средством) можно использовать для обеспечения индивида этим средством в биодоступном количестве. Например, можно вводить дозы в диапазоне от 0,1 до 100 мг/кг, от 0,5 до 100 мг/кг, от 1 мг/кг до 100 мг/кг, от 0,5 до 20 мг/кг, от 0,1 до 10 мг/кг или от 1 до 10 мг/кг. Также можно применять другие дозы. В конкретных вариантах осуществления индивиду, нуждающемуся в лечении

антителом против BDCA2, вводят антитело в дозе 2, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 35 или 40 мг/кг.

Композиция может содержать антитело против BDCA2 в количестве приблизительно от 1 до 100 мг/мл или приблизительно от 10 до 100 мг/мл, или приблизительно от 50 до 250 мг/мл, или приблизительно от 100 до 150 мг/мл, или приблизительно от 100 до 250 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело против BDCA2 находится в композиции преимущественно в мономерной форме, например, мономерная форма составляет по меньшей мере приблизительно 90, 92, 94, 96, 98, 98,5 или 99% композиции. Некоторые композиции антитела против BDCA2 могут содержать агрегаты в количестве менее чем приблизительно 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,3 или 0,1%, что определяют, например, с помощью УФ при A280 нм. Некоторые композиции антитела против BDCA2 содержат менее чем приблизительно 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,3, 0,2 или 0,1% фрагментов, что определяют, например, с помощью УФ при A280 нм.

Дозированная лекарственная форма или "фиксированная доза", как используется в изобретении, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для индивидов, получающих лечение; каждая единица содержит predetermined количество активного соединения, рассчитанное на получение желаемого терапевтического эффекта, в комбинации с необходимым фармацевтическим носителем и, возможно, в комбинации с другим агентом. Может назначаться введение единичной дозы или множественных доз. В качестве альтернативы, или в дополнение, антитело можно вводить путем непрерывной инфузии.

Дозу антитела против BDCA2 можно вводить, например, с периодическим интервалом в течение определенного периода времени (курс лечения), достаточного для введения по меньшей мере 2, 3, 5, 10 доз или больше, например, один раз в день или два раза в день, или приблизительно от одного до четырех раз в неделю, или предпочтительно один раз в неделю, один раз в две недели (каждые две недели), каждые три недели, каждый месяц, например, в течение приблизительно от 1 до 12 недель, предпочтительно от 2 до 8 недель, более предпочтительно приблизительно от 3 до 7 недель, и еще более предпочтительно приблизительно 4, 5 или 6 недель. Факторы, которые могут оказывать влияние на дозировку и время, необходимые для эффективного лечения индивида, включают, например, степень тяжести заболевания или расстройства, композицию, пути введения, предшествующие курсы лечения, общее состояние здоровья и/или возраст индивида, а также наличие других заболеваний. Кроме того, лечение индивида терапевтически эффективным количеством соединения может включать единственный вид лечения или, предпочтительно, может включать ряд лечебных мероприятий.

Если индивид имеет риск развития описанного в изобретении иммунологического заболевания, антитело можно вводить до полного наступления иммунологического заболевания, например, в качестве превентивной меры. Продолжительность такого профилактического лечения может быть однократное введение антитела, или лечение может быть продолжительным (например, в виде множественных доз). Например, индивид, с риском возникновения заболевания или с предрасположенностью к заболеванию, может получать лечение антителом в течение нескольких дней, недель, месяцев или даже лет, чтобы предотвратить возникновение или угрозу заболевания.

Фармацевтическая композиция может включать "терапевтически эффективное количество" средства по изобретению. Эти эффективные количества могут быть определены исходя из эффекта вводимого средства или комбинаторного эффекта агентов, если применяется более одного средства. Терапевтически эффективное количество средства может также варьироваться в зависимости от таких факторов, как патологическое состояние, возраст, пол и вес индивидуума и от способности соединения вызывать желаемый ответ у индивидуума, например уменьшение интенсивности по меньшей мере одного параметра заболевания или облегчение по меньшей мере одного симптома заболевания. Терапевтически эффективным также является такое количество, при котором терапевтически полезные эффекты композиции превалируют над любыми токсическими или неблагоприятными эффектами.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело против BDCA2 вводят подкожно в концентрации от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 300 мг/мл (например, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250 мг/мл). В одном из вариантов осуществления антитело против BDCA2 вводят подкожно в концентрации 50 мг/мл. В другом варианте осуществления антитело против BDCA2 вводят внутривенно в концентрации от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 300 мг/мл. В конкретном варианте осуществления антитело против BDCA2 вводят внутривенно в концентрации 50 мг/мл.

Примеры

В целях лучшей иллюстрации изобретения приведены следующие примеры, которые не следует толковать как ограничение объема изобретения. В отношении указанных конкретных материалов они служат всего лишь для целей иллюстрации и не предназначены для ограничения изобретения. Специалист в данной области техники может разработать эквивалентные способы или реагенты без осуществления изобретательской деятельности и без отступления от объема настоящего изобретения.

Пример 1. Клонирование тяжелой и легкой цепей мышинового антитела против BDCA2.

Гибридома 24F4 мыши (IgG1 каппа) была получена из линии Balb/c мышей, иммунизированных с помощью генной пушки плазмидой pEAG2456, экспрессирующим вектором млекопитающих, который ко-экспрессирует полноразмерный BDCA2 человека, и кДНК FcεRIγ (см. пример 17).

Общую клеточную РНК из клеток мышинной гибридомы 24F4 получали с использованием мини-набора Qiagen RNeasy согласно протоколу, рекомендованному производителем. кДНК, кодирующие варибельные области тяжелой и легкой цепей, были клонированы с помощью РТ-ПЦР из общей клеточной РНК с использованием набора для синтеза кДНК GE Healthcare First Strand cDNA Synthesis согласно протоколу, рекомендованному производителем, с использованием случайных гексамеров для прайминга.

Для ПЦР-амплификации мышинных варибельных доменов иммуноглобулина с интактными сигнальными последовательностями был использован коктейль из вырожденных прямых праймеров, которые гибридизуются с множеством сигнальных последовательностей семейства генов мышинного иммуноглобулина и единственного обратного праймера, специфичного для 5'-конца мышинного константного домена, как описано в Current Protocols in Immunology (Willey and Sons, 1999). Варибельный домен тяжелой цепи 24F4 амплифицировали со следующими праймерами: 5' ACT AGT CGA CAT GRA CTT TGG GYT CAG CTT GRT TT 3' (R=A/G и Y=C/T) (SEQ ID NO: 25) и 5' AGG TCT AGA AYC TCC ACA CAC AGG RRC CAG TGG ATA GAC 3' (R=A/G и Y=C/T) (SEQ ID NO: 26). Варибельный домен легкой цепи 24F4 с ее сигнальной последовательностью амплифицировали со следующими праймерами: 5' ACT AGT CGA CAT GGA GWC AGA CAC ACT CCT GYT ATG GGT 3' (W=A/T и Y=C/T) (SEQ ID NO: 27) и 5' GCG TCT AGA ACT GGA TGG TGG GAG ATG GA 3' (SEQ ID NO: 28).

Продукты ПЦР подвергали гель-очистке с использованием набора для экстракции гелей Qiagen Qi-aquick согласно протоколу, рекомендованному производителем. Очищенные продукты ПЦР субклонировали в вектор Invitrogen pCR2.1ТОРО, используя их комплект для клонирования ТОРО согласно протоколу, рекомендованному производителем. Вставки из нескольких независимых субклонов секвенировали для установления консенсусной последовательности (из тяжелой цепи клона с наименованием pYL647 и из легкой цепи клона pYL651).

Вариации в последовательностях среди клонов согласуются с положениями вырождения в праймерах. Идентичность иммуноглобулина была подтверждена в анализе BLAST последовательностей варибельных доменов. Выведенные зрелые N-концевые последовательности легкой и тяжелой цепи совпадают с аутентичными последовательностями цепей 24F4, полученными из данных деградации по Эдману. Для определения выведенных интактных массивов из гипотетических последовательностей, собранных путем добавления выведенных последовательностей константных доменов из клонированных кДНК тяжелой цепи и легкой цепи каппа из IgG1 Balb/c в выведенные зрелые последовательности варибельных доменов, которые согласуются с массивами из полученных из гибридомы 24F4 очищенных последовательностей, использовали масс-спектроскопию.

Варибельный домен (VH) тяжелой цепи мышинного 24F4 является членом мышинной подгруппы III (D). Ниже показана последовательность зрелой варибельной области тяжелой цепи мышинного 24F4 с CDR H1, CDR H2 и CDR H3, которая подчеркнута, в следующем порядке

```
1 DVKLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS TYTMSWVRQT PEKRLWVAT
51 ISPGDSFGYY YPDSVQGRFT ISRDNAKNTL FLQMSSLKSE DTAMYYCTRD
101 IYYNYGAWFA YWGQGLVTV SA (SEQ ID NO:29)
```

Варибельный домен легкой цепи (VL) мышинного 24F4 является членом подгруппы III мышинной каппа. Последовательность зрелого варибельного домена легкой цепи мышинного 24F4 CDR L1, CDR L2 и CDR L3, подчеркнутая в таком порядке, показана ниже

```
1 DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCKASQSVY YDGDSYMNYWY QQKPGQPPKL
51 LIYAASTLES GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQQCNEDPR
101 TFGGGTKLEI K (SEQ ID NO:30)
```

Непарный цистеин присутствует в остатке 95 в CDR13 в VL последовательности мышинной 24F4, показанной выше (по номенклатуре Kabat этот Cys является остатком 91).

Пример 2. Химеризация мышинного антитела 24F4.

Использовали кДНК, кодирующую варибельные домены мышинного 24F4, для создания векторов для экспрессии в мышинных-человеческих химерах (ch24F4), в которых варибельные области mu24F4 были связаны с константными областями человеческого IgG1 и каппа.

Варибельные домены были впервые сконструированы с помощью ПЦР для добавления 5' последовательности Козака и для введения человеческих последовательностей и новых сайтов рестрикции в сочленения FR4/константных доменов, для слияния с константными доменами человеческого иммуноглобулина. Последовательности варибельной области кДНК в полученных плаزمиде подтверждали путем секвенирования ДНК. Варибельный домен тяжелой цепи в плазмиде pYL647 использовали в качестве матрицы для ПЦР с праймерами 5' GAT CCG CGG CCG CAC CAT GGA CTT TGG GTT CAG CTT G 3' (SEQ ID NO: 31) (добавление сайта NotI и последовательности Козака) и 5' GAT GGG CCC TTG GTG GAA GCT GCA GAG ACA GTG ACC AGA G 3' (SEQ ID NO: 32) (добавление сайта ApaI и последовательности CH1 человеческого IgG1 на сочленение FR4/константный домен), и проводили амплификацию 0,45 кб фрагмента, который очищали и субклонировали в клонирующий вектор Invitrogen pCRBlunt1-ТОРО, создавая pYL668. Для конструирования химерной тяжелой цепи фрагмент 0,45 кб NotI-ApaI из

конструкции pYL668 переменного домена тяжелой цепи 24F4 и фрагмент 0,98 кб Apal-BamHI из pEAG1325 (плазмиды, содержащей подтвержденную последовательность кДНК константного домена тяжелой цепи huIgG1 (с генетически удаленным С-концевым остатком лизина IgG1) субклонировали в каркас вектора экспрессионного вектора pV90 (в котором экспрессия гетерологичного гена контролируется промотором CMV-IE и сигналом полиаденилирования человеческого гормона роста, и который несет селективный маркер dhfr, см. патент US 7494805), для получения вектора экспрессии pYL672. Последовательность кДНК тяжелой цепи в полученной плазмиде pYL672 была подтверждена секвенированием ДНК. Выведенная зрелая ch24F4-huIgG1 последовательность тяжелой цепи белка, кодируемого pYL672, показана ниже

```

1  DVKLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS TYTMSWVRQT PEKRLEWVAT
51  ISPGDSFGYY YPDSVQGRFT ISRDNAKNTL FLQMSSLKSE DTAMYYCTRD
101 IYYNYGAWFA YWGQGTLLVTV SAASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL
151 VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPVSSSLGT
201 QTYICNVNHNK PSNTKVDKVV EPKSCDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP
251 KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NQYVDGVEVH NAKTKPREEQ
301 YNSTYRVVSV LTVLHQDWLW GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE
351 PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP
401 PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKLSLSLSP
451 G (SEQ ID NO:33)

```

А-гликозилированная форма с низкой эффекторной функцией ch24F4 также была сконструирована путем субклонирования фрагмента 0,45 кб NotI-ApaI из конструкции pYL668 переменного домена тяжелой цепи 24F4 и фрагмента 0,98 кб Apal-BamHI из pEAG2412 (плазмиды, содержащей подтвержденную последовательность кДНК константного домена гибридной тяжелой цепи S228P/N299Q huIgG4/IgG1 с генетически удаленным С-концевым остатком лизина IgG1), субклонирована в каркас вектора экспрессионного вектора pV90, создавая плазмиду pYL670. Последовательность кДНК тяжелой цепи в полученной плазмиде pYL670 была подтверждена секвенированием ДНК. Выведенная зрелая последовательности белка гибридной тяжелой цепи agly ch24F4-huIgG4/GL, кодируемая pYL670, показана ниже

```

1  DVKLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS TYTMSWVRQT PEKRLEWVAT
51  ISPGDSFGYY YPDSVQGRFT ISRDNAKNTL FLQMSSLKSE DTAMYYCTRD
101 IYYNYGAWFA YWGQGTLLVTV SAASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL
151 VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPVSSSLGT
201 KTYTCNVNHNK PSNTKVDKRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK
251 DTLMISRTPV VTCVVVDVSD EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFQS
301 TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV
351 YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTPPVL
401 DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNNHTQ KLSLSLSPG

```

(SEQ ID NO:34)

Переменный домен легкой каппа-цепи в плазмиде pYL651 использовали в качестве матрицы для ПЦР с праймерами 5' GAT CCG CGG CCG CCA CCA TGG AGA CAG ACA CAC TCC TG 3' (SEQ ID NO: 35) (добавление сайта NotI 5' и последовательности Козака) и 5' CCA CCG TAC GTT TGA TTT CCA GCT TGG TGC 3' (SEQ ID NO: 36) (добавление сайта 3' BsiWI и человеческой каппа последовательности константной области в сочленении FR4/константный домен) путем амплификации фрагмента 0,4 кб, который очищали и субклонировали в клонирующий вектор Invitrogen pCRBluntII/TOPO, получая pYL669. Последовательности кДНК переменной области в плазмиде pYL669 были подтверждены путем секвенирования ДНК. Для конструирования химерной легкой цепи фрагмент 0,4 кб NotI-BsiWI переменной домена легкой цепи из pYL669 и фрагмент 0,34 кб BsiWI-BamHI из плазмиды pEAG1572 (содержащий подтвержденную последовательность кДНК константного домена человеческой легкой каппа-цепи) субклонировали в каркас вектора pV100 (в котором экспрессия гетерологичного гена контролируется промотором CMV-IE и сигналом полиаденилирования человеческого гормона роста и который несет селективный маркер неомицина), с получением вектора экспрессии pYL671. Последовательность кДНК легкой цепи в полученной плазмиде pYL671 была подтверждена секвенированием ДНК. Выведенная зрелая последовательность белка ch24F4 человеческой легкой каппа цепи, которая кодируется pYL671, показана ниже

```

1 DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCKASQSVD YDGDSYMNWY QQKPGQPPKL
51 LIYAASTLES GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQQCNEDPR
101 TFGGGTKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV
151 QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLT STLTLKADY EKHKVVYACEV
201 THQGLSSPVT KSFNRGEC (SEQ ID NO:37)

```

Векторы экспрессии (векторы pYL670 или pYL672 тяжелой цепи ch24F4 и вектор pYL671 легкой цепи ch24F4) котрансфицировали в клетки 293-EBNA, и трансфицированные клетки исследовали на секрецию антител и специфичность (клетки, трансфицированные пустым вектором и вектором молекулярно клонированного неродственного мАт служили в качестве контроля). Вестерн-блот анализ (разработанный с тяжелой и легкой цепью античеловеческого антитела) кондиционированной среды показал, что ch24F4-трансфицированные клетки синтезируют и эффективно секретируют тяжелые и легкие цепи. Анализ прямого FACS связывания с поверхностью BDCA2 человека подтвердил специфичность ch24F4. Показатель EC₅₀ связывания обоих вариантов ch24F4 эквивалентен связыванию мышинового мАт 24F4 при прямом связывании с поверхностью экспрессируемым BDCA2 человека, что показано в анализе FACS с титрованием и разведением. Стабильные клеточные линии CHO, секретирующие ch24F4-huIgG1, мАт каппа и гибридное мАт каппа agly ch24F4-huIgG4/GL, были получены путем ко-трансфекции с pYL672/pYL671 и pYL670/pYL671 соответственно.

Пример 3. Удаление непарного остатка цистеина в CDRL3 химерного антитела 24F4.

Поскольку непарные цистеины в экспонированной CDR могут вызывать гетерогенность или нестабильность продукта, были сконструированы варианты ch24F4 C95S и C95T путем сайт-направленного мутагенеза с использованием плазмиды pYL671 экспрессионного вектора легкой цепи ch24F4 в качестве матрицы.

Сайт-направленный мутагенез проводили с использованием набора для мутагенеза QuikChange II фирмы Agilent согласно протоколу, рекомендованному производителем. Вариант C95S был сконструирован с использованием мутагенного праймера 5' GCA ACC TAT TAC TGT CAA CAA AGT AAT GAG GAT CCT CGG AC 3' (SEQ ID NO: 38) и его обратного комплемента, с встроенным новым сайтом HincII, и была получена плаزمида pEAG2678. Вариант C95T был сконструирован с использованием мутагенного праймера 5' CAA CCT ATT ACT GTC AGC AAA CTA ATG AAG ATC CTC GGA CGT TCG 3' (SEQ ID NO: 39) и его обратного комплемента, с удалением сайта BamHI, и была получена плаزمида pEAG2679. Мутантные плазмиды идентифицировали путем скрининга изменений вставленных сайтов рестрикции. Полноразмерные кДНК-последовательности легкой цепи в полученных плаزمиде были подтверждены секвенированием ДНК. ch24F4 дикого типа и варианты мАт C95S и C95T транзиторно экспрессировались в клетках 293E путем котрансфекции pYL672 и pYL671, pEAG2678 или pEAG2679. Кондиционированную среду собирали через 2 дня после трансфекции. Титры (анализированные с помощью ОСТЕТ наконечниками анти-человеческой Fc) обоих вариантов были сходны с титрами дикого типа ch24F4, и Вестерн-блот анализы с SDS-PAGE в невозстанавливающих условиях показали отсутствие большой агрегации или очевидного клипирования относительно мАт дикого типа ch24F4. Прямое связывание посредством FACS на поверхности BDCA2 указывает, что тогда, как очевидный показатель EC₅₀ связывания у варианта C95S был эквивалентен этому показателю у дикого типа ch24F4, EC₅₀ связывания варианта C95T был снижен в несколько раз. Кондиционированную среду, содержащую мАт ch24F4 и вариант C95, анализировали с помощью ОСТЕТ на связывание с эктодоменом BDCA2 человека. Антитела из кондиционированной среды из транзиторно трансфицированных клеток связывали с анти-человеческими Fc на наконечниках, затем мономерные huBDCA2 пропускали через наконечники ОСТЕТ для анализа связывания и диссоциации. Определенная с помощью ОСТЕТ кинетика связывания и диссоциации ch24F4 дикого типа и вариантного C95S была эквивалентной, тогда как скорость диссоциации вариантного C95T была выше, чем у дикого типа ch24F4. На основании этих результатов C95S были включены в CDRL3 легкой цепи гуманизованного 24F4.

Пример 4. Примеры тяжелых и легких цепей гуманизованного 24F4.

Примеры семи гуманизованных (hu) тяжелых цепей 24F4 (каркас huIGHV3-21*01/24F4 VH CDR) и соответствующие им ДНК-последовательности показаны ниже. Области CDR 1, 2 и 3 в каждой тяжелой цепи подчеркнуты в указанном порядке. Каркасные обратные мутации показаны строчным жирным шрифтом. Изменения в остатках CDR мышинового 24F4 показаны штриховкой в CDR последовательностях. Область CDR1 варибельной тяжелой цепи (CDR H1) показана в соответствии с определением по Chothia, которое на 5 аминокислот длиннее, чем определение по Kabat; выделенные остатки в CDR H1 указывают на дополнительные 5 аминокислот (а именно, GFTFS (SEQ ID NO: 12)), которые образуют область CDR H1 по Chothia. Основная N-концевая аминокислота (т.е. глутаминовая кислота в вариантах H0, H1, H2, H3 и аспарагиновая кислота в вариантах H4, H5 и H6) из домена варибельной области тяжелой цепи, могут связываться непосредственно с антигеном, и влиять на аффинность связывания. Скрытый остаток в положении 49 по Kabat может влиять на конформацию CDR2 тяжелой цепи (серин в вариантах H0, H1, H2, H3 и аланин в вариантах H4, H5 и H6). Остаток в положении 93 по Kabat может влиять

на спаривание тяжелой и легкой цепи (аланин в вариантах H0, H1, H2, H3, и треонин в вариантах H4, H5 и H6. Аминокислотные остатки в областях CDR H1, H2 и H3, которые отличаются от мышинных CDR H1, H2, H3 из 24F4, заштрихованы.

Вариант H0

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS**CAAS**GFTFSTYTMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGGSTYYADS
VKGRFTISRDN**AKNSLYLQ**MNSLRAEDTAVYYCARDIYYNYGAW**FAY**WGQGLTVTVSS (SEQ
ID NO:40)

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCC
TGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTACCTATAACCATGTCTTGGGTTTCGCCAAGCACCGGGC
AAGGGACTGGAGTGGGTCTCTGCTATTAGTGGTAGCGGAGGTAGTACATACTATGCAGACAGT
GTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAGTCTGTACCTGCAAATGAAC
AGTCTGAGGGCAGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCTCGAGATATCTACTATAATTACGGA
GCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTAGC (SEQ ID NO:41)
(pYL742)

Вариант H1

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS**CAAS**GFTFSTYTMSWVRQAPGKLEWVS**T**ISPGDSFGYYPDS
VKGRFTISRDN**AKNSLYLQ**MNSLRAEDTAVYYCARDIYYNYGAW**FAY**WGQGLTVTVSS (SEQ
ID NO:42)

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCC
TGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTACCTATAACCATGTCTTGGGTTTCGCCAAGCACCGGGC
AAGGGACTGGAGTGGGTCTCTACCATTAGTCCAGGAGACAGTTTCGGATACTATCCAGACAGT
GTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAGTCTGTACCTGCAAATGAAC
AGTCTGAGGGCAGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCTCGAGATATTTACTATAATTACGGA
GCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTAGC (SEQ ID NO:43)
(pYL743)

Вариант H2

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS**CAAS**GFTFSTYTMSWVRQAPGKLEWVS**T**ISPGDSSTIYYAD
SVKGRFTISRDN**AKNSLYLQ**MNSLRAEDTAVYYCARDIYYNYGAW**FAY**WGQGLTVTVSS
(SEQ ID NO:44)

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCC
TGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTACCTATAACCATGTCTTGGGTTTCGCCAAGCACCGGGC
AAGGGACTGGAGTGGGTCTCTACCATTAGTCCAGGAGACAGTAGCACTATCTACTATGCAGAC
AGTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAGTCTGTACCTGCAAATG
AACAGTCTGAGGGCAGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCCCGAGATATTTACTATAATTAC
GGAGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTAGC (SEQ ID
NO:45) (pYL744)

Вариант H3

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYTMSWVRQAPGKLEWVSTISPGDSFGYYYPD
SVQGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIYYNYGAWFAYWGQGLTLTVSS
 (SEQ ID NO:46)

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCC
 TGCGCAGCCTCTGGATTCACTTTTCAGTACCTATACCATGTCTTGGGTTTCGCCAAGCACCGGGC
 AAGGGACTGGAGTGGGTCTCTACCATTAGTCCAGGAGACAGTTTCGGCTACTACTATCCAGAC
 AGTGTGCAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAGTCTGTACCTGCAAATG
 AACAGTCTGAGGGCAGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCCCGAGATATTTACTATAATTAC
 GGAGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTAGC (SEQ ID
 NO:47) (pYL745)

Вариант Н4

dVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYTMSWVRQAPGKLEWV**a**TISPGDSFGYYYPD
SVQGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC**tr**DIYYNYGAWFAYWGQGLTLTVSS
 (SEQ ID NO:24)

GACGTCCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCC
 TGCGCAGCCTCTGGATTCACTTTTCAGTACCTATACCATGTCTTGGGTTTCGCCAAGCACCGGGC
 AAGGGACTGGAGTGGGTTCGCAACCATTAGTCCAGGAGACAGTTTCGGCTACTACTATCCAGAC
 AGTGTCCAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAGTCTGTACCTGCAAATG
 AACAGTCTGAGGGCAGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTACCCGAGATATTTACTATAATTAC
 GGAGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTAGC (SEQ ID
 NO:48) (pYL746)

Вариант Н5

dVQLV**q**SGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYTMSWVRQAPGKLEWV**a**TISPGDSFGYYYPD
SVQGRFTISRDNAKNSLYLQMN**r**LRAEDTAVYYC**tr**DIYYNYGAWFAYW**Gr**GTLTVSS
 (SEQ ID NO:49)

GACGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCC
 TGCGCAGCCTCTGGATTCACTTTTCAGTACCTATACCATGTCTTGGGTTTCGCCAAGCACCGGGC
 AAGGGACTGGAGTGGGTTCGCAACCATTAGTCCAGGAGACAGTTTCGGCTACTACTATCCAGAC
 AGTGTCCAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAGTCTGTACCTGCAAATG
 AACAGGCTGAGGGCAGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTACCCGAGATATTTACTATAATTAC
 GGAGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCAGAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTAGC (SEQ ID
 NO:50) (pYL747)

Вариант Н6

dVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYTMSWVRQAPGKLEWV**a**TIS**qGnnyGys**YPD
SV**k**GRFTISRDNAKNSLYLQMN**r**LRAEDTAVYYC**tr**DIYYNYGAWFAYWGQGLTLTVSS
 (SEQ ID NO:52)

GACGTCCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCC
 TGCGCAGCCTCTGGATTCACTTTTCAGTACCTATACCATGTCTTGGGTTTCGCCAAGCACCGGGC
 AAGGGACTGGAGTGGGTTCGCAACCATTAGTGGCGGAAATAACTACGGCTACTCCTATCCAGAC
 AGTGTCAAGGGCCGATTACCATCTCTAGAGACAATGCCAAGAACAGTCTGTACCTGCAAATG
 AACTCCCTGAGGGCAGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTACCCGAGATATTTACTATAATTAC
 GGAGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTAGC (SEQ ID
 NO:53) (pYL748)

Выравнивание аминокислотных последовательностей версий от Н0 до Н6 показано ниже

H0 EVQLVESGGGLV~~K~~PGGSLRLSCAASGFTTFSTY~~T~~MSWVRQAPGKGLEWVSAIS-GSGGSTY
H1 EVQLVESGGGLV~~K~~PGGSLRLSCAASGFTTFSTY~~T~~MSWVRQAPGKGLEWVSTISPGDSFG-Y
H2 EVQLVESGGGLV~~K~~PGGSLRLSCAASGFTTFSTY~~T~~MSWVRQAPGKGLEWVSTISPGDSS~~T~~IY
H3 EVQLVESGGGLV~~K~~PGGSLRLSCAASGFTTFSTY~~T~~MSWVRQAPGKGLEWVSTISPGDSFGYY
H4 DVQLVESGGGLV~~K~~PGGSLRLSCAASGFTTFSTY~~T~~MSWVRQAPGKGLEWVATISPGDSFGYY
H5 DVQLVQSGGGLV~~K~~PGGSLRLSCAASGFTTFSTY~~T~~MSWVRQAPGKGLEWVATISPGDSFGYY
H6 DVQLVESGGGLV~~K~~PGGSLRLSCAASGFTTFSTY~~T~~MSWVRQAPGKGLEWVATISGGNNYGY
:****:*****:*** *..

H0 YADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN~~S~~LRAEDTAVYYCARDIYYNYGAWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:40)
H1 YPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN~~S~~LRAEDTAVYYCARDIYYNYGAWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:42)
H2 YADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN~~S~~LRAEDTAVYYCARDIYYNYGAWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:44)
H3 YPDSVQGRFTISRDNAKNSLYLQMN~~S~~LRAEDTAVYYCARDIYYNYGAWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:46)
H4 YPDSVQGRFTISRDNAKNSLYLQMN~~S~~LRAEDTAVYYCTRDIYYNYGAWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:24)
H5 YPDSVQGRFTISRDNAKNSLYLQMN~~R~~LRAEDTAVYYCTRDIYYNYGAWFAYWGRGTLTVTVSS (SEQ ID NO:49)
H6 YPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN~~S~~LRAEDTAVYYCTRDIYYNYGAWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:52)
*.***:*****:*****:*****:*****

Ниже показаны примеры трех гуманизованных легких цепей 24F4 (каркас huIGKV1-13*02/24F4 VL CDR) и соответствующие им последовательности ДНК. Области CDR 1, 2 и 3 в каждой легкой цепи подчеркнуты в указанном порядке. Выделен остаток Ser91 (в соответствии с нумерацией по Kabat), который был заменен на Cys91 во всех легких цепях. Основная N-концевая аминокислота (т.е. аланин в варианте L0 и аспарагиновая кислота в вариантах L1 и L2) домена варибельной легкой цепи может связываться непосредственно с антигеном и влияет на аффинность связывания. Каркасные обратные мутации показаны строчным жирным шрифтом. Первый вариант (L0) содержит наименьшее количество обратных мутаций и третий вариант (L2) содержит большинство обратных мутаций (т.е. является наименее "гуманизованным").

Вариант L0

AIQLTQSPSSLSASVGD~~R~~VTIITCKASQSV~~D~~YDGD~~S~~YMNWYQ~~K~~PGKAPKLLIYA~~A~~ASTLES~~G~~V~~P~~
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ~~Q~~SNE~~D~~PR~~T~~FGQGT~~K~~VEIK (SEQ ID NO:54)

GCTATT~~C~~AGCTGACCCAATCTCCATCCTCTTTGTCCGCCTCTGTGGGGGACAGGGTCACCATC
ACCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTGATTATGATGGTGATAGTTATATGAACTGGTATCAACAG
AAACCAGGGAAGGCTCCCAA~~A~~CTCCTCATCTACGCTGCATCCACTCTCGAGTCTGGGGTCCCA
TCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCC~~T~~CACAATCAGCTCACTCCAGCCA
GAGGATTTGCAACCTATTACTGT~~C~~AGCAAAGCAACGAGGATCCTCGGACGTTCGGT~~C~~AGGGC
ACCAAAGTGGAAATCAAG (SEQ ID NO:55) (pYL729)

Вариант L1

dIQLTQSPSSLSASVGD~~R~~VTIITCKASQSV~~D~~YDGD~~S~~YMNWYQ~~K~~PGKAPKLLIYA~~A~~ASTLES~~G~~V~~P~~
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ~~Q~~SNE~~D~~PR~~T~~FGQGT~~K~~VEIK (SEQ ID NO:56)

GACATT~~C~~AGCTGACCCAATCTCCATCCTCTTTGTCCGCCTCTGTGGGGGACAGGGTCACCATC
ACCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTGATTATGATGGTGATAGTTATATGAACTGGTATCAACAG
AAACCAGGGAAGGCTCCCAA~~A~~CTCCTCATCTACGCTGCATCCACTCTCGAGTCTGGGGTCCCA
TCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCC~~T~~CACAATCAGCTCACTCCAGCCA
GAGGATTTGCAACCTATTACTGT~~C~~AGCAAAGCAACGAGGATCCTCGGACGTTCGGT~~C~~AGGGC
ACCAAAGTGGAAATCAAG (SEQ ID NO:57) (pYL730)

Вариант L2

DIQLTQSPSSLSVSVGDRA~~T~~ISCKASQSV~~D~~YDGDSYMNWYQ~~Q~~KPGKAPKLLIYAAS~~T~~LESGVP
SRFSGSGSGTDF~~T~~LT~~I~~SSVQPEDFATYYCQ~~Q~~SNE~~D~~PR~~T~~FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:58)

GACATTACAGCTGACCCAATCTCCATCCTCTTTGTCCGTCCTGTGGGGGACAGGGCAACCATC
TCCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTGATTATGATGGTGATAGTTATATGAAC~~T~~GGTATCAACAG
AAACCAGGGAAGGCTCCCAAAC~~T~~CCTCATCTACGCTGCATCCACTCTTGAGTCTGGGGTCCCA
TCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGCTGGGACAGACTTCACCTCACAATCAGCTCAGTGCAGCCA
GAGGATTTTCGCAACCTATTACTGTCTAGCAAAGCAACGAGGATCCTCGGACGTTCCGGTCAGGGC
ACCAAAGTGGAAATCAAG (SEQ ID NO:59) (pYL731)

Выравнивание аминокислотных последовательностей вариантов от L0 до L2 показано ниже

L0 AIQLTQSPSSLSASVGD~~R~~VTITCKASQSV~~D~~YDGDSYMNWYQ~~Q~~KPGKAPKLLIYAAS~~T~~LES
L1 DIQLTQSPSSLSASVGD~~R~~VTITCKASQSV~~D~~YDGDSYMNWYQ~~Q~~KPGKAPKLLIYAAS~~T~~LES
L2 DIQLTQSPSSLSVSVGD~~R~~ATISCKASQSV~~D~~YDGDSYMNWYQ~~Q~~KPGKAPKLLIYAAS~~T~~LES
.*****.*****.**:*****

L0 GVPSRFSGSGSGTDF~~T~~LT~~I~~SSLQPEDFATYYCQ~~Q~~SNE~~D~~PR~~T~~FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:54)
L1 GVPSRFSGSGSGTDF~~T~~LT~~I~~SSLQPEDFATYYCQ~~Q~~SNE~~D~~PR~~T~~FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:56)
L2 GVPSRFSGSGSGTDF~~T~~LT~~I~~SSVQPEDFATYYCQ~~Q~~SNE~~D~~PR~~T~~FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:58)
*****:*****

Гуманизированные аминокислотные последовательности VH и VL, указанные выше, не содержат каких-либо потенциальных N-связанных сайтов гликозилирования или Asn-Gly сайтов деамидирования. В последовательности зародышевой линии в обоих доменах VH и VL наблюдаются метионины, которые не экспонированы на поверхность, таким образом, предполагается, что риск окисления метионина будет минимальным.

Растворимость белков может коррелировать с показателем pI. Индексы pI созданных конструкций были рассчитаны с использованием показателей pK аминокислот авторами Bjellqvist et al. (Electrophoresis, 14:1023-31 (1993); Electrophoresis, 15:529-39(1994)). Показанные ниже значения были рассчитаны с использованием человеческих тяжелых цепей IgG1. Каждое из гуманизированных антител имеет pI значительно выше 7, и следовательно, ожидается, что эти антитела будут иметь значительный положительный заряд при нейтральном уровне pH. Каждая запись в таблице является вычисленным значением pI полного комбинированного антитела, суммарный заряд показан в круглых скобках

Молекула	Расчетное pI (суммарный заряд)
Химерная 24F4	6,94 (-2)
Гуманизированная H4L1	7,26 (0)

Пример 5. Связывание Hx/L1 с BDCA2.

Все возможные варианты (21 вариант) тяжелой и легкой цепи hu24F4 (как описано в примере 4) и ch24F4 были транзитивно экспрессированы в клетках 293E путем котрансфекции плазмид тяжелой цепи и легкой цепи. Все варианты hu24F4 были собраны и секретированы, с титрами, превышающими титры ch24F4 (что определяли по количеству мАт в кондиционированной среде путем ОСТЕТ-связывания с наконечниками с анти-человеческими Fc). Вестерн-блоттинг с анализами SDS-PAGE с невозстанавливаемыми условиями, выполненными с химерными и гуманизированными моноклональными антителами 24F4, не показал большой агрегации или очевидного клипирования по отношению к ch24F4.

Кондиционированную среду анализировали с помощью прямого связывания FACS на стабильно трансфицированных DG44 клетках CHO, которые коэкспрессировали полноразмерные кДНК BDCA2 и FcεRIγ (человека или обезьяны циномоглус), подходящими векторами экспрессии были человеческий BDCA2/FcεRIγ:pEAG2456, циномоглусный BDCA2/FcεRIγ:pEAG2668). При прямом связывании с поверхностным BDCA2 человека или обезьяны циномоглус наблюдалась полная утрата связывания у вариантов H0, H1 и H2 hu24F4, значительная потеря аффинности связывания наблюдалась у варианта H3 hu24F4, хорошее сохранение аффинности выявлено в обоих вариантах H4 и H5 hu24F4, и умеренная потеря связывания выявлена в вариантах H6 hu24F4 (фиг. 2 и 3). На основании титра и очевидных значений EC₅₀ в анализе прямого связывания FACS были определены H4/L1 и H5/L1 как "лучшие" варианты hu24F4.

Кондиционированную среду, содержащую ch24F4 и все варианты мАт hu24F4, анализировали с помощью ОСТЕТ на связывание с эктодоменом BDCA2 человека. Был изготовлен эктодомен мономерного huBDCA2 путем протеолитического расщепления из очищенного слитого белка muIgG2a Fc-huBDCA2 (соответствующая плазида: pEAG2423). Антитела из кондиционированной среды от транзитивно трансфицированных клеток связывали с наконечниками с античеловеческими Fc, а затем моно-

мерный huBDCA2 пропускали через ОСТЕТ-наконечники для анализа связывания и диссоциации. Серии H4 и H5 вариантов hu24F4 показали лучшую аффинность к huBDCA2

Название образца	Аффинность связывания KD (M)	Скорость ассоциации k_{on} (1/МС)	Скорость диссоциации k_{dis} (1/С)
H6/L0	5,00E-09	2,73E+05	1,37E-03
H0/L1	9,50E-11	1,00E+05	9,50E-06
H1/L1	5,03E-11	1,00E+05	5,03E-06
H2/L1	3,35E-11	1,00E+05	3,35E-06
H3/L1	1,30E-08	4,52E+05	5,86E-03
H4/L1	7,44E-10	5,49E+05	4,08E-04
ch24F4	2,17E-09	1,61E+06	3,49E-03
Контроль 5С8	2,51E-14	1,00E+05	2,51E-09

Пример 6. Повышение аффинности hu24F4.

Чтобы изучить возможность повышения аффинности hu24F4 путем замещения в положении CDR L3 версии L1 24F4 непарного цистеина (С95S в векторе экспрессии pYL740 легкой цепи hu24F4), был сконструирован ряд вариантов версии L1 путем сайт-направленного мутагенеза. Обратную мутацию в непарном цистеине, т.е. в S95C, конструировали с помощью сайт-направленного мутагенеза, продуцирующего плазмиду pYL749. Варианты S95T, S95A и S95V были сконструированы путем сайт-направленного мутагенеза, продуцирующего плазмиды pYL750, pYL751 и pYL752, соответственно. Полноразмерные кДНК-последовательности легкой цепи в полученных плаزمиде были подтверждены секвенированием ДНК. Вариантные С95 моноклональные антитела hu24F4 были транзитивно экспрессированы в клетках 293Е путем котрансфекции pYL746 тяжелой цепи hu24F4 H4 или pYL747 тяжелой цепи hu24F4 H5 с hu24F4 L1 вариантами легких цепей из плазмид С95S pYL740, S95C pYL749, S95T pYL750, S95A pYL751 или S95V pYL752. Кондиционированную среду собирали через 2 дня после трансфекции. Титры (анализированные с помощью ОСТЕТ с наконечниками с анти-человеческими Fc) всех вариантов были сходными, и вестерн-блоттинг SDS-PAGE с невозстанавливающими условиями не показал большой агрегации или очевидного клиппинга. Кондиционированную среду, содержащую варианты мАт С95, анализировали способом ОСТЕТ на связывание с эктодоменом BDCA2 человека. Антитела из кондиционированной среды от транзитивно трансфицированных клеток связывали с наконечниками с анти-человеческими Fc, затем мономерный huBDCA2 пропускали через наконечники ОСТЕТ для анализа связывания и диссоциации. Варианты С95А имели самую низкую скорость диссоциации.

Название образца	Аффинность связывания KD (M)	Скорость ассоциации k_{on} (1/МС)	Скорость диссоциации k_{dis} (1/с)
24F4-H4/L1 (YL740/YL746)	5,48E-10	7,27E+05	3,98E-04
H4-L1-S95C (YL749/YL746)	2,89E-10	9,67E+05	2,79E-04
H4-L1-C95T (YL750/YL746)	3,92E-10	9,44E+05	3,70E-04
H4-L1-C95A (YL751/YL746)	2,61E-10	8,84E+05	2,30E-04
H4-L1-C95V (YL752/YL746)	3,23E-10	9,33E+05	3,01E-04

На основании этих результатов были созданы стабильные клеточные линии CHO для С95Т и С95А вариантов hu24F4 H4/L1 и вариантов С95Т и С95А H5/L1, которые имели самую низкую скорость диссоциации. Анализы связывания ОСТЕТ повторяли для очищенных моноклональных hu 24F4. В качестве

ведущего кандидата выбрали C95A вариант hu 24F4 H4/L1. Последовательности плазмид pYL746 (тяжелой цепи hu 24F4 H4) и pYL751 (легкой цепи hu 24F4 L1) были использованы для перекодирования и конструирования экспрессирующих векторов для создания продуцирующей клеточной линии CHO.

Выведенная зрелая аминокислотная последовательность легкой цепи hu24F4 L1 C95A, кодируемая pYL751, показана ниже (CDR L1, CDR L2 и CDR L3 подчеркнуты)

```

1  DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQSVD YDGDSYMNWY QQKPGKAPKL
51  LIYAAASTLES GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLQPEDFATY YCQOANEDPR
101 TFGQGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV
151 QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYLSL STLTLISKADY EKHKVYACEV
201 THQGLSSPVT KSFNRGEC (SEQ ID NO:3)

```

Выведенная зрелая аминокислотная последовательность тяжелой цепи hu24F4 H4-hulgG1, кодируемая pYL746, показана ниже (CDR H1, CDR H2 и CDR H3 подчеркнуты)

```

1  DVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS TYTMSWVRQA PGKGLEWVAT
51  ISPGDSFGYY YPDSVQGRFT ISRDNAKNSL YLQMNSLRAE DTAVVYCTRQ
101 IYYNYGAWFA YWGQGTLVTV SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL
151 VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSSLGT
201 QTYICNVNHK PSNTKVDKQV EPKSCDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP
251 KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NQYVDGVEVH NAKTKPREEQ
301 YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE
351 PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTPP
401 PVLDSGGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKLSLSLSP
451 G (SEQ ID NO:4)

```

Антитело, состоящее из зрелой тяжелой цепи (SEQ ID NO: 4) и зрелой легкой цепи (SEQ ID NO: 3), показанных выше, называется В1В059.

Пример 7. Перекодирование генов тяжелой и легкой цепи.

Для потенциального улучшения экспрессии были перекодированы гены нуклеотидной последовательности легкой и тяжелой цепи без изменения аминокислотной последовательности. Ниже показана модифицированная последовательность ДНК гена легкой цепи анти-BDCA2. Аминокислоты 1-240 содержат последовательность легкой цепи. Аминокислоты 1-22 (нуклеотиды обозначены строчным шрифтом) содержат сигнальный пептид нативной легкой цепи. Зрелый N-конец начинается с аминокислоты 23 (D)

1 atg gac atg agg gtc ccc gct cag ctc ctg ggg ctc ctt ctg ctc tgg ctc cct gga gca cga tgt

1> M D M R V P A Q L L G L L L L W L P G A R C

67 GAC ATT CAG CTG ACC CAA TCT CCA TCC TCT TTG TCC GCC TCT GTG GGG GAC AGG GTC ACC ATC ACC

23> D I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T

133 TGC AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT TAT GAT GGT GAT AGT TAT ATG AAC TGG TAT CAA CAG AAA CCA

45> C K A S Q S V D Y D G D S Y M N W Y Q Q K P

199 GGG AAG GCT CCC AAA CTC CTC ATC TAC GCT GCA TCC ACT CTC GAG TCT GGG GTC CCA TCC AGG TTT

67> G K A P K L L I Y A A S T L E S G V P S R F

265 AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC CTC ACA ATC AGC TCA CTC CAG CCA GAG GAT TTC GCA

89> S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A

331 ACC TAT TAC TGT CAA CAA GCC AAC GAA GAT CCT CGG ACC TTC GGT CAG GGC ACC AAA GTG GAA ATC

111> T Y Y C Q O A N E D P R T F G Q G T K V E I

397 AAG CGG ACC GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCT CCA TCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA

133> K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G

463 ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA GAG GCC AAA GTG CAG TGG AAG GTG

155> T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V

529 GAT AAC GCC CTC CAA TCT GGC AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC

177> D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T

595 TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACC CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC

199> Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C

661 GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCT CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT TGA (SEQ ID NO:60)

221> E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C * (SEQ ID NO:61)

Модифицированная последовательность ДНК гена тяжелой цепи анти-BDCA2 показана ниже. Аминокислоты 1-470 содержат последовательность тяжелой цепи. Аминокислоты 1-19 (нуклеотиды обозначены строчным шрифтом) содержат сигнальный пептид нативной тяжелой цепи. Зрелый N-конец начинается с аминокислоты 20 (D)

1 atg ggt tgg agc ctc atc ttg ctc ttc ctt gtc gct gtt gct acc cgg gtc ctg tcc GAC GTC CAG
 1> M G W S L I L L F L V A V A T R V L S D V Q

67 CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC CTG GTG AAG CCT GGA GGG TCC CTG AGA CTC TCC TGC GCA GCC TCT
 23> L V E S G G G L V K P G G S L R L S C A A S

133 GGA TTC ACT TTC AGT ACC TAT ACC ATG TCT TGG GTT CGC CAA GCA CCT GGC AAG GGA CTG GAG TGG
 45> G F T F S T Y T M S W V R Q A P G K G L E W

199 GTC GCA ACC ATT AGT CCA GGA GAC AGT TTC GGC TAC TAC TAT CCA GAC AGT GTC CAG GGC CGA TTC
 67> V A T I S P G D S F G Y Y Y P D S V Q G R F

265 ACC ATC TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC AGT CTG TAC CTG CAA ATG AAC AGT CTG AGG GCA GAG GAC
 89> T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D

331 ACA GCC GTG TAT TAC TGT ACC CGA GAT ATT TAC TAT AAT TAC GGA GCC TGG TTT GCT TAC TGG GGC
 111> T A V Y Y C T R D I Y Y N Y G A W F A Y W G

397 CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT AGC GCT TCC ACC AAG GGC CCA TCC GTC TTC CCC CTG GCA CCC
 133> Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P

463 TCC TCC AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCT GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA
 155> S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E

529 CCC GTG ACC GTG TCC TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCC GCT GTC CTG
 177> P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L

595 CAA TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC TCC AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACC CAG
 199> Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q

661 ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTG GAC AAG AAA GTT GAG CCC AAA
 221> T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K

727 TCT TGT GAC AAG ACT CAC ACA TGC CCA CCT TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCT TCA GTC
 243> S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V

793 TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG
 265> F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V

859 GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAT GTT GAC GGC GTG GAG GTC
 287> V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V

925 CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCT CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACC TAC CGG GTG GTC AGC GTC CTC
 309> H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L

991 ACC GTC CTG CAC CAA GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC
 331> T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L

1057 CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC
 353> P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T

1123 CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAA GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC
 375> L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F

1189 TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCT GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACA
 397> Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T

1255 CCT CCC GTG TTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC TCC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG
 419> P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R

1321 TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACC CAG
 441> W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q

1387 AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCC GGT TGA (SEQ ID NO:62)
 463> K S L S L S P G * (SEQ ID NO:63)

Пример 8. Кассеты и векторы экспрессии.

Гены тяжелой цепи и гены легкой цепи вырезали и лигировали в отдельные экспрессирующие векторы. Каждый ген находится под транскрипционным контролем немедленно-раннего промотора человеческого цитомегаловируса и последовательности гена полиаденилирования человеческого гормона роста.

Плаزمид, экспрессирующая легкую цепь, rJP009, также содержит кассету экспрессии для гена неомицин-фосфотрансферазы (neo), и содержит ранний промотор мышинной фосфоглицераткиназы (muPGK) и последовательность полиаденилирования muPGK (фиг. 4).

Плазмид, экспрессирующая тяжелую цепь, rJP010, также содержит кассету экспрессии для гена dhfr, который был использован в качестве селективируемого и амплифицируемого с метотрексатом маркера. Ключевые свойства плазмид rJP009 и rJP010 приведены ниже.

Название плазмиды	Промоторы	Сигнальные пептиды	Зрелая полипептидная цепь	Полиаденирование	Селективируемые маркеры
rJP009	hCMV IE muPGK	Нативный человеческий подгруппа I каппа	Легкая цепь 218 аминокислот	hGH muPGK	неомицин-фосфотрансфераза: (G418) бета-лактамаза: (ампициллин)
rJP010	hCMV IE SV40E	Синтетическая последовательность сигнала пептида	Тяжелая цепь 451 аминокислота	hGH SV40E	DHFR: (альфа-нуклеозиды) бета-лактамаза: (ампициллин)

Сокращения: немедленно-ранний цитомегаловирус человека (hCMV IE), ранний обезьяний вирус

40 (SV40E), мышьяная фосфоглицераткиназа (muPGK), человеческий гормон роста (hGH), ген неомин-фосфотрансферазы (G418 resistance), ген дигидрофолатредуктазы (dhfr), бактериальный ген устойчивости к ампициллину (бета-лактамаза).

Полная нуклеотидная последовательность плазмиды pJP009 показана ниже. Три открытые рамки считывания представляют собой легкую цепь 24F4, неомин-фосфотрансферазу и бета-лактамазу

```

1  TTGACATTGATTATTGACAGTATTATTAATAGTAATCAATACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAAATTA
93  CGGTAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCAAACGACCCCGCCCATTTGACGTCATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGGACT
185  TTCCATTGACGTCGAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGA
277  CGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACSTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCA
369  TCGSTATTACCATGGTGTATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGAATCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCAT
461  GACGTCGAATGGGAGTTTGTGTTTGGCACAAATCAACGGGACTTTCGAAATGTGTAACAACCTCCGCCCATTTGACGCAAAATGGGCGGTAG
553  GCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATA
645  GAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGCGGGAACGGTGCATTTGGAACGCGGATTCGCCGTGCCAAGAGTGACGTAAGTACCGCCTAT
737  AGAGTCTATAGGCCACCCCTTGGCTTCTTATGATGCTATACTGTTTTTGGCTTGGGGTCTATACACCCCGCTTCTCATGTTATAGGT
829  GATGGTATAGCTTAGCCTATAGGTGTGGTTATTGACCATATTGACCACTCCCTATTGGTGACGATACTTCCATTACTAATCCATAACA
921  TGGCTCTTTGCCACAACCTCTCTTATTGGCTATATGCCAATACACTGTCCTTCAGAGACTGACACGGACTCTGTATTTTTACAGGATGGGGT

```

1013 CTCATTTATTATTTACAAATTCACATATACAAACCACCGTCCCCAGTGCCCGCAGTTTTTTATTAACATAACGTGGGATCTCCACGCGAAT
1105 CTCGGGTACGTGTTCCGGAACGGTGGAGGGCAGTGTAGTCTGAGCAGTACTCGTTGCTGCCGCGCGCCACCAGACATAATAGCTGACAGA
1197 CTAACAGACTGTTTCCTTTCCATGGGTCTTTTCTGCAGTACCCGTCTTTGACACGGGATCCGCCACC ATG GAC ATG AGG GTC CCC
> M D M R V P

1281 GCT CAG CTC CTG GGG CTC CTT CTG CTC TGG CTC CCT GGA GCA CGA TGT GAC ATT CAG CTG ACC CAA TCT
> A Q L L G L L L L W L P G A R C D I Q L T Q S

1350 CCA TCC TCT TTG TCC GCC TCT GTG GGG GAC AGG GTC ACC ATC ACC TGC AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT
> P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q S V D

1419 TAT GAT GGT GAT AGT TAT ATG AAC TGG TAT CAA CAG AAA CCA GGG AAG GCT CCC AAA CTC CTC ATC TAC
> Y D G D S Y M N W Y Q Q K P G K A P K L L I Y

1488 GCT GCA TCC ACT CTC GAG TCT GGG GTC CCA TCC AGG TTT AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC
> A A S T L E S G V P S R F S G S G S G T D F T

1557 CTC ACA ATC AGC TCA CTC CAG CCA GAG GAT TTC GCA ACC TAT TAC TGT CAA CAA GCC AAC GAA GAT CCT
> L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q A N E D P

1626 CGG ACC TTC GGT CAG GGC ACC AAA GTG GAA ATC AAG CGG ACC GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC
> R T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F

1695 CCT CCA TCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC
> P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P

1764 AGA GAG GCC AAA GTG CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCT GGC AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA
> R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T

1833 GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACC CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG
> E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E

1902 AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCT CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC
> K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N

1971 AGG GGA GAG TGT TGA GGATCCCTGCCCGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGCCTCTCCTGGTCTGGAAGGTGCTACTCCA
> R G E C • (SEQ ID NO:64)

2058 GTGCCCACCAGCCTTGTCTAATAAAAATTAAGTTGCATCATTITGTTTGAAGTACTAGGTGTCCTTGTATAAATATATGGGGTGGAGGCGGGTGGT
2150 ATGGAGCAAGGGCAGGTTGGGAAGACAACCTGTAGGGCCTTCCAGGGTCTATTTGGGAACCAGGCTGGAGTGCAGTGGCAGATCTTGGCTCG
2242 CTGCAATCTCCGCCCTCTGGGTTCAAGCGATCTCTCCTGCCTCAGTCTCCCGAATAGTTGGGATTCACAGGCATGCACGACCAGGCTCAGCTAA
2334 TTTTGTATTTTGGTAGAGACGGGTTTACCATATTGGCCAGTCTGGTCTCCATCTCCTGACCTCAGGTAATCCGCCCGCCTCGGCCTCC
2426 CAAATTGCTGGGATACAGGTATGAGCCACTGGGCCCTTCCCTGTCTGTGATTTTAAAATAATTATACCAGCAGAAGGACGTCCAGACACA
2518 GCATGGGCTACCTGGCCATGCCAGCCAGTTGGACATTTGAGTTGTTTGGCTTGGCACTGTCCTCTCATGAATTCCTGCAGGATTCGAGGGCC
2610 CCTGCAGGTCAATTCTACCGGGTAGGGGAGGCGCTTTTCCCAAGGCAGTCTGGAGCATGCGCTTTAGCAGCCCCGCTGGGCACTTGGCGCTA
2702 CACAAGTGGCCTCTGGCCTCGCACACATTCACATCCACCGGTAGGGCCCAACCGGCTCCGTTCTTTGGTGGCCCCCTTCGCGCCACCTTCTA
2794 CTCCTCCCCTAGTCAGGAAGTTCCTCCCCCGCCCGCAGCTCGCTCGTGCAGGACGTGACAAATGGAAGTAGCAGCTCTCACTAGTCTCGTG

2886 CAGATGGACAGCACCGCTGAGCAATGGAAGCGGGTAGGCCCTTTGGGGCAGCGCCCAATAGCAGCTTTGCTCCTTCGCTTTCTGGGCTCAGAG
 2978 GCTGGGAAGGGGTGGGTCCGGGGGCGGGCTCAGGGGCGGGCTCAGGGGCGGGGCGGGCGCCGAAGGTCTCCGGAGGCCCGGCATTCTGCA
 3070 CGCTTCAAAGCGCACGTCTGCCGCGCTGTTCTCCTCTTCTCATCTCCGGGCTTTTCGACCTGCAGCCAATATGGGATCGGCCATTGAACA
 > M G S A I E Q
 3162 AGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCG
 > D G L H A G S P A A W V E R L F G Y D W A Q Q T I G C S D A
 3254 CCGTGTTCGGGCTGTCCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCG
 > A V F R L S A Q G R P V L F V K T D L S G A L N E L Q D E A A
 3346 CGGCTATCGTGGTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGAAGGACTGGCTGCTATTGGGCGA
 > R L S W L A T T G V P C A A V L D V V T E A G R D W L L L G E
 3438 AGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCTCTCACCTTGCTCCTGCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCCGGGCTGCATACGCTTG
 > V P G Q D L L S S H L A P A E K V S I M A D A M R R L H T L
 3530 ATCCGGCTACCTGCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCGGTCTTGTGATCAGGATGAT
 > D P A T C P F D H Q A K H R I E R A R T R M E A G L V D Q D D
 3622 CTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTGCGCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGATGATCTCGTCTGACCCA
 > L D E E H Q G L A P A E L F A R L K A R M P D G D D L V V T H
 3714 TGGCGATGCCTGTGTCGGAATATCATGGTGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTTCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATC
 > G D A C L P N I M V E N G R F S G F I D C G R L G V A D R Y
 3806 AGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTCTTTACGGTATCGCCGCTCCC
 > Q D I A L A T R D I A E E L G G E W A D R F L V L Y G I A A P
 3898 GATTCCGAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTACGAGTTCTTCTGAGGGGATCGATCCGCTGTAAGTCTGCAGAAATGATGATCTATTA
 > D S Q R I A F Y R L L D E F F • (SEQ ID NO:65)
 3990 AACAAATAAGATGTCCACTAAAATGGAAGTTTTTCCTGTACTACTTTGTTAAGAAGGGTGAGAACAGAGTACCTACATTTTGAATGGAAGGA
 4082 TTGGAGCTACGGGGGTGGGGTGGGGTGGGATTAGATAAATGCCTGCTCTTTACTGAAGGCTCTTTACTATTGCTTTATGATAATGTTTCAT
 4174 AGTTGGATATCATAATTTAAACAAGCAAAACCAAAATTAAGGGCCAGCTCATTCTCCCACTCATGATCTATAGATCTATAGATCTCTCGTGG
 4266 GATCATTGTTTTCTCTGATTCCCACTTTGTGGTTCTAAGTACTGTGGTTTCCAAATGTGTCAAGTTTCATAGCCTGAAGAACGAGATCAGC
 4358 AGCCTCTGTCCACATACACTTCATTCTCAGTATTGTTTTGCCAAAGTTCTAATTCATCAGAAGCTGACTCTAGATCTGGATCGATGAATTC
 4450 GCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATGGTGCACCTCCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCA
 4542 TAGTTAAGCCAGCCCCGACCCCGCAACCCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGAC
 4634 CGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGGTTTTTACCCTCATCACCGAAGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGG
 4726 TTAATGTCATGATAATAATGGTTTTCTTAGAGCTCAGGTGGCACTTTTTCGGGAAATGTGCGGAAACCCCTATTTGTTTTATTTTCTAAATA
 4818 CATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGATGATGATTTCAACATTTCCG
 > M S I Q H F R
 4910 TGTCCGCTTATTCCCTTTTTTGGCGCATTTTGCCTTCCTGTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGT
 > V A L I P F F A A F C L P V F A H P E T L V K V K D A E D Q

5002 TGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGC
 > L G A R V G Y I E L D L N S G K I L E S F R P E E R F P M M S

5094 ACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGCAAGAGCAAACCTCGGTCGCCCATACACTATTCTCAGAATGA
 > T F K V L L C G A V L S R I D A G Q E Q L G R R I H Y S Q N D

5186 CTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATA
 > L V E Y S P V T E K H L T D G M T V R E L C S A A I T M S D

5278 ACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAATCGCCTT
 > N T A A N L L L T T I G G P K E L T A F L H N M G D H V T R L

5370 GATCGTTGGAAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCCGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAAC
 > D R W E P E L N E A I P N D E R D T T M P V A M A T T L R K L

5462 ATTAACGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGG
 > L T G E L L T L A S R Q Q L I D W M E A D K V A G P L L R S

5554 CCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGTCTCGCGGTATCATTCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAG
 > A L P A G W F I A D K S G A G E R G S R G I I A A L G P D G K

5646 CCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCCTCACTGAT
 > P S R I V V I Y T T G S Q A T M D E R N R Q I A E I G A S L I

5738 TAAGCATTGGTAACTGTGACACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGA
 > K H W • (SEQ ID NO:66)

5830 TCCTTTTGGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCTGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCT
 5922 TGAGATCCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACCCCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACC
 6014 AACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGA
 6106 ACTCTGTAGACCCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCGGTTGGAC
 6198 TCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGTTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGA
 6290 ACTGAGATACCTACAGCGTGTAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGAGAAAGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCGAGGTCCGAA
 6382 CAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCAGGGGAAACGCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCTGATTT
 6474 TTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGA AAAACCGCAGCAACGCGCCCTTTTACGGTTCTGCGCCTTTTGTGCGCCTTTTGTCTCA
 6566 CATGTTCTTCTCCTCGCTTATCCCTGATCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCG
 6658 AGCGCAGCGAGTCACTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCAATAACGCAACCGCCTCTCCCGCGGTTGGCCGATTATTAAATGACAGCTGG
 6750 CACGACAGGTTTCCCGACTGGAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTT
 6842 TATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGC

(SEQ ID NO:67)

Полная нуклеотидная последовательность плазмиды rJP010 (фиг. 5) показана ниже. Три открытые рамки считывания представляют собой тяжелую цепь 24F4, мышиную дигидрофолатредуктазу и бета-лактамазу

1 TTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTCCGCGTTACATAACTTA
 93 CGGTAAATGGCCCCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACT
 185 TTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGA
 277 CGTCAATGACGGTAAATGGCCCCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCA
 369 TCGCTATTACCATGGTATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGCGGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCAT
 461 GACGTCAATGGGAGTTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTCCAAAATGTCGTAAACAACTCCGCCCAATGACGCAAAATGGGCGGTAG
 553 GCGTGTACGGTGGGAGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATA
 645 GAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGCGGGGAACGGTGCATTGGAACCGGGATTCCCGTGCCAAGAGTGCAGTAAGTACCGCCTAT
 737 AGAGTCTATAGGCCACCCCTTGGCTTCTTATGCATGCTATACTGTTTTTGGCTTGGGGTCTATACACCCCGCTTCTCATGTTATAGGT
 829 GATGGTATAGCTTAGCCTATAGGTGTGGGTTATTGACCATTATTGACCACTCCCTTATTGGTGACGATACTTTCCATTACTAATCCATAACA
 921 TGGCTCTTTGCCACAACCTCTCTTTATTGGCTATATGCCAATACACTGTCCTTCAGAGACTGACACGGACTCTGTATTTTTACAGGATGGGGT
 1013 CTCATTATTATTTTACAAATTCACATATACAACACCACCGTCCCCAGTGCCCGCAGTTTTTATTAAACATAACGTGGGATCTCCACGCGAAT
 1105 CTCGGGTACGTGTTCCGGAACGGTGGAGGGCAGTGTAGTCTGAGCAGTACTCGTTGCTGCCGCGCGCCACCAGACATAATAGCTGACAGA
 1197 CTAACAGACTGTTCCCTTCCATGGGTCTTTCTGCAGTCCCGTCTTGACACGGGATCCGCCACC ATG GGT TGG AGC CTC ATC

 > M G W S L I
 1281 TTG CTC TTC CTT GTC GCT GTT GCT ACC CGG GTC CTG TCC GAC GTC CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC
 > L L F L V A V A T R V L S D V Q L V E S G G G
 1350 CTG GTG AAG CCT GGA GGG TCC CTG AGA CTC TCC TGC GCA GCC TCT GGA TTC ACT TTC AGT ACC TAT ACC
 > L V K P G G S L R L S C A A S G F T F S T Y T
 1419 ATG TCT TGG GTT CGC CAA GCA CCT GGC AAG GGA CTG GAG TGG GTC GCA ACC ATT AGT CCA GGA GAC AGT
 > M S W V R Q A P G K G L E W V A T I S P G D S
 1488 TTC GGC TAC TAC TAT CCA GAC AGT GTC CAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC AGT
 > F G Y Y Y P D S V Q G R F T I S R D N A K N S
 1557 CTG TAC CTG CAA ATG AAC AGT CTG AGG GCA GAG GAC ACA GCC GTG TAT TAC TGT ACC CGA GAT ATT TAC
 > L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C T R D I Y
 1626 TAT AAT TAC GGA GCC TGG TTT GCT TAC TGG GGC CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT AGC GCT TCC ACC
 > Y N Y G A W F A Y W G Q G T L V T V S S A S T
 1695 AAG GGC CCA TCC GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC TCC AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCT GCC CTG GGC
 > K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G
 1764 TGC CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCC GTG ACC GTG TCC TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC AGC GGC
 > C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G
 1833 GTG CAC ACC TTC CCC GCT GTC CTG CAA TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC TCC AGC GTG GTG ACC GTG CCC
 > V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P
 1902 TCC AGC AGC TTG GGC ACC CAG ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTG GAC
 > S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D
 1971 AAG AAA GTT GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAG ACT CAC ACA TGC CCA CCT TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG
 > K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L

2040 GGG GGA CCT TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG
 > G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E
 2109 GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAT GTT GAC GGC
 > V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G
 2178 GTG GAG GTC CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCT CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACC TAC CGG GTG GTC AGC
 > V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S
 2247 GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAA GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC
 > V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A
 2316 CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC
 > L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T
 2385 CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAA GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT
 > L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y
 2454 CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCT GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACA CCT CCC
 > P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P
 2523 GTG TTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC TCC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG
 > V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q
 2592 GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACC CAG AAG AGC CTC TCC
 > G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S
 2661 CTG TCT CCC GGT TGA GGATCCCTGCCCGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGCCTCTCCTGGTCGTGGAAGGTGCTACTCCA
 > L S P G • (SEQ ID NO:68)
 2748 GTGCCACCAGCCTTGTCTAATAAAAATTAAGTTGCATCATTTTGTGTTGACTAGGTGTCTTGTATAAATATTATGGGGTGGAGGCGGGTGT
 2840 ATGGAGCAAGGGCAGGTTGGGAAGACAACCTGTAGGGCCTTCAGGGTCTATTGGGAACCAGGCTGGAGTGCAGTGGCAACGATCTTGGCTCG
 2932 CTGCAATCTCCGCCTCTGGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGTCTCCCGAATAGTTGGGATTCAGGCATGCACGACCAGGCTCAGCTAA
 3024 TTTTGTATTTTGTGTTAGAGACGGGTTTCAACATATTGGCCAGTCTGGTCTCCATCTCCTGACCTCAGTAATCCGCCCGCTCGGCTCC
 3116 CAAATTGCTGGGATTACAGGTATGAGCCACTGGGCCCTTCCCTGTCTGTGATTTTAAAATAATTATACCAGCAGAAGGACGTCAGACACA
 3208 GCATGGGCTACCTGGCCATGCCAGCCAGTTGGACATTTGAGTTGTTGCTTGGCACTGTCTCTCATGAATTTCGTCGACAGATCTGCGCAG
 3300 CACCATGCTGAAATAACCTCTGAAAGAGGAACTTGGTTAGGTACCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGTGGAATGTGTCTCAGTTAGGG
 3392 TGTGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGAAAGTCCCCAGGCTC
 3484 CCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCCTAACTCCGC
 3576 CCAGTCCGCCCATTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGACAGGCGGAGGCGCCTCGGCTCTGAGCTATTCCAGAAG
 3668 TAGTGAGGAGGCTTTTTTTGGAGGCTAGGCTTTTGCAAAAGCTTGATTCTTCTGACACAACAGTCTCGAACTTAAGCTGCAGAAGTTGGTC
 3760 GTGAGGCACTGGGCAAGTAAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCTTGTGCGACAGAGAAGACTCTTGC
 3852 GTTCTGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCAGTTCAATTACAGCTCTTAAGGC
 3944 TAGAGTACTTAATACGACTCACTATAGGCTAGCATGTTTCGACCATTTGAAGTGCATCGTCGCCGTGCCAAAATATGGGGATTGGCAAGAA
 > M V R P L N C I V A V S Q N M G I G K N

4036 CGGAGACCTACCCTGGCCTCCGCTCAGGAACGAGTTCAAGTACTTCCAAAGAATGACCACAACCTCTTCAGTGGGAAGGTAACAGAACTCTGG
 > G D L P W P P L R N E F K Y F Q R M T T T S S V E G K Q N L
 4128 TGATTATGGGTAGGAAAACTGGTTCTCCATTCCTGAGAAGAATCGACCTTTAAAGGACAGAATTAATATAGTTCTCAGTAGAGAACTCAA
 >V I M G R K T W F S I P E K N R P L K D R I N I V L S R E L K
 4220 GAACCACCACGAGGAGCTCATTTTCTTGCCAAAAGTTTGGATGATGCCTTAAGACTTATTGAACAACCGGAATTGGCAAGTAAAGTAGACAT
 > E P P R G A H F L A K S L D D A L R L I E Q P E L A S K V D M
 4312 GGTTTGGATAGTCGAGGCAGTTCTGTTTACCAGGAAGCCATGAATCAACCAGGCCACCTCAGACTCTTTGTGACAAGGATCATGCAGGAAT
 > V W I V G G S S V Y Q E A M N Q P G H L R L F V T R I M Q E
 4404 TTGAAAGTGACACGTTTTTCCAGAAATTGATTTGGGAAATATAAACTTCTCCAGAATACCCAGGCGTCTCTCTGAGGTCCAGGAGAA
 >F E S D T F F P E I D L G K Y K L L P E Y P G V L S E V Q E E
 4496 AAAGGCATCAAGTATAAGTTTGAAGTCTACGAGAAGAAAGACTAACTCGAGAATTACGCGTGGTACCTCTAGAGTCGACCCGGCGGCCG
 > K G I K Y K F E V Y E K K D • (SEQ ID NO:69)
 4588 CCGCTTCGAGCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAAACCAACTAGAAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTG
 4680 TGATGCTATGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAAGTTAACAAACAACAATGCATTCAATTTATGTTTCAGGTTTCAGGGG
 4772 AGGTGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAACCTCTACAAATGTGGTAAAATCGATAAGGATCTGTGACGAATTCACCTGGCCGTCGTTTTA
 4864 CAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGC
 4956 CCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCTGAATGGCGAATGGCGCTGATGCGGTATTTTCTCTTACGCATCTGTGCGGTATTT
 5048 CACACCGCATATGGTGACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGTCGACGCGCC
 5140 TGACGGGCTTGTCTGCTCCCGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGTGCATGTGTGAGAGTTTTTACCCTCATCACC
 5232 GAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTT
 5324 TTCGGGGAAATGTGCGCGAACCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGATAAATG
 5416 CTTCAATAATATGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCTCTGTTTT
 > M S I Q H F R V A L I P F F A A F C L P V F
 5508 TGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTA
 > A H P E T L V K V K D A E D Q L G A R V G Y I E L D L N S G
 5600 AGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGGTTATATCCCGTATTGAC
 >K I L E S F R P E E R F P M M S T F K V L L C G A V L S R I D
 5692 GCCGGCAAGAGCAACTCGGTCCCGCATACACTATTTCTCAGAACTGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGG
 > A G Q E Q L G R R I H Y S Q N D L V E Y S P V T E K H L T D G
 5784 CATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGG
 > M T V R E L C S A A I T M S D N T A A N L L L T T I G G P K
 5876 AGCTAACCGCTTTTTTGCAACAACATGGGGATCATGTAACCTGCGCTTGTGCGTGGGAAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAG
 >E L T A F L H N M G D H V T R L D R W E P E L N E A I P N D E
 5968 CGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAAT
 > R D T T M P V A M A T T L R K L L T G E L L T L A S R Q Q L I

6060 AGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTG
 > D W M E A D K V A G P L L R S A L P A G W F I A D K S G A G

6152 AGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCCAAT
 > E R G S R G I I A A L G P D G K P S R I V V I Y T T G S Q A T

6244 ATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACGTGTGAGACCAAGTTTACTCATATATATCTTTA
 > M D E R N R Q I A E I G A S L I K H W • (SEQ ID NO:70)

6336 GATTGATTTAAAACTTCATTTTAAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAAACGTGAGTTTT
 6428 CGTTCACCTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAA
 6520 AAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTCGCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTTCAGCAGAGCCGAGATACC
 6612 AAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCTTCAAGAAGCTGTGAGCACCCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTATC
 6704 CAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTTCGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGGGTGAAACG
 6796 GGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAAGTGAATACCTACAGCGTGAAGTATGAGAAAGCGCCACGCTTCC
 6888 CGAAGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGTCAGGTCGGAACAGGAGAGCGCAAGAGGAGCTTCCAGGGGGAAACCGCTGTGTATC
 6980 TTTATAGTCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTTCGATTTTTGTGATGCTCGTTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAACAAACGCCAGC
 7072 AACCGCGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTGCTCAGTCTTCTTCTGCTTATCCCTGATTCGTGGATAACCGTAT
 7164 TACCGCCTTTGAGTGAAGTGTATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAAGTGAAGCGGAAAGCGGAAGAGCGCCCAATAC
 7256 GCAAAACCGCCTCTCCCGCGGTTGGCCGATTCATTAATGCAGTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAGCGGGCAGTGAAGCGCAACGCA
 7348 ATTAATGTGAGTTAGTCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATGTGAGCGGATAACA
 7440 ATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGC (SEQ ID NO:71)

Пример 9. Конструирование клеточной линии.

Использовали в качестве клетки-хозяина клеточную линию клеток яичника китайского хомячка с дефицитом дигидрофолатредуктазы (dhfr) CHO-DG44. Перед использованием провели тестирование банка клеток-хозяев DG44 с отрицательным результатом на наличие посторонних агентов. Клетки-хозяева DG44 (CCB-00-05-01) были использованы для конструирования клеточных линий, экспрессирующих анти-BDCA2.

Плазмиды rJP009 и rJP010, экспрессирующие перекодированную легкую цепь и тяжелую цепь анти-BDCA2, соответственно, были трансфицированы в клетки-хозяина этой линии путем электропорации. Селекцию трансфицированных клеток, экспрессирующих dhfr, проводили с использованием среды с дефицитом G нуклеозидов. После селекции в среде aMEM с дефицитом нуклеозидов, описанной выше, трансфицированный пул обогащали высокоэкспрессирующими клеточными линиями, используя комбинацию сортировки клеток с активацией флуоресценции и инструмент Genetix Clonepix FL (CER-00-09-03). Клеточные колонии, выделенные на ClonePix FL, собирали из полутвердой среды в 96-луночные планшеты. В отдельных лунках клетки размножали и оценивали их продуктивность. Клеточная линия, которая показала самый высокий титр в анализе при встряхивании во флаконе с подпиткой (# 49), переводили в Research Animal Fermentation для роста в 10-литровом биореакторе в целях получения материала для определения его свойств.

После исходного скрининга клеточной линии были выбраны самые высокопродуктивные клеточные линии для амплификации. Клеточные линии с максимальной продуктивностью подвергали амплификации с метотрексатом (MTX). Амплифицированные пулы субклонировали с помощью ограниченного разведения в теоретической плотности 0,5 клеток на лунку в 384-луночных планшетах. Получали изображения от отдельных лунок 384-луночных планшетов с помощью прибора Cellavista (Innovatis) на наличие единичной клетки на лунку и подтверждали клоны.

Были выбраны лучшие четыре амплифицированные клональные клеточные линии для анализа пропорционального уменьшения при встряхивании флакона с подпиткой и анализа качества продукта. Из этих топ-4 клеточных линий был создан предварительные мастер-банки клеток (Pre-MCB), которые оценивали в биореакторах. Был выбран один ведущий субклон на основе производительности биореактора и анализа качества продукта. Флакон Pre-MCB лидирующей клеточной линии был переведен в производство для создания мастер - банка клеток.

Пример 10. Посттрансляционные модификации антитела против BDCA2, В1В059.

а) Окисление.

Эндо-Lys C пептидное картирование антитела против BDCA2 ВПВ059 показало, что Met-257, Met-433 и Trp-163 тяжелой цепи являются сайтами, восприимчивыми к окислению. Уровни варьировались в диапазоне от 4 до 7%. Экспериментальные данные указывают на то, что в основном окисление связано с приготовлением образца.

b) Деаμιдирование.

Эндо-Lys C пептидное картирование антитела против BDCA2 ВПВ059 показало, что примерно 2,5% каждого из Asn-389, Asn-394 и Asn-395 в тяжелой цепи было деаμιдировано (комбинированное деаμιдирование и образование сукцинимида), и примерно 2,5% из Asn-320 в тяжелой цепи было деаμιдировано (в форме сукцинимида). Общее количество сукцинимидных форм для Asp-32 и Asp-34 в легкой цепи составляло примерно 3%. Комбинированная изомеризация Asp-32 и Asp-34 в легкой цепи составляла примерно 5%. Подобно окислению, некоторые из этих модификаций могут быть связаны с приготовлением образца.

c) Гликация.

Гликация представляет собой неферментативную модификацию, вызванную реакцией аминогрупп на белки с глюкозой, являющиеся компонентом культуральной среды. Гликация обычно обнаруживается в белках, и ее уровень широко варьируется в зависимости от условий культивирования клеток. В антителе ВПВ059 уровень гликации, измеренный с помощью интактного масс-анализа нередуцированного белка, составлял примерно 10%. Анализ пептидного картирования показал примерно 0,46% гликации на Lys-107 в легкой цепи, примерно 0,28% на Lys-103 в легкой цепи и примерно 0,2% на Lys-295 в тяжелой цепи.

d) O-связанное гликозилирование.

Не было выявлено O-связанное гликозилирование ВПВ059.

e) Другие модификации (например, гидроксизин и т.д.) Анализ показал, что <1% тяжелой цепи антитела ВПВ059 находится в α-гликозилированной форме. В анализе не выявлено замен Asn на Ser, и в антителе не было обнаружено неизвестных модификаций или мутаций на уровне ≥1%.

Пример 11. Прямое связывание ВПВ059 с клеточной поверхностью плазматоидных дендритных клеток.

Анализ цельной крови способом проточной цитометрии был разработан для оценки связывания ВПВ059 с BDCA2 на плазматоидных дендритных клетках (pDC) человека или обезьян циномоглус. Периферическую кровь обезьян циномоглус (Toxikon, Inc, Bedford, MA) или человеческую периферическую кровь (Biogen Idec) собирали в пробирки для образцов с гепарином-натрием и оставляли при комнатной температуре. Коктейль антител для FACS-окрашивания в целях выявления клеток pDC добавляли в каждую аликвоту всей крови, включающей в себя антитела CD20, CD14, CD123 и HLA-DR. Меченое Alexa647 антитело ВПВ059 (Biogen Idec, Lot # 17073-057) или меченый Alexa647 контрольный изотип hlgG добавляли в окрашивающий коктейль FACS в концентрации от 0 до 40 мкг/мл. Кровь инкубировали на льду в условиях защиты от света, в течение 30 мин. Через 30 мин каждую аликвоту цельной крови 500 мкл (циномоглус) или 100 мкл (человека) обрабатывали буфером IX Easy Lyse (Leinco Technologies) в количестве 10 мл (для крови циномоглусов) или 2 мл (для крови человека) которые инкубировали при 37°C в течение не менее одного часа. После инкубации в течение 10-15 мин при комнатной температуре образцы центрифугировали при 1400 об/мин в течение 5 мин. Супернатант декантировали, оставляя только осадок лейкоцитов (WBC). Каждый осадок WBC промывали 5 мл FACS буфера (1% бычьего сывороточного альбумина (BSA) + 0,002% NaAzide + 1 mM CaCl₂ + 1 mM MgCl₂ в ФБР) и центрифугировали при 1400 об/мин в течение 5 мин. Супернатант декантировали, каждый осадок WBC ресуспендировали в 200 мкл FACS буфера и переносили в 96-луночный круглодонный планшет (Fisher Scientific). Планшет центрифугировали при 1400 об/мин в течение 5 мин. Супернатант вытряхивали из планшета, и каждый осадок WBC промывали 200 мкл FACS буфера. Планшет центрифугировали при 1400 об/мин в течение 5 мин, затем супернатант вытряхивали из планшета. После промывания (как описано выше), лейкоциты ресуспендировали в 200 мкл 1% параформальдегида (PFA) в ФБР и фиксировали при 4°C в течение ночи в защищенном от света месте.

Непосредственно перед анализом проточной цитометрии лейкоциты фильтровали с использованием фильтровального нейлонового сетчатого планшета калибром 60 мкм (Millipore). Затем каждый осадок переносили в новый 96-луночный круглодонный планшет и центрифугировали при 1400 об/мин в течение 5 мин. Каждый осадок лейкоцитов ресуспендировали в 250 буфера FACS и измеряли интенсивность флуоресценции на устройстве LSRII для 4-цветной FACS. Одноцветную компенсацию получали с помощью набора компенсационных частиц антимишного Ig (Compensation Particle beads set, BD Biosciences). Анализ проводили с использованием программного обеспечения FlowJo и GraphPad Prism. Связывание ВПВ059 с клетками обезьян циномоглус и человеческими клетками было одинаковым при значении EC₅₀ 1-2 мкг/мл (7-13 нМ) (фиг. 6).

Пример 12. Оценка самоассоциации ВПВ059.

AlphaScreen анализ представляет собой гомогенный тест близости с использованием глутатионовых донорных и акцепторных шариков (Perkin Elmer) для связывания человеческого FcRIIa (CD32a) GST. В эту смесь добавляли различные концентрации антител, предназначенных для тестирования. Поскольку

связывание антитела с FcRIIa является одновалентным, единственным способом генерирования сигнала является наличие и у донорных и у акцепторных шариков связанного антитела, которое затем ассоциируется, таким образом, что шарики локализируются в пределах 200 нм, тем самым создается возможность продуцировать синглетный кислород и, следовательно, происходит эмиссия света. Уровень эмиссии, обнаруживаемой с помощью оборудования Envision (Perkin Elmer), пропорционален степени самоассоциации.

Фиг. 7 показывает результаты AlphaScreen для ВПВ059 по сравнению с 5с8 (отрицательный контроль) и LT105 (положительный контроль с сильной самоассоциацией).

Пример 13. Оценка неспецифичного связывания ВПВ059.

Хроматография перекрестного взаимодействия (CIC) представляет собой высокопропускной способ для предварительной оценки липкости кандидатов мАт (Jacobs et al., Pharm Res., 27(1):65-71(2010)). В этом способе массу из человеческих поликлональных IgG химически соединяли с NHS-активированной хроматографической смолой. После этого сравнивали время удерживания ВПВ059 на недериватизированной и IgG-дериватизированной колонках с контрольной группой мАт с хорошими показателями и мАт с плохими показателями. С помощью этого способа у ВПВ059 не было выявлено каких-либо признаков неспецифичного связывания, что свидетельствует о его низких значениях времени удерживания и K' .

Данные CIC, показывающие растворимость и неспецифичное связывание

Антитело	Растворимость	Rt-тест	Rt-холостая проба	K'
5C8	хорошая	9,3	9,46	-0,017
Hu H0/L0	плохая	14,1	10,4	0,356
Li33	плохая	10,8	9,2	0,174
Герцептин	хорошая	9,5	9,4	0,011
15F3 H4/L1 (1-3)	хорошая	9,3	9,2	0,011
24F4 H4/L1 (1-5)	хорошая	9,3	9,1	0,022
16A8	хорошая	9,1	9	0,011

← более высокие значения K' может быть показателем

← более низкая растворимость

Пример 14. Оценка стабильности ВПВ059.

Дифференциальную сканирующую флуориметрию применяли для тестирования стабильности ВПВ059 в диапазоне условий, связанных с буфером для исходной исследовательской композиции. Разворачивание белка контролировали с помощью системы ПЦР в реальном времени Mx3005p (Agilent Technologies) в 96-луночном формате с использованием 10 мкг белка в 50 мкл ФБР (рН 7,0) с добавлением оранжевого флуорофора Sypro в конечной концентрации 10X (исходя из стокового указания 1000X от Invitrogen). Образцы нагревали на 1°C в минуту от 25 до 95°C с измерением интенсивности флуоресценции по три раза на каждый 1°C. Выстраивали диаграмму интенсивности флуоресценции в зависимости от температуры. Из этих кривых получали значение T_m , вводя отрицательное производное (" $-R'(T)$ " в программу Mx3005p) и выбирая локальные минимумы из диаграмм производных. Использовали базовый буфер 20 мМ цитрата натрия, уровень рН варьировался от 5,0 до 7,5, и концентрации NaCl и сахарозы варьировались от 50 до 250 мМ.

Стабильность была сходной при использовании буфера во всех указанных диапазонах. Фиг. 8 показывает данные при 150 мМ NaCl и 250 мМ сахарозы в зависимости от уровня рН. В качестве исследовательской композиции по сахарозе выбрали 20 мМ цитрата натрия, 150 мМ NaCl, рН 6,0 из-за трудности достижения высокой концентрации сахарозы при использовании исследовательских центрифужных концентраторов.

Пример 15. Оценка стабильности ВПВ059 при встряхивании.

Раствор мАт ВПВ059 в объеме 0,2 мл в 1 мг/мл 20 мМ цитрата натрия, рН 6,0, 150 мМ NaCl, подвергали реципрокному встряхиванию при комнатной температуре в 2 мл стеклянных флаконах (Waters, WAT270946C) с использованием титровального планшетного шейкера модели 4626 (Lab-Line Instruments, Titer Plate Shaker) при 600 оборотов в минуту. Агрегацию оценивали путем мониторинга увели-

чения мутности при 320 нм с использованием спектрофотометра Beckman DU640. Обнаружено, что ВПВ059 проявляет агрегацию в зависимости от времени. Обычно антитела человеческого IgG1 дикого типа не подвержены агрегации в таких условиях встряхивания. Как показано на фиг. 9, агрегация полностью подавлялась путем добавления 0,03% Твин 80, обычного наполнителя для композиции. Агрегация, индуцируемая встряхиванием, иногда может сильно зависеть от уровня pH. А-гликозилированные IgG4/IgG1 показывали более быструю и более обширную агрегацию, чем ВПВ059. Агрегация а-гликозилированных IgG4/IgG1 также подавляется путем добавления Твин 80.

Пример 16. Оценка вязкости ВПВ059.

Стабильность и вязкость образцов ВПВ059 измеряли при высоких концентрациях 150 мг/мл и больше, чтобы способствовать потенциальной разработке продукта для подкожного введения.

Растворы ВПВ059 центрифугировали в пробирках ультраконцентратора для ограничения полученных объемов и концентраций, что определяли УФ-сканированием. Стабильность определяли с помощью эксклюзионной хроматографии после хранения при 2-8°C в течение одной и двух недель. Концентрации белка, превышающие 200 мг/мл, легко достигались при небольших количествах белка в буфере 20 мМ цитрата, pH 6, 150 мМ NaCl, и агрегация оставалась низкой (0,68%) после двух недель хранения при температуре 2-8°C. Вязкость измеряли с использованием прибора Viscopro2000 (Cambridge Viscosity). Вязкость при 150 мг/мл составляла только 8 сП в цитратно-солевом буфере. Эти результаты показывают, что возможно получение высококонцентрированной композиции ВПВ059.

Пример 17. Клонирование гена BDCA2 человека.

Полноразмерную человеческую кДНК BDCA2 (huBDCA2) субклонировали в клонирующий вектор Invitrogen pCR4TOPO от Open Biosystems: эта плаزمид имеет обозначение pEAG2367. Секвенирование ДНК подтверждало, что эта кДНК была идентична полноразмерной кДНК BDCA2 человека в референс-банке Genbank под номером доступа NM 130441. Ниже показана полноразмерная открытая рамка считывания HuBDCA2, кодируемая pEAG2420, в которой подчеркнут ТМ-НММ-предсказанный трансмембранный домен

```

1  MVPEEEPQDR EKGLWWFQLK VWSMAVVSIL LLSVCFTVSS VVPHNFMYSK
51  TVKRLSKLRE YQQYHPSLTC VMEGKDIEDW SCCPTPWTSE QSSCYFISTG
101  MQSWTKSQKN CSVMGADLVV INTREEQDFI IQNLKRNSSY FLGLSDPGGR
151  RHWQWVDQTP YNENVTFWHS GEPNNLDERC AIINFRSSEE GWNDINHCHV
201  PQKSICKMCK IYI* (SEQ ID NO:1)

```

Ниже показана полноразмерная открытая рамка считывания HuFcεRIγ, кодируемая pEAG2413, которая идентична эталонной последовательности под номером в Genbank NP 004097

```

1  MIPAVLLLLL LLVEQAAALG EPQLCYILDA ILFLYGIVLT LLYCRLKIQV
51  RKAAITSYEK SDGVYTGSLT RNQETYETLK HEKPPQ* (SEQ ID NO:2)

```

Вектор экспрессии CHO, коэкспрессирующий кДНК и BDCA2 человека и FcεRIγ в тандемных транскрипционных единицах, был сконструирован путем субклонирования фрагмента SpeI 2,11 кб из pEAG2413 в линейаризованный фосфатизированный векторный каркас SpeI 6,71 кб из pEAG2420, в результате чего получен "унивектор", обозначенный как pEAG2456. Человеческие кДНК BDCA2 и FcεRIγ в pEAG2420 имели подтвержденные последовательности. Стабильная клеточная линия CHO, стабильно коэкспрессирующая кДНК BDCA2 и FcεRIγ, была получена путем трансфекции с pEAG2456.

Пример 18. Клонирование гена BDCA2 обезьян циномоглус и резус.

Выведенная открытая рамка считывания BDCA2 обезьян, кодируемая pEAG2384 и одной из форм SNP, выявленной в pEAG2383, показана ниже. Эта форма SNP ниже обозначена как форма E73 SNP из BDCA2 обезьян циномоглус. У резусов выявлена единственная последовательность, идентичная форме E73 SNP из BDCA2 циномоглусов

```

1  MVPEEEPQDR EKVWVWFQLK VWSVAVVSIL LLCVCFVSS VASHNFMYSK
51  TVKRLSKLQE YQQYYPSLTC VMEGKDMEDW SCCPTPWTSE QSSCYFISTV
101  MQSWTKSQNN CSVMGADLVV INTKEEQDFI TQNLKINSAY FLGLSDPKGW
151  RHWQWVDQTP YNKNVTFWHS GEPNSPDERC AIINFRSEEW GWNDVHCHVP
201  QKSICKMKKI YI* (SEQ ID NO:72)

```

Во второй форме SNP из BDCA2 обезьян циномоглус выделенный выше остаток 73 (GAA=Glu, E) представляет собой лизин (AAA=Lys, K). Вторая форма SNP называется формой K73 SNP из BDCA2 обезьян циномоглус. В человеческом BDCA2 остатком 73 является глутаминовая кислота. Ниже представлено содержащее пробелы выравнивание последовательностей BDCA2 человека (показано сверху) и обезьян (показано снизу), которые имеют 90,6% идентичности. Потенциальные N-связанные сайты гликозилирования заштрихованы. В обезьяньем BDCA2 не хватает одного потенциального сайта N-гликозилирования, который присутствует у человека (NSS в 137-139 в человеческих последовательностях по сравнению с NSA обезьян)

```

1 MVPPEEPQDREKGLWWFQLKVWSMAVVSILLLSVCFTVSSVVPNFMYSK 50
  |||
1 MVPPEEPQDREKGVWWFQLKVWSVAVVSILLLCVCFVSSVASHNFMYSK 50
51 TVKRLSKLREYQQYHPSLTCVMEGKDIEDWSCCPTPWTFSQSSCYFISTG 100
  |||
51 TVKRLSKLQEQYQQYPSLTCVMEGKDMEDWSCCPTPWTFSQSSCYFISTV 100
101 MQSWTKSQKNIKCEVMGADLVVINTREEQDFIIQNLKRNSSEYFLGLSDPGGR 150
  |||
101 MQSWTKSQKNIKCEVMGADLVVINTKEEQDFITQNLKINSAYFLGLSDPKGW 150
151 RHWQWVDQTPYNEKFWHSGEPNNLDERCAIINFRSSEEWGWNDIHCHV 200
  |||
151 RHWQWVDQTPYNKFWHSGEPNSPDERCAIINFRSEEWWGNDVHCHV 199
201 POKSICKMKKIYI* 214 (SEQ ID NO:1)
  |||
200 POKSICKMKKIYI* 213 (SEQ ID NO:72)

```

Ниже показана консенсусная открытая рамка считывания FcεR1γ обезьян циномоглус

```

1 MIPAVVLLLLL LLVEQAAALG EPQLCYILDA ILFLYGIVLT LLYCRLKIQV
51 RKAATASYEK SDGVYVGLST RNQETYETLK HEKPPQ (SEQ ID NO:73)

```

Последовательность кДНК FcεR1γ обезьян циномоглус идеально совпадает с предсказанной последовательностью кДНК резусов (исходя из короткого считывания генома), описанной в GenBank, номер доступа XM 001115585, и последовательностью обезьян циномоглус, депонированной учеными Genentech в GenBank, номер AF485816. Последовательность белка FcεR1γ обезьян циномоглус имеет 98,9% идентичности с человеческим белком FcεR1γ, и отличается только единственной консервативной заменой. Ниже представлено выравнивание между человеческой (сверху) и последовательностью обезьян циномоглус (снизу) FcεR1γ

```

1 MIPAVVLLLLL LLVEQAAALGEPQLCYILDA ILFLYGIVLT LLYCRLKIQV 50
  |||
1 MIPAVVLLLLL LLVEQAAALGEPQLCYILDA ILFLYGIVLT LLYCRLKIQV 50
51 RKAATASYEKSDGVYVGLSTRNQETYETLKHEKPPQ* 87 (SEQ ID NO:2)
  |||
51 RKAATASYEKSDGVYVGLSTRNQETYETLKHEKPPQ* 87 (SEQ ID NO:73)

```

Вектор экспрессии СНО, коэкспрессирующий кДНК формы E73 SNP из BDCA2 обезьян циномоглус и кДНК FcεR1γ в tandemных транскрипционных единицах, был сконструирован путем субклонирования фрагмента SpeI 2,11 кб из pCN652 в линейаризованный фосфатизированный векторный каркас SpeI 6,72 кб из pCN654, в результате чего получен "унивектор", обозначенный как pEAG2668. кДНК BDCA2 и FcεR1γ обезьян циномоглус в pEAG2668 имели подтвержденные последовательности. Стабильная клеточная линия СНО, стабильно коэкспрессирующая кДНК BDCA2 и FcεR1γ, была получена путем трансфекции с pEAG2668.

Пример 19. Перекрестная реактивность между BDCA2 человека и обезьян циномоглус.

Чтобы определить, имеет ли E73/K73 SNP BDCA2 обезьян циномоглус влияние на анти-BDCA2 связывание, клетки 293Е котрансфицировали векторами экспрессии, несущими репортер усиленного зеленого флуоресцентного белка (EGFP) (pEAG1458) и кДНК BDCA2 и FcεR1γ (человеческие BDCA2: pEAG2420 и FcεR1γ: pEAG2413; E73 BDCA2 обезьян циномоглус: pCN652 или K73 BDCA2: pCN656 и FcεR1γ циномоглус: pCN652) в молярных соотношениях 1:1:1. Через 3 дня после трансфекции клетки собирали и окрашивали PE-конъюгированным анти-BDCA2 человека Miltenyi AC144 mAb (Miltenyi Biotec, номер в каталоге 130-090-511) с помощью прямого связывания с титрованием и разведением FACS, со стробированием на зеленые EGFP-положительные клетки. На фиг. 10 показано прямое связывание AC144 с поверхностными BDCA2 человека и обезьян циномоглус.

Кажущиеся значения EC₅₀ являются, по существу, эквивалентными для человеческих BDCA2 и обеих форм E73 и K73 SNP из BDCA2 обезьян циномоглус. Учитывая этот результат, были получены стабильные трансфектанты СНО для поверхностного полноразмерного BDCA2 с использованием вектора экспрессии pEAG2456 BDCA2 человека/FcεR1γ и вектора экспрессии pEAG2668 из E73 SNP BDCA2/FcεR1γ обезьян циномоглус. Эти линии были использованы для сортировки перекрестно-реактивных антител против BDCA2 человека/обезьян циномоглус.

Пример 20. Слитые Fc конструкции эктодоменов BDCA2 человека и обезьян циномоглус.

Были разработаны пять слитых Fc конструкций человеческих и циномоглусных BDCA2 ECD. В трех из этих конструкций BDCA2 был присоединен посредством линкерной последовательности G4S к C-концу шарнирной и Fc-области человеческого IgG1. В двух из этих конструкций линкер G4S был заменен на сайт расщепления TEV протеазой ENLYFQC.

BDCA2 представляет собой мембранный белок типа II (C-конец находится за пределами клетки),

конструирование растворимых слитых белков Fc включает добавление С-концевого эктодомена BDCA2 (остатки 45-213 для BDCA2 человека) к С-концу сконструированных Fc из IgG, при этом секреция запускалась мышиной внутри-рамочной сигнальной каппа последовательностью легкой цепи. Конструкцию pEAG2367 полноразмерного huBDCA2 использовали в качестве матрицы для ПЦР с праймерами 5' CAG TGT CTG TTT CAC TCC CGG GGG TGG CGG TGG TAG CAA TTT TAT GTA TAG C 3' (SEQ ID NO: 74) (для добавления 5' XmaI (Pro-Gly) и немедленно-ранним линкером Gly4Ser перед 5'-концом эктодомена huBDCA2), и 5' CCA GGG AGA ATA GGA TCC TTA TAT GTA GAT CTT 3' (SEQ ID NO: 75) (для добавления сайта 3' BamHI сразу после терминаторной huBDCA2). ПЦР-продукт 0,56 кб очищали и субклонировали в клонирующий вектор pCRBluntII TOPO Invitrogen, получая pEAG2417, в котором вставленная кДНК последовательность была подтверждена. Фрагмент 0,53 кб XmaI-BamHI из pEAG2417 и фрагмент 0,75 кб NotI-XmaI из pEAG1397 (несущий сконструированные hulG1 Fc, секреция которых запускалась внутри-рамочной сконструированной мышиной сигнальной каппа последовательностью легкой цепи) лигировали с каркасными векторными фрагментами 1,89 кб BamHI-XbaI и 4,17 кб XbaI-NotI из вектора экспрессии pV90, с получением вектора экспрессии pEAG2421 слитого белка hulG1 Fc-huBDCA2, в котором вставленная кДНК последовательность была подтверждена. Выведенная открытая рамка считывания, кодируемая pEAG2421, показана ниже

```

1  MKLPVRLVL MFWIPASSE PKSSDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK
51  PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY
101 NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
151 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP
201 VLDSGDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFS CS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG
251 GGGGSNFMYS KTVKRLSKLR EYQQYHPSLT CVMEGKDIED WSCCPTPWT
301 FQSSCYFIST GMQSWTKSQK NCSVMGADLV VINTREEQDF IIQNLKRNS
351 YFLGLSDPGG RRHWQWVDQT PYNENVTFWH SGEPNNLDER CAIINFRSSE
401 EWGWNDIHC HVPQKSICKMK KIIYI* (SEQ ID NO:76)

```

Сигнальная последовательность легкой цепи каппа: остатки 1-19, показаны выше (курсивом);

человеческая Fc IgG1: остатки 20-250, см. выше;

G4S линкер: остатки 251-255, см. выше (выделено жирным шрифтом);

эктодомен huBDCA2: остатки 256-424, см. выше (подчеркнуто).

Для конструирования вектора экспрессии для слитого белка hulG2a Fc-huBDCA2, фрагмент 0,53 кб XmaI-BamHI из pEAG2417 и фрагмент 0,75 кб NotI-XmaI из pEAG1442 (несущий сконструированные мышинные IgG2a Fc, секреция которых запускается внутрирамочными сконструированными мышинными сигнальными каппа последовательностями легкой цепи) лигировали с векторными каркасными фрагментами 1,89 кб BamHI-XbaI и 4,17 кб XbaI-NotI из вектора экспрессии pV90, с получением pEAG2423, для которого вставленная кДНК последовательность была подтверждена. Выведенная открытая рамка считывания, кодируемая pEAG2423, показана ниже

```

1  MKLPVRLVL MFWIPASSE PRGPTIKPSP PCKCPAPNLL GGPSVFIFPP
51  KIKDVLMSL SPIVTCVVVD VSEDDPDVQI SWFVNNVEVH TAQTQTHRED
101 YNSTLRVISA LPIQHQDWMS GKEFKCKVNN KDLPAPIERT ISKPKGSVRA
151 PQVYVLPPEE EEMTKQVTL TCMVTFDFMPE DIYVEWTNNG KTELNYKNTF
201 PVLDSGDGSYF MYSKLRVEKK NWVERNYSYSC SVVHEGLHNN HTTKSFSRTP
251 GGGGSNFMY SKTVKRLSKL REYQQYHPSL TCVMEGKDIE DWSCCPTPWT
301 SFQSSCYFIS TGMQSWTKSQ KNCSVMGADLV VINTREEQDF FIIQNLKRNS
351 SYFLGLSDPG GRRHWQWVDQT PYNENVTFW HSGEPNNLDE RCAIINFRSS
401 EEGWNDIHC HVPQKSICKMK KIIYI* (SEQ ID NO:77)

```

Сигнальная последовательность легкой цепи каппа: остатки 1-19, показаны выше (курсивом);

мышинная Fc IgG1: остатки 20-251, см. выше;

G4S линкер: остатки 252-256, см. выше (выделено жирным шрифтом);

эктодомен huBDCA2: остатки 257-425, см. выше (подчеркнуто).

Стабильные клеточные линии CHO, продуцирующие слитые белки Fc-huBDCA2, получали путем трансфекции с векторами экспрессии pEAG2421 и pEAG2423. Эти слитые белки использовали в анализах связывания ELISA и ОСТЕТ для сортировки антител при скрининге кандидатов.

Для конструирования BDCA2 обезьян циномогус (суно-BDCA2) в целях получения слитого белка Fc, полноразмерные E73 SNP варианты из суно-BDCA2 в конструкции pCN648 подвергали сайт-направленному мутагенезу с праймерами 5' CTC TGT GTC TGT TTC ACT CCC GGG GGT GGC GGT GGT AGC AAT TTT ATG TAT AGC 3' (SEQ ID NO: 78) и его обратным комплементом, для добавления

линкера 5' XmaI (Pro-Gly) и Gly4Ser непосредственно перед 5'-концом эктодомена huBDCA2, с получением конструкции pEAG2675, для которой вставленная кДНК последовательность была подтверждена. Для конструирования вектора экспрессии для слитого белка muIgG2a Fc-супо BDCA2, фрагмент 0,53 кб XmaI-BamHI из pEAG2675 и фрагмент 0,75 кб NotI-XmaI из pEAG1442 (несущий сконструированные мышинные IgG2a Fc, секрета которых запускается внутрирамочными сконструированными мышинными сигнальными каппа последовательностями легкой цепи) лигировали с векторными каркасными фрагментами 1,89 кб BamHI-XbaI и 4,17 кб XbaI-NotI из вектора экспрессии pV90, с получением pEAG2677, для которого вставленная кДНК последовательность была подтверждена. Выведенная открытая рамка считывания, кодируемая pEAG2677, показана ниже

```

1  MKLPVRLVL MFWIPASSE PRGPTIKPSP PCKCPAPNLL GGPSVFIFFP
51  KIKDVLMSL SPIVTCVVVD VSEDDPDVQI SWFVNNVEVH TAQTQTHRED
101 YNSTLRVWSA LPIQHQDWSM GKEFKCKVNN KDLPAPIERT ISKPKGSVRA
151 PQVYVLPPEE EEMTKKQVTL TCMVTFDFMPE DIYVEWTNNG KTELNYKNTS
201 PVLDSGYSYF MYSKLRVEKK NWVERNYSYSC SVVHEGLHNN HTTKSFSRTP
251 GGGGGSNFMY SKTVKRLSKL QEYQOYPSL TCVMEGKDME DWSCCPTPW
301 SFQSSCYFIS TVMQSWTKSQ NNCSVMGADL VVINTKEEQD FITQNLKINS
351 AYFLGLSDPK GWRHWQWVDQ TPNKKNVTFW HSGEPNSPDE RCAIINFRSE
401 EWGWNDVHCH VPQKSICKMK KIYI* (SEQ ID NO:79)

```

Сигнальная последовательность легкой цепи каппа: остатки 1-19, показаны выше (курсивом); мышинная Fc IgG2: остатки 20-251, см. выше;

G4S линкер: остатки 252-256, см. выше (выделено жирным шрифтом);

эктодомен супоBDCA2: остатки 257-425, см. выше (подчеркнуто).

Стабильная клеточная линия CHO, продуцирующая слитый белок Fc-супоBDCA2, была получена путем трансфекции с вектором экспрессии pEAG2677.

Слитые белки muIgG2a FC-BDCA2 подвергались ограниченному протеолизу для выделения мономерных белков эктодомена BDCA2. Для более легкого выделения рекомбинантного растворимого эктодомена BDCA2 были сконструированы новые гибридные конструкции Fc, в которые был вставлен сайт расщепления протеазой TEV между C-концом Fc и N-концом эктодомена BDCA2. Были созданы сингены, несущие эктодомены BDCA2 человека или обезьян циномоглус, с сайтом 5' XmaI (Pro-Gly) для слияния с C-концом Fc, с последующим внутрирамочным сайтом TEV расщепления (ENLYFQG), слитым с остатком 45 из последовательности BDCA2, и с 3' сайтом BamHI после терминатора BDCA2, и эти сингены были получены от GeneWiz в виде вставки XmaI-BamHI в их собственный pUC57-амп. клонирующий вектор. Были подтверждены последовательности вставок в созданных конструкциях кДНК XmaI-BamHI TEV-BDCA2 эктодомена, pEAG2917 (человеческой) и pEAG2918 (обезьян циномоглус). Для конструирования экспрессирующих векторов CHO на основе pV90-IRES-dhfr для слитых белков Fc-huIgG1-TEV-BDCA2, фрагмент 0,75 кб NotI-XmaI из pEAG1397 и фрагменты 0,54 кб XmaI-BamHI из pEAG2917 или из pEAG2918 субклонировали в векторный каркасный фрагмент 5,4 кб BglII-NotI из pXJC194, с получением pEAG2937 (Fc-huBDCA2) или pEAG2938 (Fc-обезьян циномоглус BDCA2). Вставленные последовательности кДНК в pEAG2937 и pEAG2938 были подтверждены. Стабильные клеточные линии CHO были получены путем трансфекции с pEAG2937 и pEAG2938. Выведенная открытая рамка считывания слитого белка huFc-TEV-huBDCA2, кодируемого pEAG2937, показана ниже

```

1  MKLPVRLVL MFWIPASSE PKSSDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK
51  PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY
101 NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAIEKTI SKAKQPREP
151 QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP
201 VLDSGDSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFCSC VMHEALHNNH TQKSLSLSPG
251 ENLYFQGNFM YSKTVKRLSK LREYQOYHPS LTCVMEGKDI EDWSCCPTPW
301 TSFOSSCYFI STGMOSWTKS QKNCSVMGAD LVVINTREEQ DFIIQNLKRN
351 SSYFLGLSDP GRRRWQWVD QTPYNENVTF WHSGEPNNLD ERCAIINFRS
401 SEEWGNDIHN CHVPQKSICK MKKIYI* (SEQ ID NO:80)

```

Сигнальная последовательность легкой цепи каппа: остатки 1-19, показаны выше (курсивом);

человеческая Fc IgG1: остатки 20-250, см. выше;

сайт расщепления TEV: остатки 251-257, см. выше (выделено жирным шрифтом);

эктодомен huBDCA2: остатки 258-426, см. выше (подчеркнуто).

Выведенная открытая рамка считывания гибридного белка huFc-TEV-супо BDCA2, кодируемого pEAG2938, показана ниже

1 *MKLPVRLVL MFWIPASSE PKSSDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK*
 51 *PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY*
 101 *NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP*
 151 *QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP*
 201 *VLDSGDGFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNNH YQKSLSLSPG*
 251 ***ENLYFQGNFM YSKTVKRLSK LOEYQQYYPS LTCVMEGKDM EDWSCCPTPW***
 301 *TSFQSSCYFI STVMQSWTKS QNNCSVMGAD LVVINTKEEQ DFITQNLKIN*
 351 *SAYFLGLSDP KGWRHWQWVD QTPYNKNVTF WHSGEPNSPD ERCAIINFRS*
 401 *EEWGWNDVHC HVPQKSICKM KKIYI** (SEQ ID NO:81)

Сигнальная последовательность легкой цепи каппа: остатки 1-19, показаны выше (курсивом);
 человеческая Fc IgG1: остатки 20-250, см. выше;

сайт расщепления TEV: остатки 251-257, см. выше (выделено жирным шрифтом);

эктодомен huBDCA2: остатки 258-425, см. выше (подчеркнуто).

Пример 21. Связывание ВПВ059 со слитыми белками BDCA2-FC.

Способность ВПВ059 связываться с huBDCA2-FC в растворе оценивали с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC) (фиг. 11). При отдельном анализе ВПВ059 (верхнее изображение) и huBDCA2 (среднее изображение) элюировали в виде отдельных острых пиков с молекулярными массами примерно 150 кДа. При анализе смеси ВПВ059 и huBDCA2-FC (нижнее изображение) наблюдается смещение молекулярных масс ВПВ059 и huBDCA2-FC в сторону увеличения больше 550 кДа, что подтверждается их элюированием на более ранних положениях на хроматограмме. Гетерогенность пиков элюирования предположительно вызвана тем фактом, что каждый из ВПВ059 и BDCA2-FC содержит 2 сайта связывания и, следовательно, образуется большое количество комплексов ВПВ059 и BDCA2 с различными параметрами стехиометрии.

Связывание супоBDCA2 ECD с ВПВ059 также оценивали в анализе SEC, и это связывание также вызывало количественный сдвиг к комплексам с более высокой молекулярной массой.

Пример 22. Кальций усиливает связывание ВПВ059 с BDCA2.

Было исследовано связывание ВПВ059 с BDCA2 человека, слитым с мышиной Fc (huBDCA2-muFc) в присутствии кальция или ЭДТА в анализе связывания ОСТЕТ. Белок huBDCA2-muFc захватывался на биосенсоре с анти-мышинным Fc с последующей ассоциацией ВПВ059 и стадией диссоциации. Все стадии проходили в 50 mM HEPES, pH 7, 100 mM NaCl, 1 мг/мл БСА, 0,02% Твин 20 и 0,001% азида, содержащей или 10 mM CaCl₂ или 10 mM ЭДТА.

Фиг. 12 показывает, что ВПВ059 связывание усиливается путем добавления кальция по отношению к ЭДТА, что приводит к получению сигнала, который примерно в 2 раза выше. Кальций оказывал эффект и на скорость ассоциации и на скорость диссоциации.

Пример 23. Измерение связывания.

Анализ ОСТЕТ применяли для мониторинга связывания ВПВ059 со слитым белком FC-BDCA2 и BDCA2 ECD. Фиг. 13 показывает ОСТЕТ-эксперимент, в котором ВПВ059 помещали на наконечники ОСТЕТ с античеловеческими Fc в концентрации 20 мкг/мл. Для стадии ассоциации BDCA2 ECD человека и обезьян циномоглус добавляли в концентрации 2 мкг/мл. Для этого эксперимента использовали буфер 50 mM HEPES, pH 7, 100 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 1 мг/мл БСА, 0,02% Твин-20 и 0,001% азида. В этих условиях связывание ВПВ059 с BDCA2 ECD человека и обезьян циномоглус было сопоставимым.

Пример 24. Анализ РВМС для определения значения IC₅₀ для ВПВ059 при ингибировании TLR9 - индуцированной продукции ИФН α .

Было показано, что лигирование BDCA2 активирует BCR-подобный сигнальный каскад, который мощно подавляет способность клеток рDC продуцировать интерфероны I типа и другие цитокины в ответ на TLR лиганды (Сао W. et al., PLoS Biol., 5 (10):e248 (2007)). Ингибирование TLR9-индуцированной продукции ИФН α посредством РВМС использовали в качестве первичного клеточного анализа для скрининга.

Клетки РВМС из гепаринизированной венозной крови здоровых доноров выделяли центрифугированием с прерывистым градиентом над Фиколлом, промывали в ФБР и ресуспендировали в полной культуральной среде (RPMI с 3% FBS). Высевали 1×10^6 клеток на лунку и стимулировали 10 мкг/мл TLR9-лиганда (CpG-A ODN 2216) в присутствии доз ВПВ059 и 24F4A-Agly (Fc-урезанная версия ВПВ059), или контрольного изотипа мАт в диапазоне от 10 мкг/мл до 1 мкг/мл в общем анализируемом объеме 200 мкл на лунку. Планшеты инкубировали в течение ночи (18 ч) при 37°C, затем собирали супернатанты для оценки в анализе ИФН α ELISA (PBL InterferonSource). Анализы проводили в соответствии с протоколом производителя. Анализировали титрование ВПВ059 и 24F4A agly для определения IC₅₀ при ингибировании TLR9-индуцированной продукции ИФН α . В общей сложности в двенадцати независимых экспериментах были получены средние значения IC₅₀ 0,001 мкг/мл для ВПВ059. А-гликозилированное мАт обладало меньшей мощностью, со средним IC₅₀ 0,007 мкг/мл (фиг. 14).

Также исследовали способность анти-BDCA2 мАт ингибировать продукцию ИФН α после стимуля-

ции физиологически соответствующим лигандом, а именно, сывороткой от пациентов с СКВ. Считается, что СКВ-сыворотка индуцирует ИФН I типа посредством комплексов анти-ДНК аутоантител и иммуностимулирующих гипометилированных ДНК, которые стимулируют TLR9. Клетки pBMC стимулировали сывороткой больного СКВ (предоставленной Dr. Gregg Silverman, NYU) и использовали в конечном разведении 1/5. Антитело 24F4S H4/L1C95S, которое отличается от ВПВ059 одним аминокислотным остатком, полностью устраняет продукцию ИФНа из клеток pDC, стимулированных сывороткой СКВ (фиг. 18).

Пример 25. TLR9-индуцированная продукция ИФНа в цельной крови.

Активность ВПВ059 также оценивали в анализе цельной крови по TLR9-индуцированной продукции ИФНа.

Цельную кровь брали из гепаринизированной венозной крови здоровых доноров. Дозы ВПВ059 и 24F4A-agly варьировались от 10 до 1 мкг/мл в общем анализируемом объеме 200 мкл на лунку. Добавляли CpG-A в количестве 200 мкг/мл, которое было определено как оптимальное для стимуляции продукции ИФНа в цельной крови. Планшеты инкубировали в течение 18 ч при 37°C, затем собирали супернатанты для использования в анализах ELISA ИФНа (PBL InterferonSource). Анализы проводили в соответствии с протоколом производителя. На фиг. 15А показан репрезентативный эксперимент из 6 выполненных независимых экспериментов. Ингибирующий потенциал ВПВ059 в анализе TLR9-индуцированной продукции ИФНа в цельной крови был аналогичен активности, выявленной в анализах pBMC. В дополнение к ингибированию цитокинов, продуцируемых pDC (ИФНа, ИЛ-6), обработка с помощью ВПВ059 также приводила к ингибированию большого массива цитокинов и хемокинов (фиг. 15С).

Следующий эксперимент проводили для определения возможности ВПВ059 ингибировать TLR9-индуцированную продукцию ИФНа в цельной крови от больных СКВ аналогично тесту на здоровых добровольцах. С этой целью цельную кровь от 2 больных СКВ или от 2 здоровых доноров стимулировали 200 мкг/мл CpG-A в присутствии 10 мкг/мл ВПВ059, после чего оценивали продукцию ИФНа с помощью ELISA. В частности, цельная кровь от 2 больных СКВ или от 2 здоровых доноров была предоставлена Biogeneration LLC с доставкой течение ночи. После получения кровь обрабатывали 10 мкг/мл ВПВ059 или контрольным изотипом, стимулировали 200 мкг/мл CpG-A и высевали в 96-луночный планшет. Планшеты инкубировали в течение 18 ч при 37°C и собирали супернатанты для использования в анализах ELISA ИФНа (PBL InterferonSource). Анализы проводили в соответствии с протоколом производителя.

Как показано на фиг. 15В, ВПВ059 показывает одинаковую эффективность в цельной крови от больных СКВ по сравнению тестом на здоровых добровольцах.

Пример 26. Оценка ВПВ059-опосредованного ингибирования интерферонов I типа.

Ингибирующее действие ВПВ059 также подтверждали с помощью очищенных клеток pDC, стимулированных или синтетическими агонистами TLR (CPG-A), или более физиологичным стимулом (СКВ-сыворотка). Также определяли ингибирующий эффект перекрестного связывания BDCA2 на другие цитокины (ИЛ-6), продуцируемые клетками pDC. Активность ВПВ059 подтверждали с помощью различных подходов, таких как качественная полимеразная цепная реакция и ELISA.

а) Q-ПЦР.

В организме человека существует тринадцать подтипов ИФНа и единственный член ИФНβ. Стимуляция агонистами TLR9 вызывает усиление активности большинства интерферонов типа I (Ito T. et al., Blood, 107 (6): 2423-31 (2006)). Ингибирование генов отдельного ИФН I типа оценивали с помощью анализов качественной полимеразной цепной реакции (qПЦР).

Клетки pDC очищали с использованием технологии двухэтапного разделения магнитными шариками (набор MACS, Miltenyi Biotec). Клетки pDC в количестве 5×10^4 на лунку стимулировали 5 мкМ CpG-A в отсутствие ВПВ059 или в присутствии ВПВ059 в возрастающих концентрациях, или 10 мкг/мл контрольного изотипа. Общий анализируемый объем составлял 200 мкл на лунку. Планшеты инкубировали в течение 18 ч при 37°C, затем РНК экстрагировали из клеток с использованием рсредства Тризол (корпорация Invitrogen) и дополнительно очищали с помощью колонки RNeasy Mini (Qiagen Sciences). Все праймеры и зонды были приобретены в компании Applied Biosystems Inc. Относительное количество транскриптов определяли для каждого образца путем сравнения со стандартной кривой олигонуклеотидов с использованием программного обеспечения детекции последовательностей (Sequence Detection Software, Applied Biosystems Inc.) и стандартизировали по контролю (GAPDH).

Обработка с помощью ВПВ059 ингибировала транскрипцию всех тестируемых интерферонов I типа, таким образом, были воспроизведены предыдущие данные с использованием клона AC144 антитела против BDCA2 (Cao W. et al., PLoS Biol, 5(10):e248 (2007)).

б) ELISA.

Эффект ВПВ059 на ингибирование цитокинов посредством pDC проверяли на белковом уровне с помощью ELISA. Клетки pDC в количестве 5×10^4 на лунку стимулировали 5 мкМ CpG-A в отсутствие ВПВ059 или в присутствии ВПВ059 в возрастающих концентрациях, или 10 мкг/мл контрольного изотипа. На фиг. 17 показано количество секретируемого ИФНа и ИЛ-6, измеренное у репрезентативного донора из трех тестируемых здоровых доноров.

Лигирование BDCA2 с ВПВ059 мощно индуцирует продукцию ИФНа и значительно снижает про-

дукцию ИЛ-6, индуцированную стимуляцией CpG-A.

Пример 27. ВПВ059-опосредованная интернализация рецепторов.

Было показано, что лигирование BDCA2 с анти-BDCA2 мАт (клон AC144, Miltenyi) быстро индуцирует интернализацию рецепторов (Dzionic A. et al., J. Immunol., 165(11):6037-46 (2000)). Следующий эксперимент был направлен на определение кинетики ВПВ059-опосредованной интернализации BDCA2.

Человеческую цельную кровь обрабатывали ВПВ059 в концентрации 10, 1, 0,1 или 0,01 мкг/мл или контрольным изотипом (10 мкг/мл) при 37°C в течение указанного времени, а затем инкубировали в течение 30 мин при 4°C с FITC-меченным не-перекрестным блокирующим анти-BDCA2 мАт (клон 2D6), анти-HLADR, анти-CD123, анти-CD14 и анти-CD20. Эритроциты лизировали буфером IX Easy-lyse (BD Bioscience) и оставшиеся клетки фиксировали. На фиг. 19А показаны значения средней интенсивности флуоресценции (MFI) при 2D6-FITC окрашивании клеток рDC CD14-CD20-HLA-DR+CD123+, дающих сигнал выше порогового значения. FMO (контрольная флуоресценция минус один) состояла из коктейля FACS окрашивания минус 2D6-FITC. Данные на этой фигуре отражают репрезентативный эксперимент из 3 выполненных независимых экспериментов.

Как показано на фиг. 19А, при инкубации с ВПВ059 1 мкг/мл, интенсивность FITC-меченого 2D6-окрашивания быстро снижалась, достигая исходного уровня в течение одного часа инкубации при 37°C. Десятикратное снижение концентрации ВПВ059 (0,1 мкг/мл) влияло на кинетику эндоцитоза, задерживая его на 2 ч. Это показывает, что интернализация BDCA2 при связывании с ВПВ059 проходит с дозозависимой кинетикой.

Следующий эксперимент проводили для определения возможного влияния ВПВ059-опосредованной интернализации рецептора на ингибирование ИФН. Цельную кровь собирали из гепаринизированной венозной крови здоровых доноров и предварительно инкубировали с ВПВ059 (для осуществления интернализации рецепторов) или с изотипом в течение указанного времени. В каждой точке времени после предварительной инкубации проводили провокацию клеток введением 200 мкг/мл CPGA, и инкубировали в течение дополнительных 18 ч при 37°C. Супернатанты собирали для использования в анализах ИФНа ELISA (PBL InterferonSource). Анализы проводили в соответствии с протоколом производителя.

Фиг. 19В показывает репрезентативный эксперимент из 3 выполненных независимых экспериментов. Как показано на фиг. 19В, через 9 ч предварительная инкубация с ВПВ059 перед стимуляцией - в соответствии с максимальной интернализацией - не влияет на ингибирование ИФН, и предполагается наличие потенциальной связи между эндоцитозом BDCA2 и ингибированием TLR9. Для проверки этой гипотезы были использованы анти-BDCA2 моноклональные антитела, которые не могли опосредовать ингибирование ИФН и продемонстрировали отсутствие интернализации. Дополнительно, авторы показали, что бивалентное связывание было необходимо для анти-BDCA2-опосредованного ингибирования ИФН. Фактически, Fab-фрагмент не вызывал интернализацию или ингибирование ИФН. Полученные данные в совокупности указывают на возможность того, что для BDCA2-опосредованного ингибирования TLR9 необходим эндоцитоз и локализация в эндосомальных компартментах, содержащих TLR9. Эту гипотезу можно проверить с помощью живой визуализации для отслеживания интернализации BDCA2 и перемещения в клетку после лигирования ВПВ059.

Пример 28. Эффекторная функция антитела.

Домен Fc ВПВ059 является полностью гликозилированным человеческим IgG1 и компетентным для связывания и с клеточными рецепторами Fcγ и с комплементом, и для индукции клеточных ответов эффекторных иммунных клеток, как посредством антиген-зависимой цитотоксичности (ADCC), так и комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC). Для того чтобы подтвердить связывание ВПВ059 с Fc-рецепторами, проводили измерение относительных показателей аффинности связывания с использованием гомогенного анализа с усиленной люминесцентной близостью (ALPHA) по методике Perkin Elmer (фиг. 20). Анализ проводили в конкурентном формате, при котором серийные разведения тестовых антител инкубировали со слитыми белками рецептор-GST и анти-GST акцепторными шарикам в течение ночи при 4°C в 96-луночном планшете. Стрептавидиновые донорные шарики и биотинилированный IgG1 дикого типа также инкубировали в течение ночи при 4°C в отдельной пробирке и затем на следующий день добавляли в планшет для анализа. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч при осторожном встряхивании, затем считывали в ридере Envision (Perkin Elmer). Чтобы определить относительные значения аффинности связывания, полученные данные наносили на 4-параметрическую кривую аппроксимации, используя программное обеспечение GraphPad Prism для вычисления значений IC₅₀. Были рассчитаны IC₅₀ значения для ВПВ059 FcγR1: 0,03 мкг/мл, FcγR11a: 11 мкг/мл, FcγR11b: 17 мкг/мл и FcγR111a: 3 мкг/мл. Эти значения сопоставимы со значениями, которые выявлены и для других человеческих IgG1 антител в этом тесте. Были также определены значения IC₅₀ для версии 24F4 с низкой эффекторной функцией G4P/G1 agly, используемой в исследованиях с обезьянами циномоглус. Как и предполагалось, не было обнаружено связывание с FcγR11a, FcγR11b и FcγR111a, а связывание с FcγR1 было снижено в 100 раз. Антитело 5c8 в каркасах IgG1 дикого типа и G4P/G1 agly было включено в анализы в целях сравнения.

Пример 29. Фиксация комплемента.

Было показано, что покрытие антителами мишеней опосредует мощные механизмы уничтожения посредством ADCC или CDC. Эти эффекторные функции антител опосредуются Fc-областью антитела. Этот эксперимент был направлен на определение способности ВПВ059 к рекрутингу комплемента путем тестирования его связывание с C1q способом ELISA.

Анализ связывания с C1q проводили в 96-луночном планшете ELISA с использованием планшетов Maxisorb ELISA. Тестируемые антитела наносили сериями в 3-кратном разведении в ФБР, начиная с 15 мкг/мл, выдерживали в течение ночи при 2-8°C, затем лунки промывали ФБР, 0,05% Твин 20 и блокировали 200 мкл 0,1М фосфата натрия, pH 7,2, 0,1М NaCl, 0,1% желатина, 0,05% Твин 20. Затем добавляли 50 мкл на лунку 2 мкг/мл человеческого C1q от Complement Technology (A099), разведенного в блокирующем/разбавляющем буфере, и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. После аспирации и промывки, как описано выше, добавляли 50 мкл на лунку куриного IgY против человеческого C1q (коммерческая продукция Aves Labs, Inc., с использованием человеческого C1q, C0660 от Sigma), разведенного в 8000 раз в блокирующем/разбавляющем буфере. После инкубации в течение 1,5 ч при комнатной температуре лунки аспирировали и промывали, как описано выше. Ослиный F(ab')₂ антикуриный IgY конъюгат пероксидазы хрена (Jackson ImmunoResearch 703-030-155) разбавляли до 5000 раз в блокирующем/разбавляющем буфере, после чего добавляли в концентрации 50 мкл на лунку и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После аспирации и промывки, как описано выше, добавляли 100 мкл субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) (420 мкМ ТМБ, 0,004% H₂O₂ в 0,1М буфере ацетат натрия/лимонная кислота, pH 4,9) и инкубировали в течение 2 мин до прекращения реакции путем добавления 100 мкл 2н. серной кислоты. Оптическую плотность считывали при 450 нм на оборудовании PRO SoftMax и использовали программное обеспечение SoftMax для определения относительной аффинности связывания (С-значение) с подбором 4 параметров.

Фиг. 21 показывает, что хотя ВПВ059 способны связываться C1q, 24F4A IgG4.P/IgG1 agly, по существу, лишены связывания с C1q.

Пример 30. Исследование истощения клеток.

ВПВ059 мощно подавляет продукцию ИФН I типа и ИЛ-6 после лигирования с BDCA2. В дополнение к агонистическому действию, были проведены следующие эксперименты для оценки возможности ВПВ059 истощать клетки рDC, несущие BDCA2, посредством своей функциональной Fc-области. Для исследования цитотоксического потенциала ВПВ059 была протестирована его активность в анализах ADCC и CDC.

а) Анализ ADCC.

ADCC представляет собой механизм, посредством которого эффекторные клетки иммунной системы активно лизируют клетки-мишени, к поверхностным рецепторам которых были присоединены антитела (фиг. 22).

В качестве мишени использовали клеточную линию CHO (клон 34.16.7 EAG2456 T1F2). Уровень экспрессии BDCA2 на поверхности клеток CHO определяли с помощью FACS с использованием APC-меченых анти-BDCA2 мАт (клон AC144, Miltenyi). Клетки НК были использованы в качестве эффекторных клеток, которые были выделены из цельной крови с помощью негативной селекции с использованием обогащенного коктейля человеческих НК-клеток RosetteSep™ (Human NK Cell Enrichment Cocktail (Stem Cells Technologies)). После 20-минутной инкубации с этим коктейлем при комнатной температуре НК-клетки выделяли центрифугированием в прерывистом градиенте над Фиколлом. Клетки CHO и человеческие НК-клетки высевали в соотношении 5:1 (НК:CHO) в присутствии эффекторных компетентных анти-BDCA2 моноклональных антител (24F4S и ВПВ059), Fc-урезанных мАт (24F4S-Agly и 24F4A-Agly) или контрольного изотипа IgG1, и инкубировали в течение 4 ч при 37°C. Отрицательный контроль состоял из лунок, содержащих клетки CHO и НК без антител. Клетки НК и клетки CHO, лизированные с Тх-100, использовали для определения максимального уничтожения. ADCC оценивали с использованием набора для анализа цитотоксичности Vybrant (Invitrogen), следуя инструкциям производителя. В анализе были обнаружены Г-6-ФД из поврежденных клеток, на основании Г-6-ФД-зависимой редукции резазурина, который излучает флуоресценцию при 590 нм при возбуждении при 530 нм. Анализ ADCC, показанный на фиг. 22, часть А, проводили с использованием клеток CHO с высокой экспрессией BDCA2 (часть С) и в анализе ADCC согласно фиг. 22, часть В использовали клетки CHO с более низкой экспрессией BDCA2 (часть D).

24F4S вызывали 100% гибель клеток CHO, несущих BDCA2, подобно лизированию тритоном X. Как и предполагалось, а-гликозилированная версия мАт (24F4S-agly) не вызывает ADCC (фиг. 22А). При сравнении с 24F4S, ВПВ059 обладает идентичной активностью ADCC (фиг. 22В). Следует отметить, что эффективность уничтожения коррелирует с уровнем экспрессии BDCA2 на клетках CHO (фиг. 22С и 22D).

б) Анализ CDC.

При комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) C1q связывается с антителом, запуская каскад комплемента и вызывает лизис клеток (фиг. 23). Как показано в разделе примера 29, ВПВ059 может эффективно связываться с компонентом комплемента C1q. Этот эксперимент проводили для подтверждения возможности ВПВ059 опосредовать CDC.

Стабильно трансфицированные клетки CHO-BDCA2/FcεRIγ (клон 34.16.7 EAG2456 T1F2) высевали

в результате чего получали конструкцию pCN822, для которой было подтверждено, что выведенная последовательность Slec4b2 белка идентична последовательности NM 001005896. Был сконструирован вектор экспрессии млекопитающих для полноразмерной кДНК крысиного Slec4b2 путем лигирования фрагмента 0,64 кб NotI-BamHI из pCN822 с векторными каркасными фрагментами 1,89 кб BamHI-XbaI и 4,17 кб XbaI-NotI из вектора экспрессии pV90, для получения экспрессионного вектора pCN834, в котором последовательность вставленной кДНК была подтверждена.

Крысиные кДНК FcεRIγ описаны в GenBank, номер доступа NM_001131001. Последовательность белка крысиного FcεRIγ имеет 90,7% идентичности с человеческим FcεRIγ: выравнивание с человеческой (сверху) и крысиной последовательностью (снизу) показано ниже

1 MIPAVVLLLLLLVVEQAAALGEPQLCYILDAILFLYGVVLTLLYCRLKIQV 50

|||||:| |||||:|||||||

1 MIPAVILFLLLLVEEAAALGEPQLCYILDAILFLYGVVLTLLYCRLKIQV 50

51 RKAAITSYBKSDGVYTG LSTRNQET YETLKN EKP PQ 86 (SEQ ID NO: 2)

||| | | |||| | |||| · |||||

51 RKADIASREKSDAVYTG LNRNQET YETLKN EKP PQ 86 (SEQ ID NO: 86)

Крысиные кДНК FcεRIγ клонировали с помощью РТ-ПЦР из первой цепи кДНК крысиной селезенки с праймерами 5' CCC AGC GCT GCA GCC CGC GGC CGC CAT GAT CCC AGC GGT 3' (SEQ ID NO: 87) (при этом добавляется сайт NotI и последовательность Козака непосредственно перед инициатором метионином FcεRIγ) и 5' GAA CAC GTG TTG GGA TCC TAT TGG GGT GGT TTC TC 3' (SEQ ID NO: 88) (при этом добавляется сайт 3' BamHI сразу после терминатора FcεRIγ). Продукт РТ-ПЦР 0,27 кб очищали и субклонировали в клонирующий вектор pCR2.1T0P0 Invitrogen, получая конструкцию pCN816, в которой вставки секвенировали и подтверждали ее идентичность по отношению к NM 001131001. Фрагмент 0,27 кб NotI-BamHI из pCN816 лигировали в векторные каркасные фрагменты 0,66 кб BamHI-XhoI и 4,16 кб XhoI-NotI из pBHS103, для конструирования экспрессионного вектора млекопитающих pCN844, в котором была подтверждена вставка крысиной кДНК последовательности FcεRIγ.

Для определения способности лидерного hu24F4H4/L1 C95A мАт связываться с поверхностным Slec4b2 крысы, клетки 293Е транзитивно котрансфицировали с экспрессионным вектором репортера EGFP (pEAG1458) и либо с векторами BDCA2 человека/FcεRIγ (pEAG2420 и pEAG2413), либо с векторами крысиного Slec4b2/FcεRIγ (pCN834 и pCN844) в молярных соотношениях 1:1:1. Через 3 дня после трансфекции клетки собирали и окрашивали лидерным hu24F4H4/L1 C95A мАт в прямом анализе связывания FACS с титрованием в разведении, при стробировании на живых EGFP-позитивных клетках. Была отмечена высокая аффинность связывания hu24F4 с поверхностным BDCA2 человека, но при этом не обнаружено связывание с поверхностным Slec4b2 крысы. Это указывает на отсутствие у hu24F4 перекрестной реактивности к ближайшему крысиному гомологу BDCA2 человека.

Пример 32. Введение ВПВ059 здоровым обезьянам циномоглус приводит к потере BDCA2 с поверхности плазматоидных дендритных клеток, вероятно, посредством интернационализации.

Для оценки возможных изменений уровня поверхностных BDCA2 при введении ВПВ059 обезьянам циномоглус применяли два анализа. В первом анализе, который представлял собой так называемый "прямой" способ, было обнаружено поверхностное связывание ВПВ059 с античеловеческим РЕ-меченым вторичным антителом. В идеале, для обнаружения общего BDCA2 можно было бы использовать неперекрестно блокирующее антитело к BDCA2; однако, такие антитела не существуют. Таким образом, во втором анализе с помощью так называемого "непрямого" способа выполняли обнаружение незанятых BDCA2 путем добавления ВПВ059, конъюгированного с А647.

Перед введением любых тестируемых агентов для каждой обезьяны циномоглус была установлена максимальная средняя интенсивность флуоресценции (MFI) для связывания ВПВ059 с рDC в 3 различных точках времени (за 3, за 2 и за одну неделю перед однократной инъекцией ВПВ059). В каждой точке времени титры немеченого ВПВ059 (от 40 до 0,04 мкг/мл в конечной концентрации) добавляли в аликваты крови, и проводили обнаружение ВПВ059 с использованием РЕ-меченого вторичного антитела ("прямой" способ), или проводили оценку свободных BDCA2 с ВПВ059-А647 ("непрямой" способ). Максимальные значения были взяты из значений на плато в каждом анализе (фиг. 24 и 25). Оценка значений показала очень небольшое колебание максимальной MFI для каждой обезьяны циномоглус, и более высокую вариабельность между обезьянами циномоглус, что указывает на вариабельность плотности BDCA2 на клетках рDC у обезьян циномоглус (табл. 2).

Цельную кровь забирали от двенадцати обезьян циномоглус, один раз в неделю в течение всего трех недель. Кровь инкубировали с различными концентрациями ВПВ059 человеческого IgG1 (от 0,04 до 40 мкг/мл, кривая с 6 точками, 1:4-кратные разведения). Клетки рDC идентифицировали с помощью про-

точной цитометрии, как CD20-CD14-CD123+HLA-DR+, и обрабатывали античеловеческим IgG PE-меченым вторичным антителом для обнаружения ВПВ059, связанного с рецептором BDCA2 на клетках рDC. Значение MFI от PE рассчитывали с программным обеспечением FlowJo, кривые EC₅₀ были получены в программном обеспечении GraphPad Prism.

Таблица 2. Результаты среднего EC₅₀ значения связывания ВПВ059 с BDCA2 клеточной поверхности на рDC в цельной крови обезьян циномоглус

Доноры-обезьяны циномоглус	EC ₅₀ (мкг/мл)
1	0,81
2	1
3	0,95
4	1,7
5	0,71
6	1,3
7	1,1
8	1,2
9	1,4
10	1,2
11	1,4
12	1,6
Среднее значение	1,2
SD	0,3

* среднее значение из 2-3 экспериментов.

После введения носителя, как и ожидалось, ВПВ059 не были обнаружены и не выявлено каких-либо существенных изменений в уровнях BDCA2, что было оценено по связыванию с ВПВ059-α647 (10 мкг/мл) (фиг. 26).

После внутривенного (в/в) введения ВПВ059 в обеих дозах 10 и 1 мг/кг не было обнаружено ВПВ059 на поверхности, даже сразу через 1 ч после инъекции ВПВ059 (фиг. 27 и 28). Кроме того, не было выявлено свободных BDCA2, что оценивали по отсутствию ВПВ059-А647 через 38 дней у всех получавших лечение обезьян циномоглус, за исключением обезьяны № 5; концентрация в сыворотке крови у этой обезьяны циномоглус быстро упала на день 10, скорее всего, по причине иммуногенности, выработанной против ВПВ059.

После подкожного введения более низкой дозы ВПВ059 (0,2 мг/кг) было выявлено присутствие ВПВ059 на поверхности рDC в течение короткого периода (в течение 1 ч, исчезли через 6 ч). В той же точке времени (1 ч) наблюдалось некоторое количество свободных BDCA2 (13, 74, 72% от исходного уровня MFI). Аналогично, лекарство не было обнаружено во всей остальной части исследования, и не был выявлен ни один свободный рецептор BDCA2 до дня 14 после инъекции ВПВ059 (фиг. 29).

У всех обезьян циномоглус появление свободного BDCA2 совпадает с падением уровня лекарства в сыворотке ниже 1 мкг/мл (фиг. 30 и 31). Таким образом, 1 мкг/мл предположительно является минимальной концентрацией ВПВ059, необходимой для опосредования интернализации всех поверхностных BDCA2.

В табл. 3 приведены значения EC₅₀, EC₅₀ и EC₉₀ интернализации рецептора BDCA2 на клетках рDC после лигирования с ВПВ059 в цельной крови обезьян циномоглус. Кривые EC₁₀₋₅₀₋₉₀ были получены в программном обеспечении GraphPad Prism с использованием четырех-параметрического подбора.

Таблица 3

Обезьяны циномолгус	Путь введения	Доза (мг/кг)	ЕС ₁₀ (мкг/кг)	ЕС ₅₀ (мкг/кг)	ЕС ₉₀ (мкг/кг)
5	в/в	1	0,003	0,087	0,370
6	в/в	1	0,022	0,025	0,055
7	в/в	1	0,014	0,090	0,580
3	в/в	10	0,100	0,150	0,220
8	в/в	10	0,095	0,370	1,455
10	в/в	10	0,114	0,126	0,265
4	п/к	0,2	0,078	0,088	0,100
6	п/к	0,2	0,040	0,046	0,054
12	п/к	0,2	0,114	0,121	0,129
Среднее значение			0,064	0,123	0,359
Стандартное отклонение			0,045	0,101	0,445

Таким образом, эксперименты, описанные в этом примере, показывают, что: внутривенное введение ВПВ059 *in vivo* в высоких дозах (10 и 1 мг/кг) приводит к быстрому исчезновению с клеточной поверхности как доступных BDCA2, так и связанного лекарства, что предполагает интернализацию рецептора. Подкожное введение низкой дозы (0,2 мг/кг) ВПВ059 приводит к очень кратковременному (в течение 1 ч) обнаружению ВПВ059 на поверхности рDC. После 6 ч не было обнаружено ВПВ059 на поверхности клеток рDC. Повторное появление доступных BDCA2 на клеточной поверхности происходит при снижении лекарственного воздействия ниже 1 мкг/мл.

Пример 33. ВПВ059 ингибирует провоспалительные медиаторы в дополнение ко всем видам ИФН I типа.

Лигирование BDCA2 подавляет способность клеток рDC продуцировать интерфероны I типа в ответ на TLR лиганды (фиг. 16). Для подтверждения ингибирующей активности анти-BDCA2 мAb, ВПВ059, очищенные клетки рDC от здоровых доноров были стимулированы синтетическим TLR9-лигандом, CpG-A, в присутствии 10 мкг/мл моноклональных антител ВПВ059 или контрольного изотипа. Конкретно, клетки рDC от здоровых доноров-людей были выделены с использованием двухэтапного разделения магнитными шариками (набор MACS, Miltenyi Biotec). Очищенные человеческие клетки рDC в количестве 5×10^4 на лунку оставляли без обработки (среда) или стимулировали 1 мкМ TLR9-лигандом (CpG-A) в присутствии или 10 мкг/мл ВПВ059 (CpG-A+ВПВ059) или контрольного изотипа (CpG-A+изотип). Планшеты, содержащие рDC, инкубировали в течение 18 ч при 37°C, и собирали супернатанты для использования в анализах ELISA или мультиплексных анализах для измерения концентрации воспалительных цитокинов и хемокинов. Эти эксперименты показали, что ВПВ059 мощно ингибирует TLR9-индуцированные ИФН α и другие цитокины, продуцируемые рDC, такие как ФНО α и ИЛ-6, а также TLR-9 индуцированные хемокины, такие как CCL3, CCL4, CCL5 (фиг. 32).

Также исследовали способность ВПВ059 ингибировать продукцию ИФН α и провоспалительных медиаторов после стимуляции физиологически соответствующим лигандом-иммунными комплексами. В частности, иммунные комплексы (IC) Sm/RNP предварительно получали путем смешивания SM-RNP из тимуса теленка и анти-RNP антител, очищенных из сыворотки больных СКВ в течение 1 ч в бессывороточной среде. Клетки рDC от здоровых доноров-людей были выделены с использованием разделения магнитными шариками (набор MACS, Miltenyi Biotec). Клетки рDC в количестве 5×10^4 на лунку оставляли без обработки (среда) или стимулировали предварительно сформированными иммунными комплексами Sm/RNP в присутствии или 10 мкг/мл ВПВ059 (IC+ВПВ059) или контрольного изотипа (IC+изотип). Планшеты, содержащие рDC, инкубировали в течение 18 ч при 37°C, и собирали супернатанты для использования в анализах ELISA или мультиплексных анализах для измерения концентрации воспалительных цитокинов и хемокинов. Эти исследования показали, что ВПВ059 может ингибировать индуцированные иммунными комплексами SM/RNP ИФН α и другие рDC-продуцируемые цитокины, такие как ФНО α и ИЛ-6. ВПВ059 также ингибирует хемокины, индуцированные иммунными комплексами Sm/RNP, такие как CCL3 и CCL4 (фиг. 33).

Пример 34. ВПВ059 ингибирует Sm/RNP IC-индуцированную транскрипцию подтипов ИФН I типа посредством очищенных человеческих рDC.

В организме человека существует тринадцать подтипов ИФН α и единственный член ИФН β . Эффект ВПВ059 на транскрипцию подтипов ИФН I типа в стимулированных Sm/RNP IC клетках рDC от здоровых доноров-людей оценивали в анализах качественной полимеразной цепной реакции (кПЦР).

Иммунные комплексы Sm/RNP (IC) были предварительно созданы путем смешивания SM-RNP из тимуса теленка и анти-RNP антител, выделенных из сыворотки больных СКВ в течение 30 мин в среде без сыворотки. Клетки рDC от здоровых доноров-людей выделяли с использованием двухэтапного разделения магнитными шариками (набор MACS, Miltenyi Biotec). Очищенные человеческие клетки рDC в количестве $7,5 \times 10^5$ на лунку оставляли без обработки (среда) или стимулировали предварительно сформированными иммунными комплексами Sm/RNP в присутствии или 10 мкг/мл ВПВ059 (IC+ВПВ059) или контрольного изоформа (IC+изотип). Планшеты, содержащие рDC, инкубировали в течение 16 ч при 37°C и 5% CO₂. Собирали клетки рDC и выделяли РНК из рDC для оценки в реакции кПЦР.

Этот эксперимент показал, что обработка с ВПВ059 ингибирует уровень транскрипции всех протес-тированных подтипов ИФН I типа (фиг. 34).

Пример 35. ВПВ059 ингибирует TLR9-индуцированную продукцию ИФН α посредством человеческих РВМС от здоровых доноров и больных СКВ.

Клетки рDC играют основную роль в продукции интерферона в ответ на стимуляцию TLR7 и TLR9. Клетки рDC могут продуцировать в тысячу раз больше интерферона, чем какой-либо другой тип клеток. В этом эксперименте исследовали возможность ВПВ059 ингибировать TLR9-индуцированную продукцию ИФН α в культурах мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС) без необходимости выделения рDC. Клетки РВМС от здоровых доноров и больных СКВ стимулировали 1 или 5 мкМ лиганда TLR9 (CpG-A) и обрабатывали ВПВ059 в концентрациях от 10 мкг/мл до 2 нг/мл в общем анализируемом объеме 250 мкл на лунку. Планшеты инкубировали в течение ночи (18 ч) при температуре 37°C и 5% CO₂. Затем собирали супернатанты для оценки в анализах ИФН α ELISA.

Этот эксперимент показал, что ВПВ059 ингибирует TLR9-индуцированную продукцию ИФН α посредством РВМС от здоровых доноров со средним значением IC₅₀ 0,04±0,05 мкг/мл (фиг. 35А и 35С). ВПВ059 показали одинаковую эффективность в ингибировании TLR9-индуцированной продукции ИФН α посредством РВМС от больных СКВ со средним значением IC₅₀ 0,03±0,01 мкг/мл (фиг. 35В и 35С).

Пример 36. ВПВ059 ингибирует продукцию ИФН α в цельной крови, стимулированной TLR9 лигандом.

Активность ВПВ059 также оценивали в анализах цельной крови (WBA). Цельную кровь от здоровых доноров стимулировали TLR9 лигандом в присутствии ВПВ059 в возрастающих концентрациях и рассчитывали значение IC₅₀ ингибирования для каждого отдельного донора. Конкретно, цельную кровь от здоровых доноров инкубировали с ВПВ059 в возрастающих концентрациях в диапазоне от 10 мкг/мл до 2 нг/мл или с контрольным изоформом, в общем анализируемом объеме 200 мкл на лунку. Добавляли CpG-A в количестве 75 мкг/мл (незакрашенные квадраты), которое определяли как оптимальное количество для стимуляции продукции ИФН α в цельной крови. Планшеты инкубировали в течение 18 ч при 37°C и собирали супернатанты для использования в анализах ELISA ИФН α (PBL InterferonSource).

Было выявлено, что ВПВ059 дозозависимым образом ингибирует TLR9-индуцированную продукцию ИФН α в анализах цельной крови и показывает значения IC₅₀, аналогичные значениям, которое наблюдалось в культурах РВМС (фиг. 36).

Пример 37. ВПВ059 не ингибирует TLR3-индуцированную продукцию ИФН α посредством человеческих РВМС от здоровых доноров-людей.

Этот эксперимент проводили для определения возможности других типов клеток, запускаемых с различными лигандами TLR, продуцировать ИФН I типа даже в присутствии ВПВ059. TLR3 не экспрессируется в клетках рDC и, следовательно, TLR3 лиганд не индуцирует продукцию ИФН посредством рDC. Клетки РВМС от здоровых доноров-людей стимулировали poly:IC, который является лигандом TLR3, способным мощно индуцировать ИФН I типа в основном посредством моноцитов. Конкретно, РВМС от здоровых доноров были стимулированы 1 мкМ лиганда TLR3 (poly:IC) и обработаны ВПВ059 в концентрации от 10 мкг/мл до 0,5 нг/мл в общем анализируемом объеме 250 мкл на лунку в 96-луночном планшете. Планшеты инкубировали в течение ночи (18 ч) при температуре 37°C и 5% CO₂. 200 мкл супернатантов собирали для оценки уровней ИФН α в анализе ELISA. Как показано на фиг. 37, ВПВ059 не влияет на TLR3-индуцированную продукцию ИФН α посредством РВМС от здоровых доноров-людей.

Таким образом, примеры 33-37 показывают, что ВПВ059 может эффективно ингибировать TLR9-стимулированную продукцию интерферона I типа посредством очищенных рDC, РВМС и культур цельной крови. ВПВ059 одинаково мощно ингибирует TLR9-индуцированную продукцию интерферона I типа посредством рDC от здоровых доноров и больных СКВ. В дополнение к ингибированию ИФН I типа, ВПВ059 может ингибировать продукцию других цитокинов и хемокинов, продуцируемых рDC. ВПВ059 специфично ингибирует TLR9-индуцированные интерфероны I типа посредством рDC и не влияет на продукцию ИФН посредством других типов клеток, запускаемых другим TLR лигандом. Таким образом, данные *in vitro*, представленные в изобретении, подтверждают фармакологическую активность и потенциал ВПВ059 в дополнение к его специфичности к TLR7/9-индуцированным ИФН I типа посредством рDC.

Пример 38. ВПВ059 опосредует интернализацию BDCA2 на человеческих рDC.

Для определения способности ВПВ059 индуцировать интернализацию BDCA2 человеческую цельную кровь от 10 здоровых доноров инкубировали с ВПВ059 в возрастающих концентрациях при 37°C в течение 16 ч. Остальная часть BDCA2 клеточной поверхности была выявлена с помощью FITC-меченого неперекрестно блокирующего анти-BDCA2 мАт (клон 2D6).

Конкретно, цельную кровь от 10 здоровых доноров-людей инкубировали с ВПВ059 в возрастающих концентрациях или с 10 мкг/мл контрольного изотипа антитела в течение 16 ч при 37°C и 5% CO₂, и затем инкубировали в течение 30 мин при 4°C с FITC-меченым неперекрестно блокирующим анти-BDCA2 мАт (клон 2D6), анти-HLA-DR, анти-CD123, анти-CD14 и анти-CD20. Затем цельную кровь инкубировали в течение 30 мин при 4°C с 50 мкл окрашивающего раствора, который включал в себя следующие мАт: FITC-меченое неперекрестно блокирующее анти-BDCA2 мАт (клон 2D6), анти-HLA-DR, анти-CD123, анти-CD14 и анти-CD20. Эритроциты лизировали с помощью IX лизирующего/подгоночного буфера (IX lyse/fit Buffer, BD Bioscience).

Как показано на фиг. 38, ВПВ059 вызывают дозозависимое снижение интенсивности FITC-меченого окрашивания 2D6 со средним значением EC₅₀ 0,017±0,005 мкг/мл.

Пример 39. BDCA2 быстро интернализуется после лигирования с ВПВ059.

Для определения кинетики ВПВ059-индуцированной интернализации BDCA2 цельную кровь человека инкубировали с ВПВ059 в разных концентрациях при 37°C в течение разных периодов времени. Конкретно, цельную кровь обрабатывали ВПВ059 в концентрации 10, 1, 0,1 или 0,01 мкг/мл или контрольным изотипом антитела (10 мкг/мл) при 37°C в течение указанных периодов. Цельную кровь инкубировали в течение 30 мин при 4°C с 50 мкл окрашивающего раствора, который включал в себя следующие мАт: FITC-меченое неперекрестно блокирующее анти-BDCA2 мАт (клон 2D6), анти-HLA-DR, анти-CD123, анти-CD14 и анти-CD20. Эритроциты лизировали и фиксировали при помощи IX Lyse/fit буфера (BD Bioscience). Как показано на фиг. 39, при инкубации с ВПВ059 в концентрации 1 мкг/мл интенсивность FITC-меченого окрашивания 2D6 быстро снижалась, достигая исходного уровня в течение одного часа инкубации. Инкубация с ВПВ059 в концентрации в десять раз ниже (0,1 мкг/мл) задерживала интернализацию BDCA2 на 2 ч. Эти данные показывают, что скорость интернализации BDCA2 зависит от дозы ВПВ059.

Пример 40. ВПВ059 индуцирует интернализацию BDCA2 в человеческих плазмодитоидных дендритных клетках.

Для визуализации интернализации BDCA2 после лигирования с ВПВ059 очищенные pDC инкубировали с A647-мечеными ВПВ059 и анализировали с помощью конфокальной микроскопии. Как и ожидалось, BDCA2 локализовались на клеточной поверхности pDC при 4°C. После короткой инкубации при 37°C BDCA2 отчетливо обнаруживались внутри клеток (фиг. 40).

Пример 41. Интернационализация не изменяет ВПВ059-опосредованное ингибирование продукции ИФНа.

В этом эксперименте исследовали, изменяет ли интернализация BDCA2 способность ВПВ059 ингибировать TLR9-индуцированную продукцию ИФНа посредством pDC. Клетки предварительно инкубировали с ВПВ059 при 37°C в течение разных периодов времени, соответствующих максимальной интернализации BDCA2, и затем стимулировали TLR9 лигандом в течение дополнительных 18 ч. Конкретно, цельную кровь собирали из гепаринизированной венозной крови здоровых доноров и предварительно инкубировали с ВПВ059 или контрольным изотипом антитела в течение указанных периодов времени. В каждой точке времени после предварительной инкубации клетки стимулировали TLR9 лигандом в количестве 200 мкг/мл (CpG-A) и инкубировали в течение дополнительных 18 ч при 37°C. Супернатанты собирали для использования в анализах ИФНа ELISA (PBL InterferonSource). Как показано на фиг. 41, предварительная инкубация с ВПВ059 (до 9 ч) не изменяет способность ВПВ059 ингибировать TLR9-индуцированную продукцию ИФНа в анализах цельной крови здоровых доноров-людей. Эти данные позволяют предположить, что интернализация BDCA2 может быть необходимой для ингибирования сигнального пути TLR9.

Пример 42. EC₅₀ ВПВ059-опосредованной BDCA2 интернализации на pDC коррелирует с IC₅₀ ВПВ059-опосредованного ингибирования TLR9 -индуцированных ИФНа посредством pDC в анализах цельной крови.

Для дальнейшего изучения связи между интернализацией BDCA2 и ингибированием сигнального пути TLR9 у 10 здоровых доноров-людей сравнивали мощность ВПВ059-опосредованной интернализации BDCA2 на клетках pDC и ингибирование TLR-опосредованной продукции ИФНа посредством pDC.

Для оценки ВПВ059-опосредованной BDCA2 интернализации цельную кровь инкубировали с ВПВ059 в течение 16 ч. Собирали и лизировали цельную кровь, затем экспрессию BDCA2 оценивали с помощью проточной цитометрии с использованием FITC-конъюгированного не-перекрестно блокирующего антитела 2D6. Чтобы оценить ВПВ059-опосредованное ингибирование TLR9-индуцированных ИФНа посредством pDC, цельную кровь инкубировали с ВПВ059 в возрастающих концентрациях в течение 16 ч в присутствии лиганда TLR9. Супернатанты собирали и оценивали с помощью ИФНа ELISA. Значение EC₅₀ ВПВ059-опосредованной интернализации BDCA2 составляет 0,02 мкг/мл. Значение IC₅₀ ВПВ059-опосредованного ингибирования TLR9-индуцированных ИФНа составляет 0,07 мкг/мл. Корре-

ляция между значениями EC_{50} ВПВ059-опосредованной интернализации BDCA2 и IC_{50} ВПВ059-опосредованного ингибирования ИФН α была выявлена путем расчета квадрата значения $R=0,57$ (фиг. 42).

Пример 43. Активация TLR9 индуцирует колокализацию BDCA2 с TLR9 и с лизосомальным маркером Lamp1.

Для проверки гипотезы, что для ВПВ059-опосредованного ингибирования TLR9 требуется интернализация и локализация BDCA2 в эндосомальных/лизосомальных компартментах, содержащих TLR9, выполняли конфокальную микроскопию для отслеживания внутриклеточного распределения BDCA2 после лигирования с ВПВ059. Очищенные человеческие рDC культивировали в течение 7 дней и инкубировали с А647-мечеными ВПВ059 в течение 15 мин при 37°C. Во время последних 10 мин инкубации клетки обрабатывали 1 мкМ TLR9 лиганда CpG-A или оставляли без обработки. Клетки окрашивали флуоресцентно мечеными антителами на TLR9 и поздний эндосомальный/лизосомальный маркер, Lamp1, и анализировали с помощью конфокальной микроскопии.

Наблюдали рекрутинг TLR9 в поздний эндосомальный/лизосомальный компартмент после стимуляции TLR9 лигандом, о чем свидетельствует повышенная колокализация TLR9 с Lamp1 (фиг. 43). Стимуляция TLR9 также значительно повышала фракцию BDCA2, колокализирующихся с TLR9 и Lamp1. Эти результаты показывают, что ВПВ059, находящийся в связи с BDCA2, преимущественно локализуется во внутриклеточных компартментах, где присутствует активированный TLR9.

В общем, примеры 38-43 показывают, что ВПВ059, гуманизированное моноклональное антитело против BDCA2, вступает в контакт с BDCA2 и вызывает его интернализацию. При стимуляции BDCA2 колокализуются с TLR9 в эндосомальном/лизосомальном компартменте, где они опосредуют ингибирование сигнального пути TLR9. Эти данные позволяют предположить, что интернализация BDCA2 является необходимым этапом для опосредования ингибирования TLR9-индуцированных провоспалительных медиаторов посредством рDC.

Пример 44. Влияние ВПВ059 на уровень CD62L.

Циркулирующие клетки рDC на высоком уровне экспрессируют CD62L (L-селектин) и возвращаются в лимфоидную ткань, содержащую вены с высоким эндотелием (HEV). Лигандом для CD62L является PNA α , который конститутивно экспрессируется на HEV и опосредует хоуминг экспрессирующих CD62L клеток в организованную лимфоидную ткань. Было установлено, что PNA α экспрессируется эндотелиальными клетками кожи при кожных поражениях при системной красной волчанке. Благодаря тому, что рDC экспрессируют CD62L, они могут рекрутироваться в воспаленные периферические ткани, экспрессирующие PNA α .

Для определения влияния ВПВ059 на экспрессию CD62L на поверхности человеческих рDC цельную кровь обрабатывали ВПВ059 в разных концентрациях в течение 1 ч при 37°C без стимуляции. Конкретно, цельную кровь от здоровых доноров обрабатывали ВПВ059 в возрастающих концентрациях в течение 1 ч при 37°C и 5% CO $_2$. Значение MFI от CD62L устанавливали стробированием клеток рDC, что определяли по CD14-, CD20-, HLA-DR+ и CD123+.

ВПВ059 вызывает дозозависимое уменьшение экспрессии CD62L на поверхности человеческих рDC, что определяли с помощью проточной цитометрии (фиг. 44). Стимуляция клеток рDC TLR-лигандом не влияет на экспрессию CD62L (фиг. 44А).

Пример 45. Обработка РВМС с GM6001 ингибирует ВПВ059-опосредованный шеддинг CD62L с поверхности человеческих рDC.

Известно, что металлопротеиназы индуцируют шеддинг CD62L с поверхности иммунных клеток. Чтобы исследовать участие металлопротеиназ в ВПВ059-опосредованном уменьшении количества поверхностных CD62L, от здоровых доноров получали клетки РВМС и предварительно их обрабатывали с GM6001 (ингибитором металлопротеиназы) в течение 30 мин при 37°C и 5% CO $_2$, с последующим добавлением 10 мкг/мл ВПВ059 в течение 1 ч. Поверхностную экспрессию CD62L анализировали способом проточной цитометрии. GM6001 ингибирует ВПВ059-опосредованную понижающую модуляцию CD62L в зависимости от дозы (фиг. 45). Эти данные позволяют предположить, что ВПВ059 индуцирует шеддинг CD62L зависимым от металлопротеиназы образом.

В целом, примеры 44 и 45 показывают, что ВПВ059 уменьшает экспрессию CD62L на поверхности человеческих рDC. ВПВ059-опосредованная понижающая модуляция CD62L ингибируется ингибитором металлопротеиназы (GM6001), указывая на то, что ВПВ059 индуцирует шеддинг CD62L с поверхности человеческих рDC посредством, по меньшей мере, частичной активации металлопротеиназы. Поэтому предполагается, что обработка с ВПВ059 будет уменьшать или предотвращать перемещение клеток рDC в органы-мишени при СКВ.

Пример 46. Влияние Fc-области ВПВ059 на опосредуемую иммунным комплексом продукцию интерферона посредством плазматоидных дендритных клеток Fc-гамма-рецептор IIА (CD32а) представляет собой белок клеточной поверхности, который связывается с IgG с низкой аффинностью. Человеческие плазматоидные дендритные клетки эксклюзивно экспрессируют Fc-гамма-рецептор IIА-CD32а. Было показано, что стимуляция клеток рDC иммунными комплексами зависит от CD32. Иммунные комплексы интернализируются CD32 и стимулируют эндосомальные TLR7/9, чтобы индуцировать продукцию ИФН посредством рDC.

Для определения влияния ВІВ059 на поверхностную экспрессию CD32а выделенные клетки рDC обрабатывали с ВІВ059 в возрастающих концентрациях или а-гликозилированной формой антитела 24F4-А, и инкубировали в течение 16 ч при 37°C. Затем клетки рDC окрашивали FITC-меченым BDCA2 и PE-меченым анти-CD32 (клон АТ10), и оценивали поверхностную экспрессию BDCA2 и CD32 с помощью проточной цитометрии. ВІВ059 и agly вариант 24F4 обладали одинаковым потенциалом в своей способности индуцировать интернализацию BDCA2 (фиг. 46А). Только ВІВ059 были способны индуцировать понижающую модуляцию CD32 на клеточной поверхности рDC, что определяли по дозозависимому уменьшению в CD32 средней интенсивности флуоресценции (MFI) (фиг. 46В-Д). Обработка контрольным эффекторным компетентным изотипом не имела какого-либо эффекта на уровень поверхностных CD32 (фиг. 46). Эти данные показывают, что ВІВ059-опосредованная понижающая модуляция уровней CD32а на поверхности клеток рDC является специфичной для связывания Fc-области ВІВ059.

Чтобы гарантировать, что связывание с Fc-областью ВІВ059 не просто маскирует эпитоп CD32, распознаваемый FITC-меченым анти-CD32 мАт, клетки рDC обрабатывали 10 мкг/мл ВІВ059 в течение 1 ч при 4°C или 37°C, а затем окрашивали мечеными анти-CD32. Как показано на фиг. 46Е, обработка с ВІВ059 при 4°C не уменьшает значение MFI в CD32, указывая, что обработка с ВІВ059 не препятствует связыванию меченого анти-CD32 мАт. Тот факт, что понижающая модуляция CD32а происходит только после инкубации с ВІВ059 при 37°C, показывает, что CD32а могут исчезать с клеточной поверхности рDC.

Чтобы определить, имеет ли биологическое значение понижающая модуляция CD32а посредством ВІВ059, клетки рDC инкубировали в присутствии ВІВ059 в возрастающих концентрациях или в присутствии гликозилированной формы 24F4А-Agly и стимулировали или иммунными комплексами, или синтетическим лигандом TLR9 (CPG-A). Как и предполагалось, ВІВ059 и 24F4А-Agly были неотличимы в своей способности ингибировать CPG-A-индуцированную продукцию ИФНа посредством рDC, которая не зависит от CD32 (фиг. 47А). Выявлено четкое разделение по потенциалу между ВІВ059 и 24F4А-Agly при стимуляции клеток рDC иммунными комплексами. ВІВ059 ингибирует ИФНа, индуцированные иммунными комплексами при значении $IC_{50}=0,04$, по сравнению с IC_{50} при 24F4А-Agly=1,4 мкг/мл. (фиг. 47В). Эти данные показывают, что ВІВ059 вызывает понижающую модуляцию CD32а благодаря своей функциональной Fc-области и, следовательно, ингибирует стимуляцию клеток рDC посредством иммунных комплексов.

Чтобы подтвердить, что понижающая модуляция CD32а является уникальной для ВІВ059, авторы исследовали эффект полностью гуманизированного анти-CD40-антитела на уровне CD32 и опосредуемой иммунным комплексом продукции ИФНа посредством рDC. CD40 представляет собой белок клеточной поверхности, экспрессируемый на клетках рDC. Анти-CD40-антитело с полностью функциональной Fc обладает способностью вступать в контакт с CD40 и связываться с CD32 на поверхности клеток рDC. Обработка с анти-CD40 мАт не влияет на поверхностную экспрессию CD32 и не оказывает существенного влияния на продукцию ИФНа из рDC, стимулированных иммунным комплексом (фиг. 48А и В). Связывание анти-CD40 мАт было подтверждено путем демонстрации максимального захвата CD40 в клетки, обработанные анти-CD40 (фиг. 48С).

Как было показано ранее, лигирование BDCA2 с ВІВ059 или а-гликозилированной формой 24F4А-agly приводит к интернализации рецепторов и ингибированию TLR9-индуцированных ИФНа посредством рDC. В этом исследовании авторы показали, что ВІВ059 вызывает понижающую модуляцию CD32а на клетках рDC и ингибирование стимулированной иммунным комплексом продукции ИФНа посредством рDC Fc-зависимым образом. Понижающая модуляция CD32а, запускаемая ВІВ059, не является результатом любого антитела с функциональной Fc-областью, которое способно связываться с молекулой клеточной поверхности, экспрессируемой на рDC. Это исследование подчеркивает новый терапевтический потенциал эффекторных компетентных анти-BDCA2 мАт, которые могут ослаблять ответы рDC посредством обеих его областей Fab'₂ и Fc, что ведет к повышению эффективности.

Пример 47. Взаимодействие ВІВ059 с гидроксихлорохином (HCQ).

Для лечения системной красной волчанки применяются противомаларийные агенты, такие как гидроксихлорохин (HCQ). В клетках рDC от больных СКВ, получавших HCQ, уменьшается способность продуцировать ИФНа при стимуляции TLR7 и TLR9 лигандами. Поскольку и ВІВ059 и HCQ действуют на TLR7/9-индуцированные ИФНа в клетках рDC, было исследовано, может ли быть избыточным эффект ВІВ059 и HCQ.

Для решения этого вопроса человеческие клетки РВМС получали из крови здоровых доноров и стимулировали их TLR7 или TLR9 лигандами в присутствии только ВІВ059 в разных концентрациях, только HCQ, или в присутствии ВІВ059 в комбинации с HCQ. Супернатанты собирали через 18 ч и анализировали на ИФНа способом ELISA. Добавление HCQ повышало потенциал ВІВ059 и вызывало аддитивный ингибирующий эффект на TLR7- и TLR9-индуцируемую продукцию ИФНа посредством РВМС от здоровых доноров-людей. Эти данные показывают, что активность ВІВ059 и HCQ не является избыточной и подчеркивают дополнительное терапевтическое преимущество ВІВ059 при его введении с противомаларийными соединениями, такими как HCQ.

Пример 48. Эффект ВІВ059 на BDCA2-экспрессирующие рDC in vivo.

Целью данного исследования было определить, опосредует ли введение ВПВ059 обезьянам цино-молгус истощение клеток рDC в периферической крови.

Четыре образца крови после предварительного введения ВПВ059 получали с недельными интервалами от двенадцати обезьян циномолгус для установления исходного уровня рDC для каждого животного (табл. 3).

Цельную кровь брали у двенадцати обезьян циномолгус один раз в неделю всего в течение четырех недель. Клетки рDC идентифицировали с помощью проточной цитометрии, как CD20-CD14-CD123+HLA-DR+. Содержание рDC как процент CD20-CD14-клеток рассчитывали с помощью программного обеспечения FlowJo.

Таблица 3. Результаты среднего содержания циркулирующих рDC в цельной крови здоровых обезьян циномолгус

Доноры - обезьяны циномолгус	Процент циркулирующих рDC					
	073112	080712	081312	082013	Среднее значение	SD
1	0,26	0,2	0,15	0,16	0,19	0,05
2	0,2	0,15	0,15	0,21	0,18	0,03
3	0,11	0,06	0,11	0,19	0,12	0,05
4	0,12	0,11	0,14	0,31	0,17	0,09
5	0,19	0,2	0,31	0,40	0,28	0,10
6	0,32	0,57	0,35	0,39	0,41	0,11
7	0,15	0,19	0,21	0,16	0,18	0,03
8	0,12	0,13	0,1	0,16	0,13	0,03
9	0,08	0,12	0,1	0,11	0,10	0,02
10	0,16	0,15	0,28	0,22	0,20	0,06
11	0,06	0,07	0,04	0,07	0,06	0,01
12	0,1	0,05	0,07	0,16	0,10	0,05
Среднее значение	0,16	0,17	0,17	0,21	0,18	
SD	0,08	0,14	0,10	0,10	0,09	

Во всех статистических анализах выполняли логарифмическое преобразование частоты рDC для уменьшения асимметрии (фиг. 51). Исходное распределение частоты рDC в левой части фиг. 51 было значительно смещено вправо. Тем не менее, после логарифмического преобразования распределение преобразованных частот рDC (фиг. 51, правая часть) приблизительно соответствовала нормальному распределению. Эти данные логарифмического преобразования были использованы для всех способов статистических анализов.

Фиг. 52 представляет уровни рDC в логарифмической шкале для каждой обезьяны циномолгус в четырех точках времени перед внутривенной инъекцией. Используя линейную модель со смешанными эффектами с четырьмя точками времени в качестве фиксированных факторов и со случайными отрезками для обезьян циномолгус, авторы пришли к выводу, что средние геометрические значения процентов рDC для всех обезьян были эквивалентными на протяжении 4 точек времени перед введением дозы (фиг. 53, р-значение для времени на основе F-теста=0,67). Этот анализ показал, что среднее геометрическое значение процента циркулирующих рDC у обезьян циномолгус было относительно стабильным на протяжении времени.

Девять из этих двенадцати обезьян циномолгус были разделены на 3 группы (по 3 животных на группу), и рандомизированы, чтобы включать равную репрезентативность показателей плотности BDCA2 и процентов рDC в каждой группе. Обезьяны циномолгус получали однократную внутривенную инъекцию носителя (цитрат натрия), или 10 мг/кг ВПВ059, или 1 мг/кг ВПВ059. Проточную цитометрию использовали для идентификации циркулирующих рDC в цельной крови как CD20-CD14-CD123+HLA-DR+, а частота рDC (на лог-шкале) в каждой точке времени была графически отображена с помощью

программного обеспечения R (фиг. 54). Линейная модель со смешанными эффектами была подогнана по логарифму частоты (pDC), с использованием случайных отрезков для обезьян циномолгус и фиксированных эффектов в отношении группы введения и периода времени: 1, 6 ч, от 1 до 27 дней и более 28 дней. Предварительная модель для оценки вероятных изменений pDC среди разных групп введения в разные периоды времени также включала в себя условия взаимодействия для группы введения и разных периодов времени. Р-значение на основе F-теста для тестирования всех условий взаимодействия, равных 0, составляет 0,81, что указывает на отсутствие какой-либо разницы для изменения pDC среди разных групп введения. Следовательно, конечная подогнанная модель включает только статистически значимые эффекты для факторов периода времени и группы введения (табл. 4).

Оценивали фиксированные эффекты с помощью линейной модели со смешанными эффектами с использованием случайных отрезков для обезьян циномолгус и фиксированных факторов для группы введения и периодов времени 1, 6 ч и более 28 дней, для определения процентов циркулирующих pDC на логарифмической шкале до и после в/в введения обезьянам циномолгус носителя цитрата натрия, ВПВ059 в дозе 1 мг/кг или ВПВ059 в дозе 10 мг/кг.

Таблица 4. Оценка в подогнанной модели для точек времени после однократной внутривенной инъекции ВПВ059 или носителя

	Оцениваемый эффект	Экспонента (оценки эффекта) (% соотношение pDC)	95% доверительный интервал	P
Время: 1 час по сравнению с другими	-0,56	0,57	0,43-0,77	0,0003
Время: 6 часов по сравнению с другими	0,46	1,58	1,18-2,13	0,003
Время: >28 дней по сравнению с другими	-0,48	0,62	0,55-0,70	<0,0001
Группа: ВПВ059 1 мг/кг по сравнению с носителем	0,49	1,64	1,20-2,25	0,01
Группа: ВПВ059 10 мг/кг по сравнению с носителем	0,09	1,09	0,79 to 1,50	0,84

Экспоненцирование оценок параметров для основных факторов выполняли для их интерпретации как отношения частот pDC в указанные периоды времени по сравнению с показателями перед введением ВПВ059. В целом, соотношение было значительно меньше, чем при сравнении частоты pDC через 1 ч после в/в инъекции с показателями частоты pDC перед введением (95% доверительный интервал: 0,43-0,77, р-значение: 0,0003). Соотношение было значительно больше, чем при сравнении частоты pDC через 6 ч после в/в инъекции с частотой pDC перед введением (95% доверительный интервал: 1,18-2,12, р-значение: 0,003). Соотношения существенно не отличались друг от друга при сравнении частоты pDC в период от 1 до 28 дня после в/в инъекции с частотой pDC перед введением. Соотношение было значительно меньше, чем соотношение при сравнении частоты pDC через 28 дней после внутривенной инъекции с частотой pDC перед введением (95% доверительный интервал: 0,55-0,70, р-значение: 0,0001). Конечная подогнанная модель показана на фиг. 55. Результаты показали, что имеется значительное истощение циркулирующих pDC in vivo у обезьян циномолгус в точке времени 1 ч, значительное увеличение циркулирующих pDC в точке времени 6 ч и значительное истощение циркулирующих pDC через 28 дней после внутривенной инъекции, но изменения в процентах pDC на протяжении времени были одинаковыми во всех группах введения.

Дополнительно, после завершения в/в исследования в зависимости от времени три из этих обезьян циномолгус (4, 6 и 12) получили однократную подкожную дозу ВПВ059 0,2 мг/кг для оценки эффекта более низкой дозы на частоту циркулирующих pDC. Частота pDC (на лог-шкале) в каждой точке времени была графически отображена с помощью программного обеспечения R (фиг. 56). Линейная модель со смешанными эффектами была подогнана с использованием непрерывного времени и времени 1 ч в качестве фиксированных факторов и обезьян циномолгус в качестве случайных отрезков. Результаты показаны в табл. 5.

Оценивали фиксированные эффекты с помощью линейной модели со смешанными эффектами с использованием с использованием непрерывного времени и времени 1 ч в качестве фиксированных факторов и обезьян циномолгус в качестве случайных отрезков, для определения процентов циркулирующих pDC на логарифмической шкале до и после однократного подкожного введения обезьянам циномолгус ВПВ059 в дозе 0,2 мг/кг.

Таблица 5. Оценка в подогнанной модели для точек времени после однократной подкожной инъекции ВПВ059

	Оцениваемый эффект	Экспонента (оценки эффекта) (% соотношение рDC)	95% доверительный интервал	P
Время (непрерывное)	0,01	1,01	1,00-1,02	<0,0001
Время: 1 час по сравнению с другими	-0,78	0,46	0,34-0,65	<0,0001

Как и в предыдущих результатах, авторы наблюдали значительное истощение *in vivo* циркулирующих рDC у обезьян циномоглус через 1 ч после в/в инъекции (95% доверительный интервал: 0,34-0,55, р-значение 0,0001), но среднее геометрическое значение % рDC для трех обезьян циномоглус постоянно увеличивалось с увеличением времени (95% доверительный интервал: 1,00-1,03-кратное изменение за 1 день, значение $p=0,0001$). Подогнанная модель показана на фиг. 57.

В заключение, эти данные показывают, что ВПВ059 не опосредует устойчивое истощение клеток рDC в крови обезьян циномоглус при введении в тестируемых дозах. Вероятно, это обусловлено интернационализацией BDCA2.

Пример 49. Введение ВПВ059 обезьянам циномоглус вызывает ингибирование TLR9-индуцированной продукции ИФНа в цельной крови *ex vivo*.

Целью исследования было определение возможности ВПВ059 при введении обезьянам циномоглус *in vivo* изменять продукцию ИФНа в ответ на TLR9-стимуляцию *ex vivo* в анализе цельной крови (WBA).

Внутривенный и подкожный путь введения были оценены в отношении их способности влиять на индукцию ИФНа, которую измеряли с помощью биоанализа МхА в соответствии с планом эксперимента, описанным в фиг. 58. Лиганд TLR9 (СрG-A) индуцировал измеримые количества ИФНа в культурах цельной крови во всех точках времени и у всех обезьян циномоглус, при этом ИФНа не выявлен в контрольных ФБР-обработанных культурах (данные не показаны).

Для обезьян циномоглус из группы внутривенного введения показатели ИФНа после лечения были рассчитаны в процентах от средних значений перед введением для каждого животного. Данные от образцов крови после 14-го дня были исключены из анализа, поскольку анализ цельной крови не проводили в группе введения 10 мг/кг ВПВ059 после этой точки времени. Наблюдалась тенденция к снижению % ИФНа по сравнению со средними значениями перед введением в течение нескольких дней после введения препарата ВПВ059 в группах введения дозы 1 мг/кг и дозы 10 мг/кг по сравнению с группой введения носителя (фиг. 59)

Более всесторонний анализ данных проводили с помощью двухстороннего дисперсионного анализа со смешанными эффектами (ANOVA) для оценки средних значений ИФНа и различий после введения по сравнению с различиями перед введением для каждой группы в исследовании в/в введения. Данные в течение первых 24 ч после введения были исключены по причине выявленного снижения в периферической крови процента плазмцитоподобных дендритных клеток. Данные от образцов крови после 31-го дня после введения были исключены из анализа по причине возвращения экспрессии BDCA2, которая наблюдается в указанной точке времени. В группе введения носителя среднее геометрическое значение ИФНа составляло 362 единиц/мл (Ед/мл) перед введением дозы и 314 Ед/мл после введения дозы; в группе введения 1 мг/кг среднее геометрическое значение составляло 399 Ед/мл перед введением дозы, и 237 Ед/мл после введения дозы; в группе введения 10 мг/кг среднее геометрическое значение ИФНа составляло 211 Ед/мл перед введением дозы и 102 Ед/мл после введения дозы (фиг. 4). Различия после введения - перед введением в среднем \log_{10} в отношении ИФНа составляли -0,061 ($p=0,511$) в группе введения носителя, -0,226 ($p=0,016$) в группе 1 мг/кг, и -0,317 ($p=0,004$) в группе 10 мг/кг. После преобразования анти- \log_{10} эти результаты показали, что в группе носителя $10^{(-0,061)}=87\%$ (95% доверительный интервал: 57%-133%) от концентрации ИФНа при сравнении после введения и перед введением; в группе 1 мг/кг было $10^{(-0,226)}=59\%$ (95% доверительный интервал: 39-91%) от концентрации ИФН при сравнении после введения и перед введением; и в группе 10 мг/кг было $10^{(-0,317)}=48\%$ (95% доверительный интервал: 29-79%) от концентрации ИФН при сравнении после введения и перед введением (фиг. 60).

Для когорты обезьян циномоглус с подкожным введением использовали односторонний дисперсионный анализ (ANOVA) со случайными эффектами для оценки средних значений ИФНа и различий после введения по сравнению с различиями перед введением для всей группы. Данные в течение первых 24 ч после введения были исключены по причине выявленного снижения в периферической крови процента плазмцитоподобных дендритных клеток. Данные от образцов крови после 33-го дня после введения были исключены из анализа по причине возвращения экспрессии BDCA2, которая наблюдается в указанной точке времени. В группе подкожного введения среднее геометрическое значение ИФНа составляло 1243 Ед/мл перед введением и 812 Ед/мл после введения, что давало соотношение после введения - перед введением 65%. Оценка различий после введения - перед введением в среднем \log_{10} составляла -0,185

($p=0,059$), которая после анти- \log_{10} преобразования соответствовала $10^{(-0,185)}=65\%$ от среднего геометрического значения перед введением; 95% доверительный интервал этого эффекта составляет 41-102% (фиг. 61).

Поскольку в этом эксперименте было задействовано лишь небольшое количество обезьян циномогус, установленная для каждой обезьяны концентрация ИФНа значительно влияет на результаты в этой группе. Пропорция вариации из-за различий у животных в ходе внутривенного исследования составила 69% от общей вариабельности, а остальная часть в основном обусловлена различиями между точками времени у каждой обезьяны циномогус (26%), и небольшая часть (меньше 6%) обусловлена вариацией источников анализа. Разница между обезьянами циномогус значительно больше, чем вариации между точками времени у каждой из обезьян циномогус, и предполагается, что добавление обезьян циномогус в этом эксперименте, в отличие от увеличения точек времени забора крови, улучшит проведение исследования. Пропорция вариации из-за различий между обезьянами циномогус в исследовании подкожного введения составляла 45% от общей изменчивости, остальная часть в основном была обусловлена различиями между точками времени у каждой из обезьян циномогус, и незначительная часть (меньше 2%) была обусловлена вариацией источников анализа.

Вариабельность, наблюдаемая у всех обезьян циномогус и у каждой обезьяны циномогус, может быть связана с рядом факторов, включающих колебания физиологических состояний у обезьян циномогус, клеточный состав крови, молекулярный состав клетки и точность функционального анализа.

Несмотря на наличие некоторых колебаний процентных показателей плазмоцитоидных дендритных клеток у каждого животного на протяжении времени % клеток pDC в крови не зависит от лечения с ВПВ059 (см. RSch-2013-046) и не проявляет устойчивую корреляцию с продукцией ИФНа. Дополнительно, быстрая и устойчивая потеря BDCA2 с клеточной поверхности наблюдается на клетках pDC после в/в и п/к введения ВПВ059, что предполагает высокий уровень занятости рецепторов (см. RSch-2013-043). С учетом высокого уровня изменчивости в реактивности клеток pDC от обезьян циномогус на TLR9-стимуляцию выявлена тенденция к смягчению ответов ИФНа после внутривенного и подкожного введения ВПВ059, с наибольшим снижением в группе в/в введения 10 мг/кг, далее следует группа п/к введения 0,2 мг/кг, и затем группа в/в введения 1 мг/кг.

В заключение, ВПВ059 при введении *in vivo* обезьянам циномогус проявляют тенденцию к ингибированию TLR9-индуцированной продукции ИФН в анализах цельной крови *ex vivo*.

Другие варианты осуществления.

Несмотря на то что изобретение описано в комбинации с его подробным описанием, вышеизложенное описание предназначено для иллюстрации и не ограничивает объем изобретения, который определяется объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации находятся в пределах объема прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело, которое связывается с антигеном 2 дендритных клеток крови (BDCA2) человека (SEQ ID NO: 1), которое содержит:

(i) вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий определяющие комплементарность области (CDR) VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3, причем

VH-CDR1 содержит аминокислотную последовательность GFTFSTYTMS (SEQ ID NO: 9);

VH-CDR2 содержит аминокислотную последовательность TISPGDSFGYYYPDSVQG (SEQ ID NO: 10);

VH-CDR3 содержит аминокислотную последовательность DIYYNYGAWFAY (SEQ ID NO: 11);

(ii) вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3, причем

VL-CDR1 содержит аминокислотную последовательность KASQSVVDYDGDSYMN (SEQ ID NO: 5);

VL-CDR2 содержит аминокислотную последовательность AASTLES (SEQ ID NO: 6); и

VL-CDR3 содержит аминокислотную последовательность QQANEDPRT (SEQ ID NO: 7).

2. Антитело по п.1, в котором домен VH:

(i) по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24; или

(ii) идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24.

3. Антитело по п.1 или 2, которое содержит тяжелую цепь, и тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

4. Антитело по любому из пп.1-3, в котором домен VL:

(i) по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23;

(ii) идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23.

5. Антитело п.1 или 4, которое содержит легкую цепь, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

6. Антитело по п.1, в котором домен VH по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24 и домен VL по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотной по-

следовательности SEQ ID NO: 23.

7. Антитело по п.1, в котором домен VH идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24 и домен VL идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23.

8. Антитело по п.1, которое содержит тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

9. Антитело по любому из пп.1-7, которое представляет собой:

(a) гуманизованное антитело;

(b) моноклональное антитело;

(c) химерное антитело;

(d) антитело, которое имеет константные области тяжелой цепи IgG1; или

(e) антитело, которое имеет константные области тяжелой цепи IgG1 и константные области легкой цепи каппа человека.

10. Фармацевтическая композиция для лечения системной красной волчанки, содержащая антитело по любому из пп.1-9 и фармацевтически приемлемый носитель.

11. Фармацевтическая композиция по п.10, причем системная красная волчанка связана с волчаночным нефритом.

12. Фармацевтическая композиция по п.10, причем системная красная волчанка связана с дискоидной волчанкой.

13. Фармацевтическая композиция по любому из пп.10-12, которая дополнительно содержит противомаларийный агент.

14. Фармацевтическая композиция по п.13, причем противомаларийный агент представляет собой гидроксихлорохин.

15. Способ лечения системной красной волчанки у человека, нуждающегося в лечении, который включает введение человеку эффективного количества антитела по любому из пп.1-9.

16. Способ по п.15, причем системная красная волчанка связана с волчаночным нефритом.

17. Способ по п.15, причем системная красная волчанка связана с дискоидной волчанкой.

18. Способ по любому из пп.15-17, дополнительно включающий введение противомаларийного агента.

19. Способ по п.18, где противомаларийный агент представляет собой гидроксихлорохин.

20. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая:

(i) антитело по любому из пп.1-9;

(ii) переменную область тяжелой цепи антитела по п.1 или 2;

(iii) переменную область легкой цепи антитела по п.1 или 4;

(iv) тяжелую цепь антитела по п.3; или

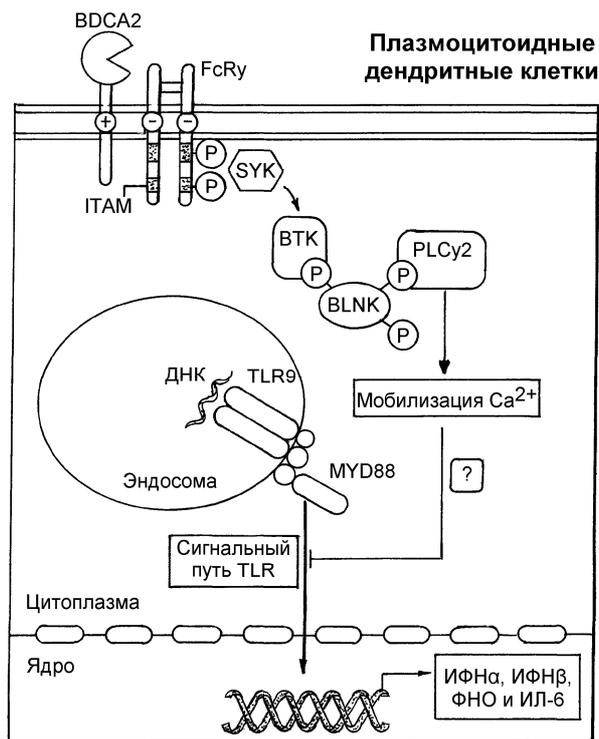
(v) легкую цепь антитела по п.8.

21. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п.20.

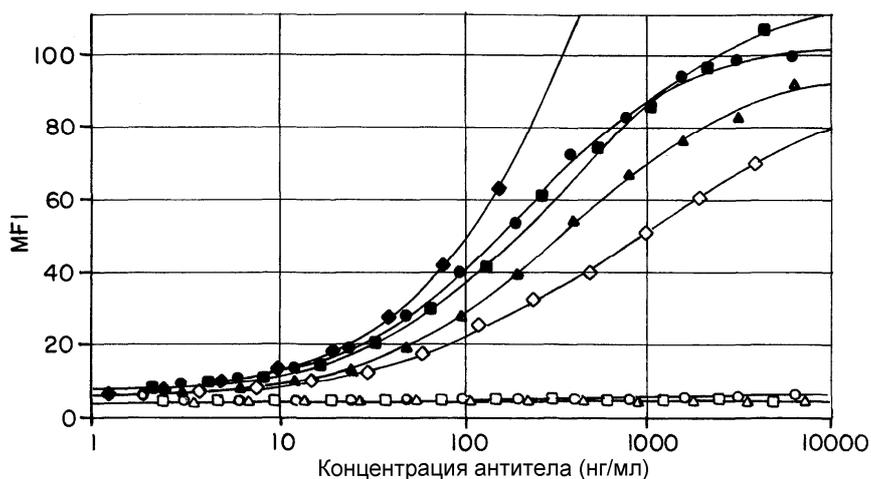
22. Выделенная клетка-хозяин, которая продуцирует антитело по любому из пп.1-9, содержащая вектор экспрессии по п.21.

23. Способ получения анти-BDCA2 антитела, включающий культивирование клетки-хозяина по п.22 для экспрессии анти-BDCA2 антитела.

24. Способ по п.23, дополнительно включающий выделение анти-BDCA2 антитела.



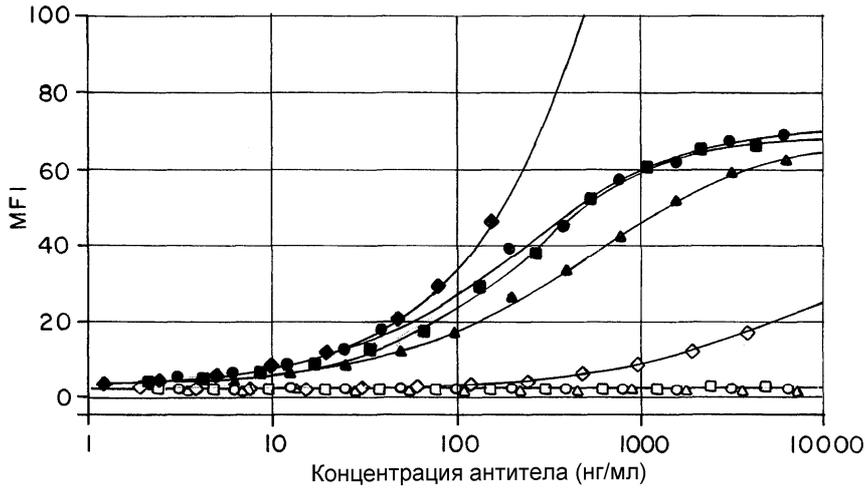
Фиг. 1



4-P FIT: $Y = (A - D)/(1 + (X/C)^B) + D$

	A	B	C	D	R ²
○ L1/N0 (y1740/y1742) (A: КОНЦЕНТРАЦИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЗНАЧЕНИЙ)	4,32	0,366	1,3E+18	2,91E+05	0,979
□ L1/N1 (y1740/y1743) (B: КОНЦЕНТРАЦИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЗНАЧЕНИЙ)	-2,08E+08	0,784	1,74E-11	4,7	0,498
△ L1/N2 (y1740/y1744) (C: КОНЦЕНТРАЦИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЗНАЧЕНИЙ)					
◇ L1/N3 (y1740/y1745) (D: КОНЦЕНТРАЦИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЗНАЧЕНИЙ)	3,85	0,622	984	97,2	0,999
● L1/N4 (y1740/y1746) (E: КОНЦЕНТРАЦИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЗНАЧЕНИЙ)	8,32	1	200	102	0,999
■ L1/N5 (y1740/y1747) (F: КОНЦЕНТРАЦИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЗНАЧЕНИЙ)	6,16	0,839	309	115	0,998
▲ L1/N6 (y1740/y1748) (G: КОНЦЕНТРАЦИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЗНАЧЕНИЙ)	5,67	0,857	359	96,6	0,999
◆ chi24F4 (y1671/y1672) (H: КОНЦЕНТРАЦИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЗНАЧЕНИЙ)	4,51	0,716	3,52E+03	599	1

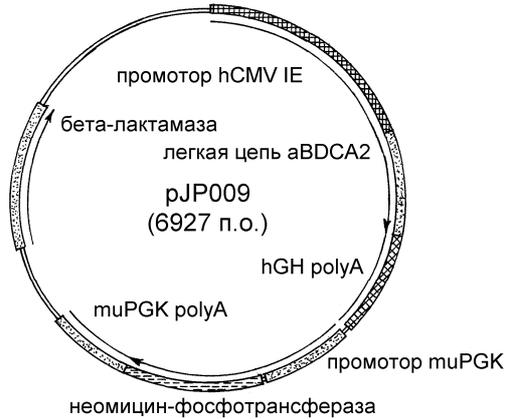
Фиг. 2



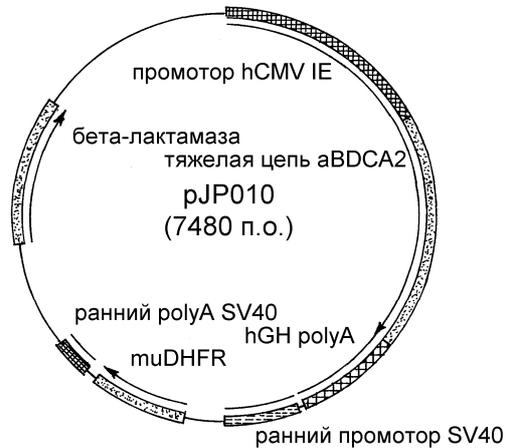
4-P FIT: $Y = (A - D)/(1 + (X/C)^B) + D$

	A	B	C	D	R ²
○ L1/H0 (y1740/y1742) (A: КОНЦЕНТРАЦИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЗНАЧЕНИЙ)	1,57	0,901	1,65E+04	2,53	0,966
□ L1/H1 (y1740/y1743) (B: КОНЦЕНТРАЦИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЗНАЧЕНИЙ)	1,58	0,777	3,38E+10	1,62E+05	0,997
△ L1/H2 (y1740/y1744) (C: КОНЦЕНТРАЦИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЗНАЧЕНИЙ)	1,59	0,776	5,32E+04	3,33	0,989
◇ L1/H3 (y1740/y1745) (D: КОНЦЕНТРАЦИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЗНАЧЕНИЙ)	1,62	0,79	7,67E+03	41,8	1
● L1/H4 (y1740/y1746) (E: КОНЦЕНТРАЦИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЗНАЧЕНИЙ)	3,13	0,874	210	71,9	0,998
■ L1/H5 (y1740/y1747) (F: КОНЦЕНТРАЦИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЗНАЧЕНИЙ)	4,01	1,09	228	68,9	0,998
▲ L1/H6 (y1740/y1748) (G: КОНЦЕНТРАЦИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЗНАЧЕНИЙ)	2,43	0,789	501	70,7	0,999
◆ chi24F4 (y1671/y1672) (H: КОНЦЕНТРАЦИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЗНАЧЕНИЙ)	2,08	0,737	2E+05	8,51E+03	1

Фиг. 3

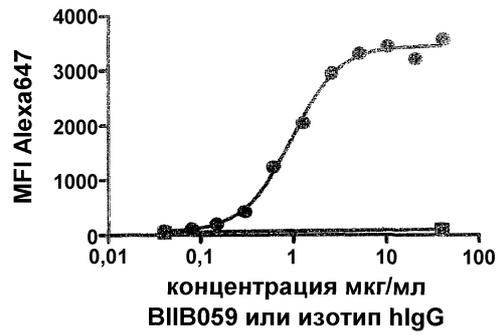


Фиг. 4



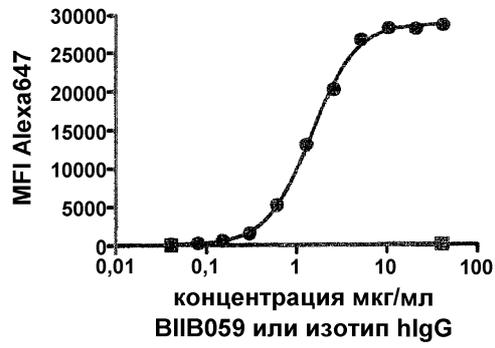
Фиг. 5

цельная кровь обезьян цинолмугус
 ВІІВ059 ЕС50=0,9442 мкг/мл

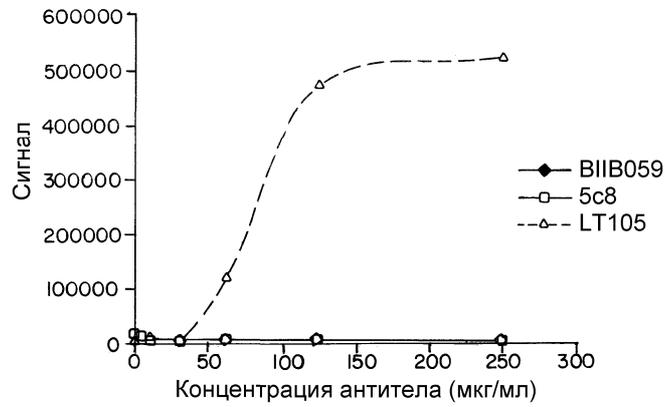


Фиг. 6А

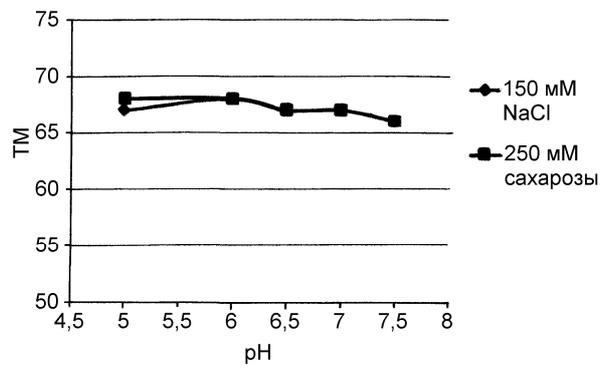
цельная кровь человека
 ВІІВ059 ЕС50=1,437 мкг/мл



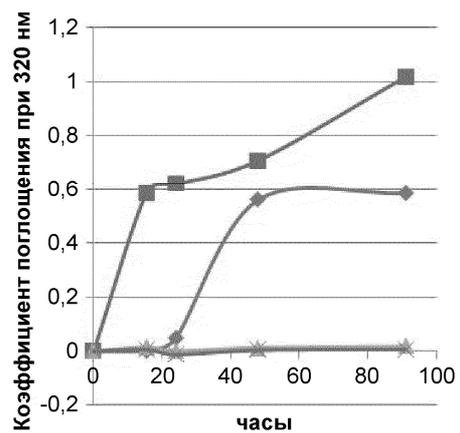
Фиг. 6В



Фиг. 7

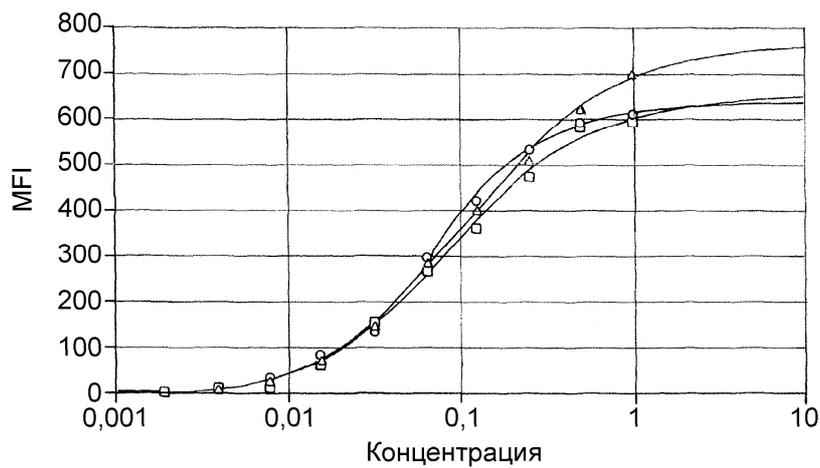


Фиг. 8



- ◆ В11В059 дикого типа IgG1
- В11В059 агликозилированное IgG4/IgG1
- ▲ В11В059 дикого типа IgG1 + Твин-80
- × В11В059 агликозилированное IgG4/IgG1 + Твин-80

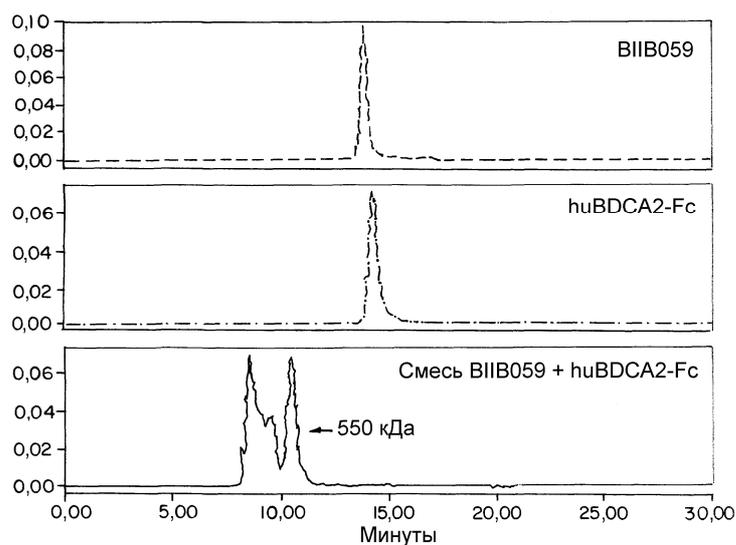
Фиг. 9



$$4\text{-P FIT: } Y = (A - D) / (1 + (X/C)^B) + D$$

	A	B	C	D	R ²
○ E73 (E73 В ЭКСПЕРИМЕНТЕ № 1: КОНЦЕНТРАЦИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЗНАЧЕНИЙ)	3,363	1,363	0,073	630,796	0,999
□ K73 (K73 В ЭКСПЕРИМЕНТЕ № 1: КОНЦЕНТРАЦИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЗНАЧЕНИЙ)	-4,155	1,105	0,091	640,607	0,996
△ ЧЕЛОВЕЧЕСКИЙ (ЧЕЛОВЕЧЕСКИЙ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ № 1: КОНЦЕНТРАЦИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЗНАЧЕНИЙ)	-5,044	1,058	0,114	757,368	0,998

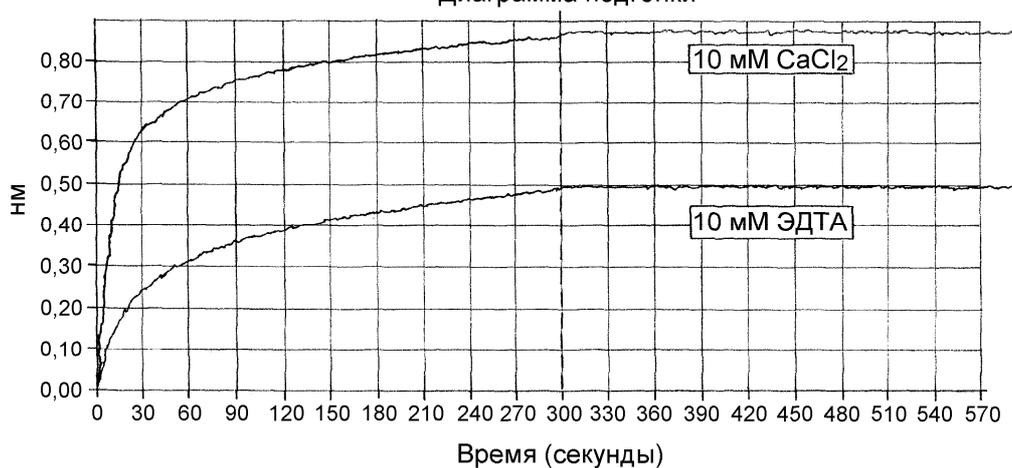
Фиг. 10



- - - 1 hu24F4A ЕДИНСТВЕННЫЙ: ДАННЫЕ ПОЛУЧЕНЫ 5/17/2012 В 9:48:59 AM EDT
 - · - 3 huBDCA2Fc ЕДИНСТВЕННЫЙ: ДАННЫЕ ПОЛУЧЕНЫ 5/17/2012 В 10:57:16 AM EDT
 — 11 hu24F4A + huBDCA2Fc: ДАННЫЕ ПОЛУЧЕНЫ 5/17/2012 В 1:13:54 AM EDT

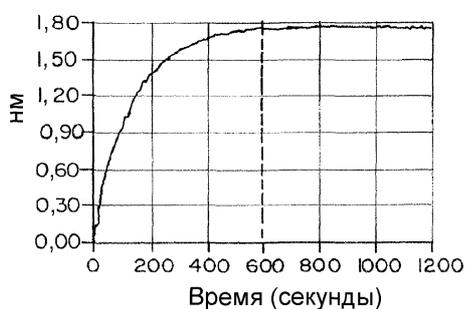
Фиг. 11

Диаграмма подгонки



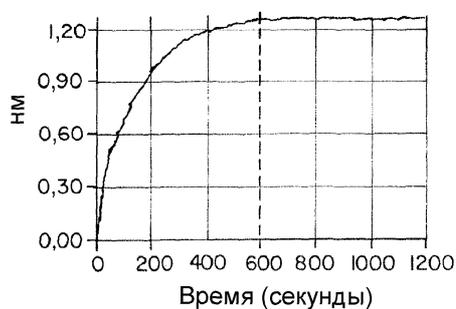
Фиг. 12

Расположение датчика: В12 -
по локализации ассоциированного (образца)



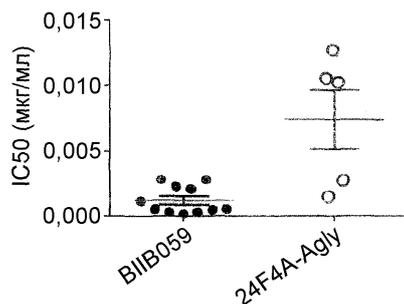
Человеческий BDCA2 ECD — В4

Расположение датчика: С12 -
по локализации ассоциированного (образца)



BDCA2 ECD обезьяны циномоглус — С4

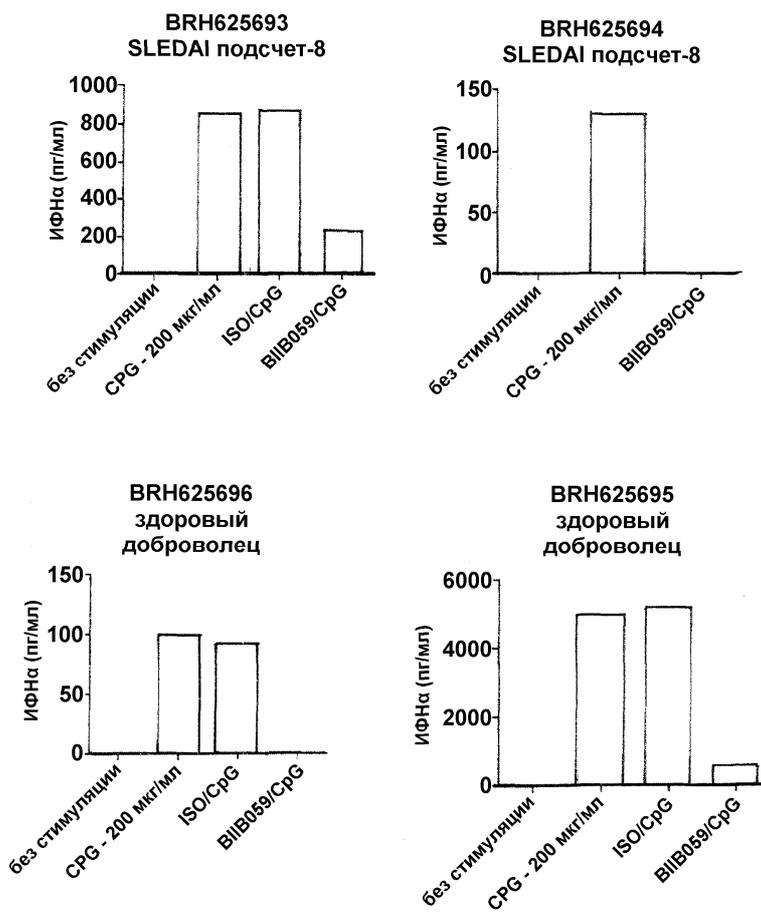
Фиг. 13



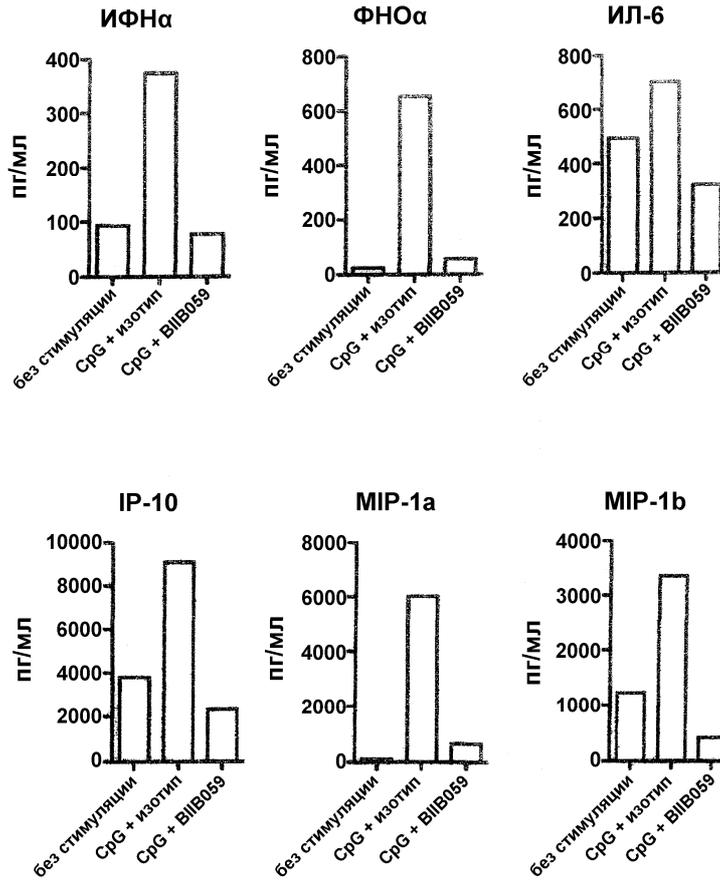
Фиг. 14



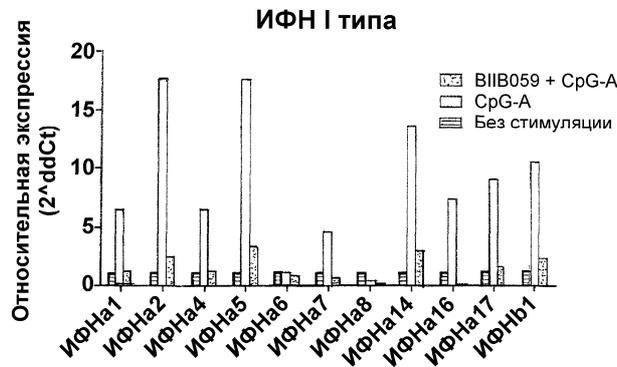
Фиг. 15A



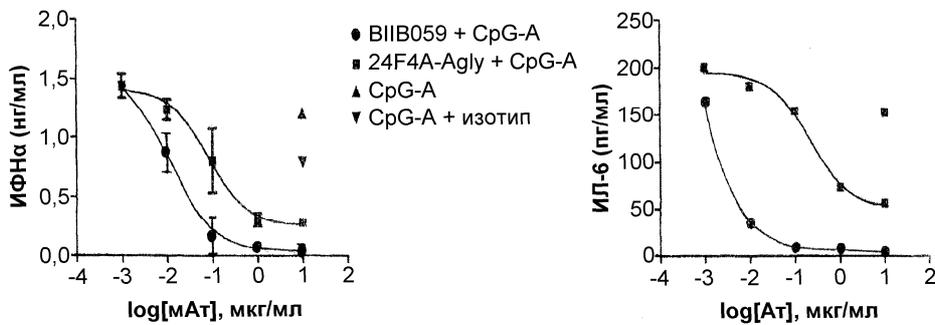
Фиг. 15B



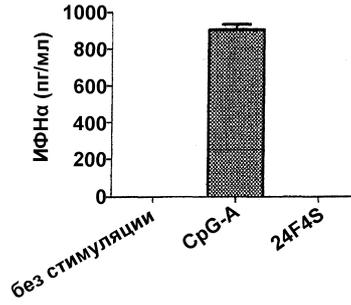
Фиг. 15С



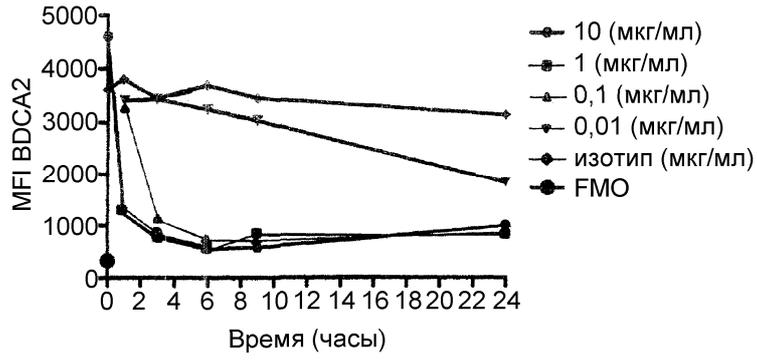
Фиг. 16



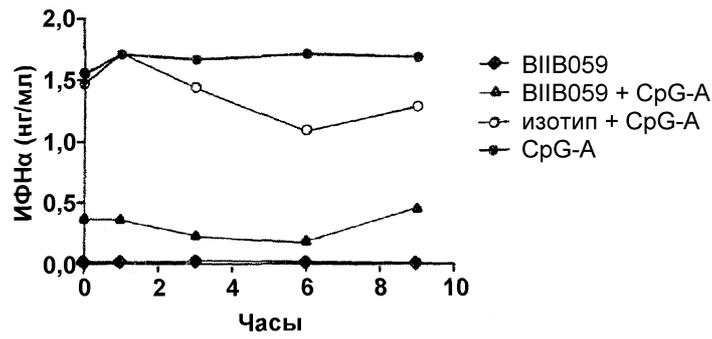
Фиг. 17



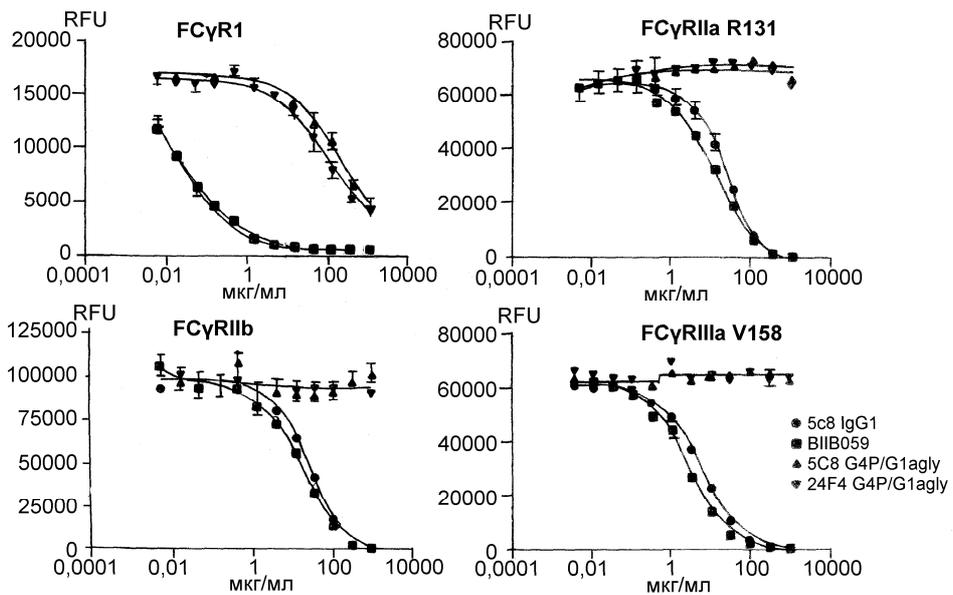
Фиг. 18



Фиг. 19А

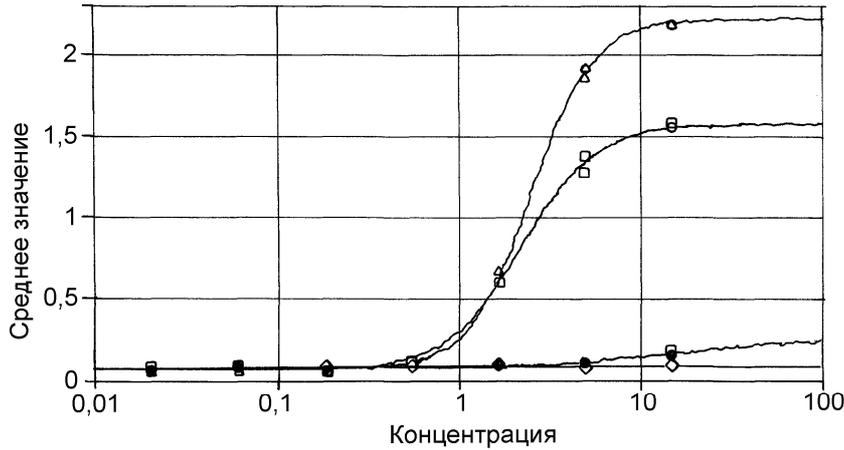


Фиг. 19В



Фиг. 20

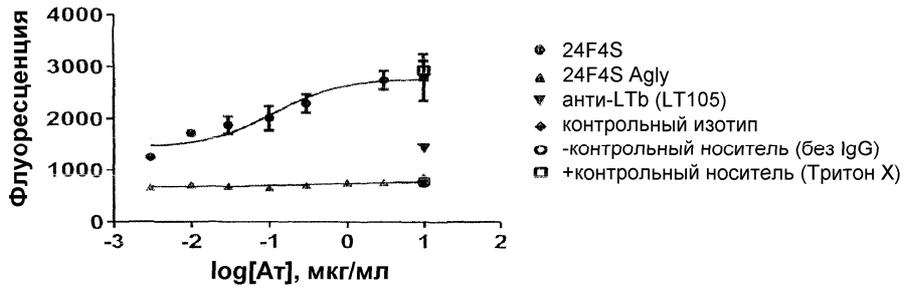
C1q ELISA BII059 и 24F4A G4.P/G1 agly (контроль 5с8)



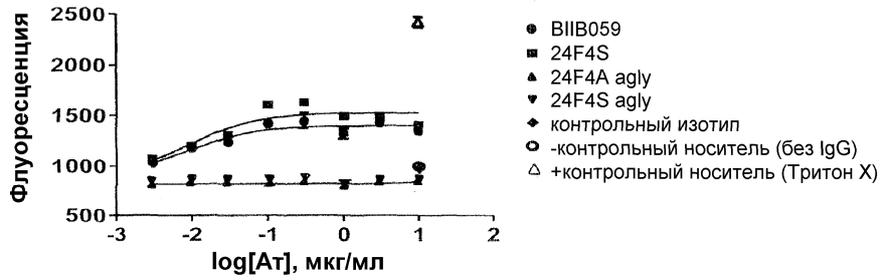
$Y = (A - D) / (1 + (X/C)^B) + D$

	A	B	C	D	R ²
○ STD (СТАНДАРТЫ: КОНЦЕНТРАЦИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СРЕДНЕГО ЗНАЧЕНИЯ)	*** НЕТ ДОСТУПНЫХ ДАННЫХ ***				
□ ГРАФИК № 1 (5с8 G1 ДИКОГО ТИПА: КОНЦЕНТРАЦИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЗНАЧЕНИЙ)	0,06	2,093	2,215	1,573	0,997
△ ГРАФИК № 2 (BII059 G1 ДИКОГО ТИПА: КОНЦЕНТРАЦИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЗНАЧЕНИЙ)	0,061	2,527	2,502	2,212	1
◇ ГРАФИК № 3 (5с8 G4.P/G1 AGLY: КОНЦЕНТРАЦИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЗНАЧЕНИЙ)	0,06	41,873	0,062	0,09	0,735
● ГРАФИК № 4 (24F4A G4.P/G1 AGLY: КОНЦЕНТРАЦИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЗНАЧЕНИЙ)	0,067	0,974	17,136	0,277	0,9

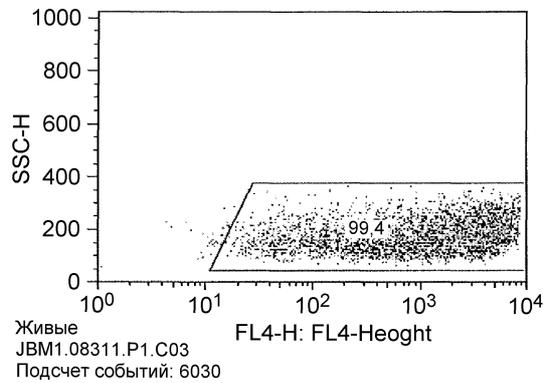
Фиг. 21



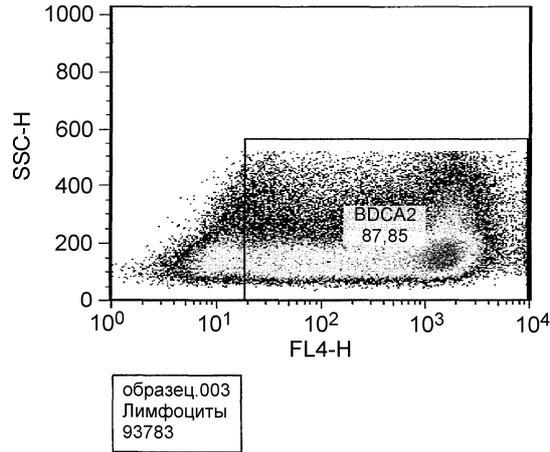
Фиг. 22А



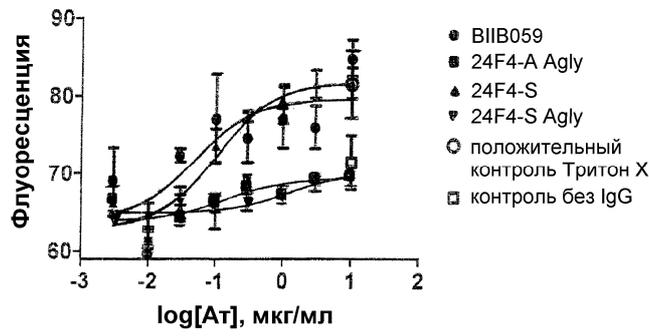
Фиг. 22В



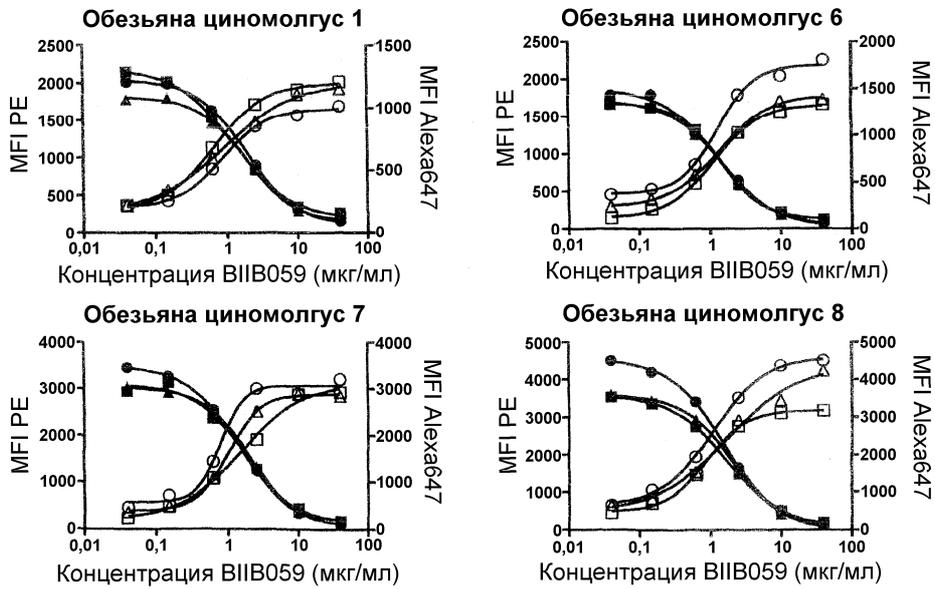
Фиг. 22С



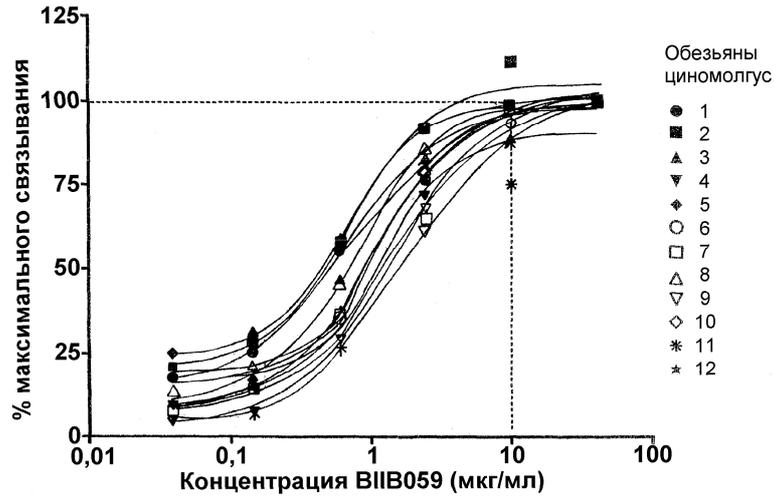
Фиг. 22D



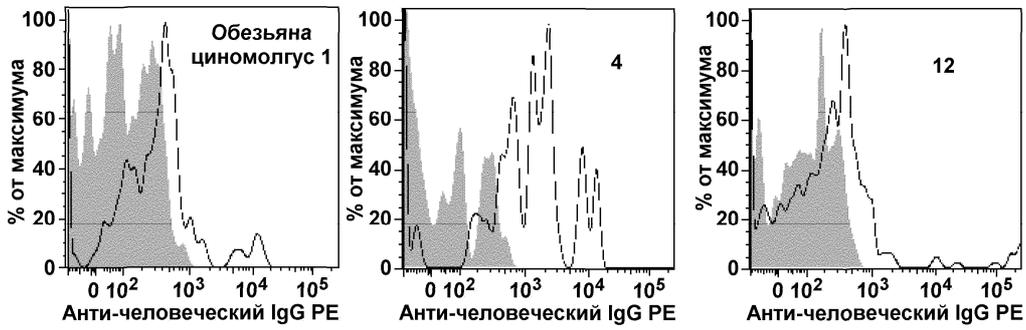
Фиг. 23



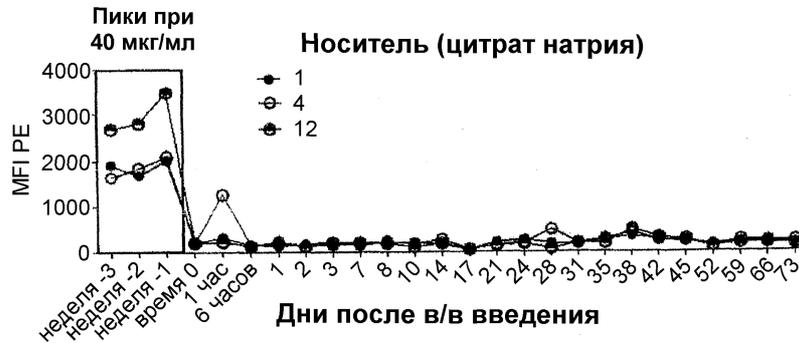
Фиг. 24



Фиг. 25



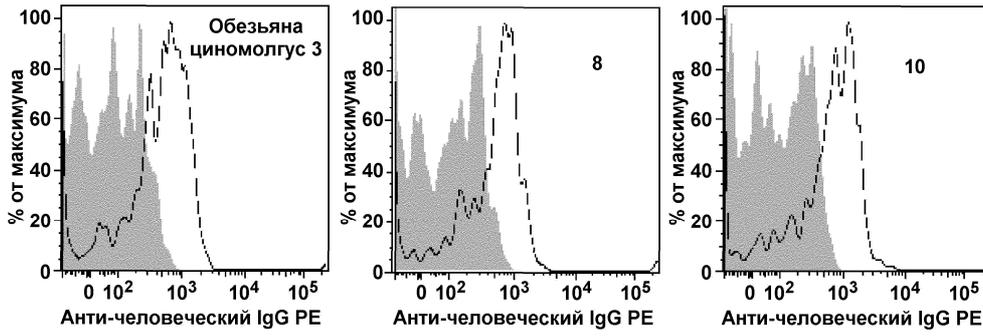
Фиг. 26А



Фиг. 26В



Фиг. 26С



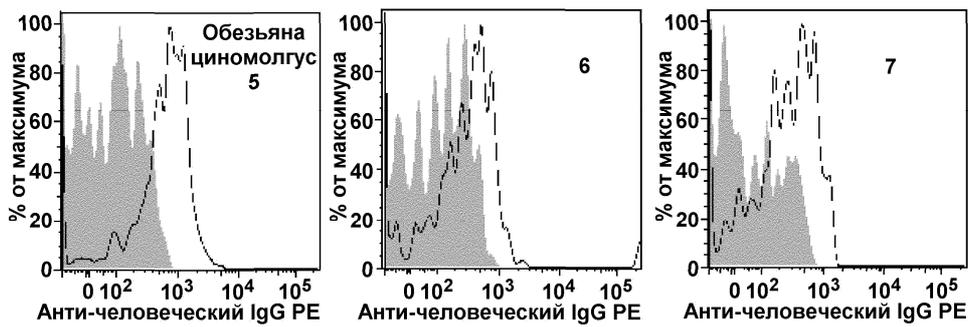
Фиг. 27А



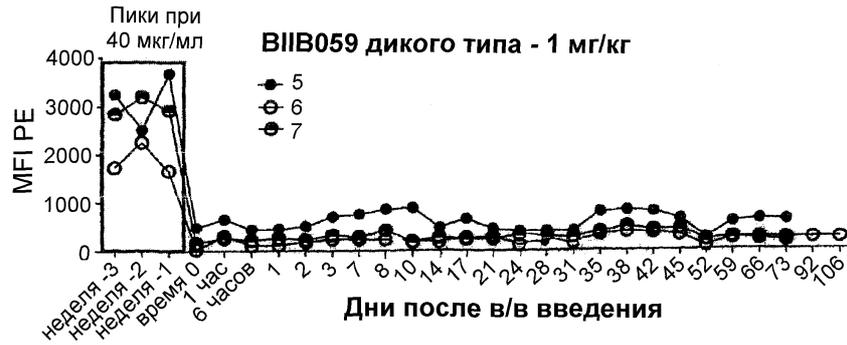
Фиг. 27В



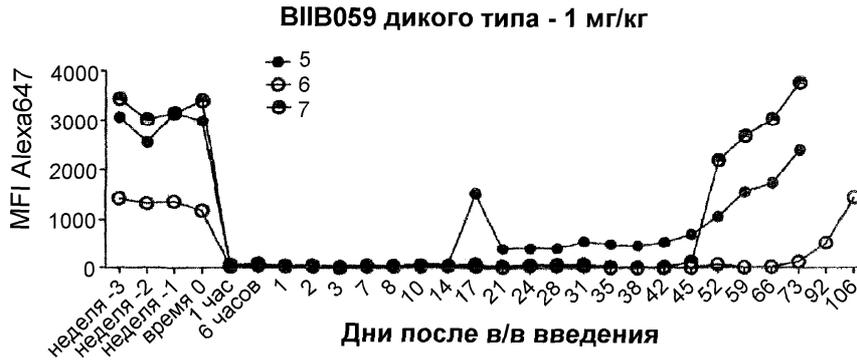
Фиг. 27С



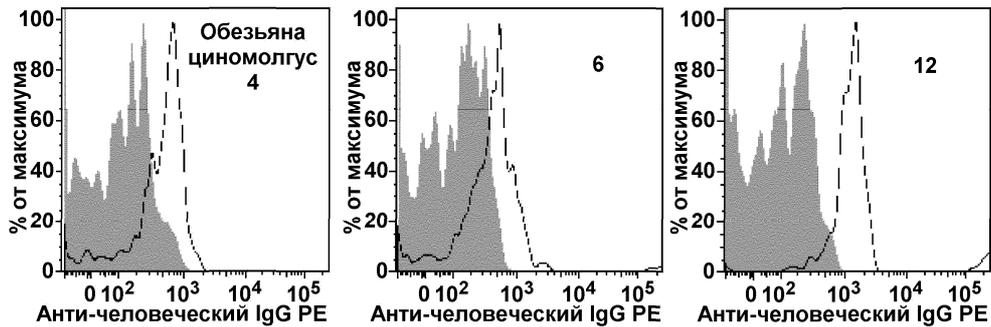
Фиг. 28А



Фиг. 28В



Фиг. 28С



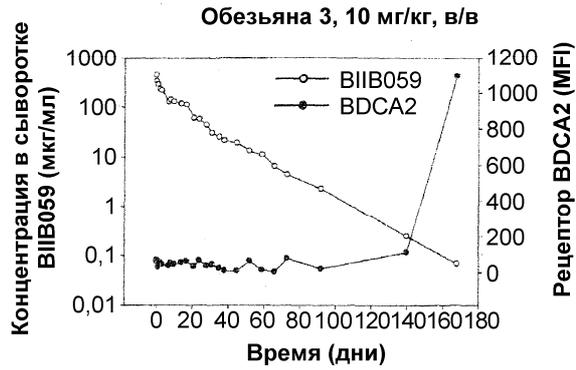
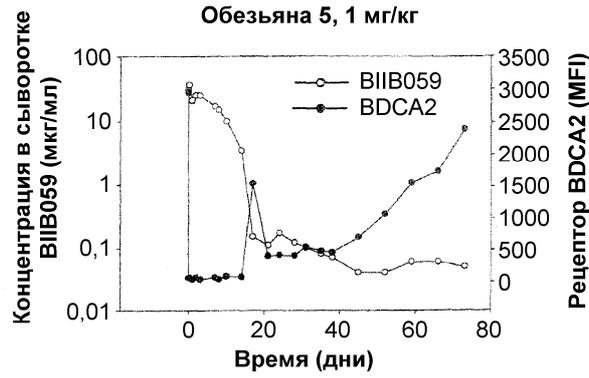
Фиг. 29А



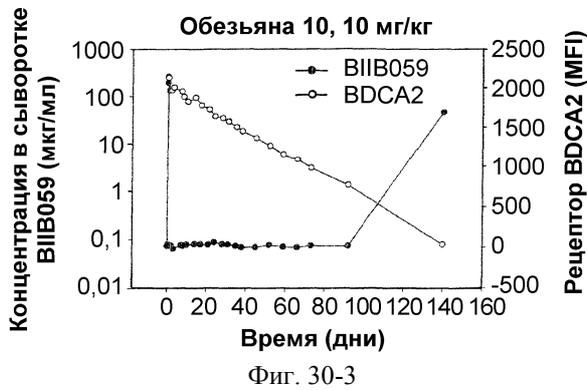
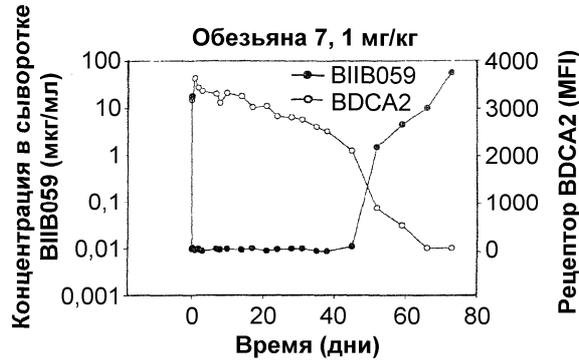
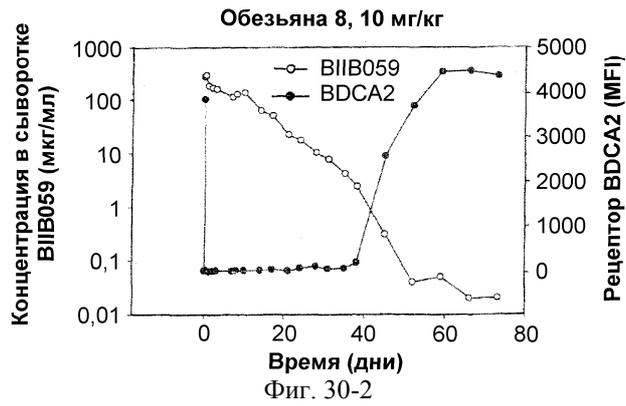
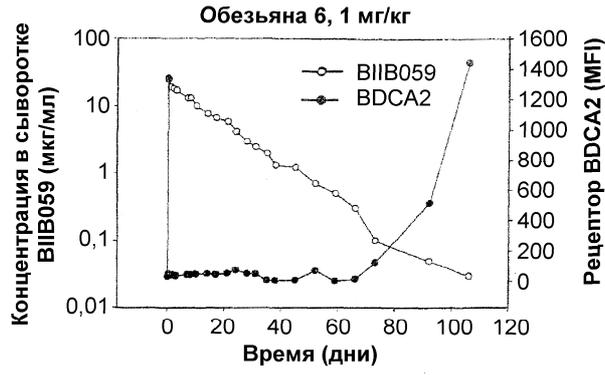
Фиг. 29В

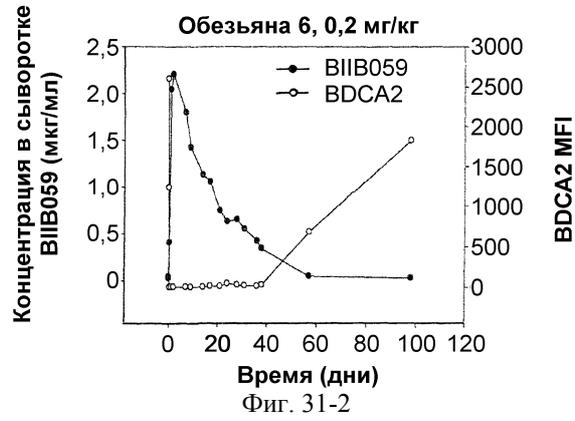
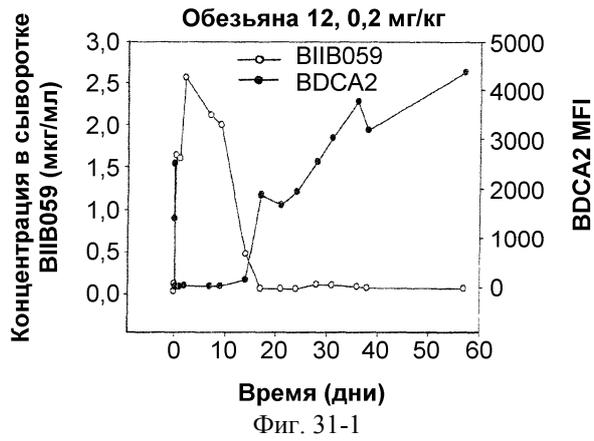
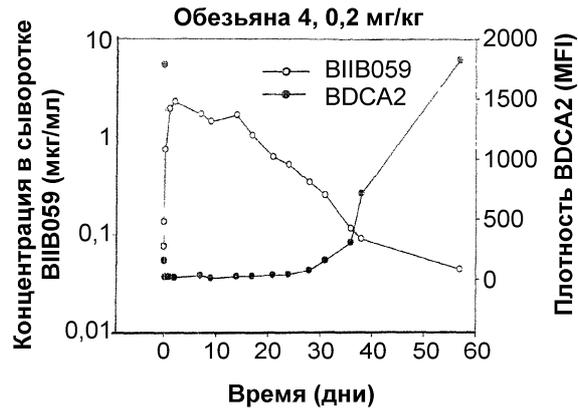


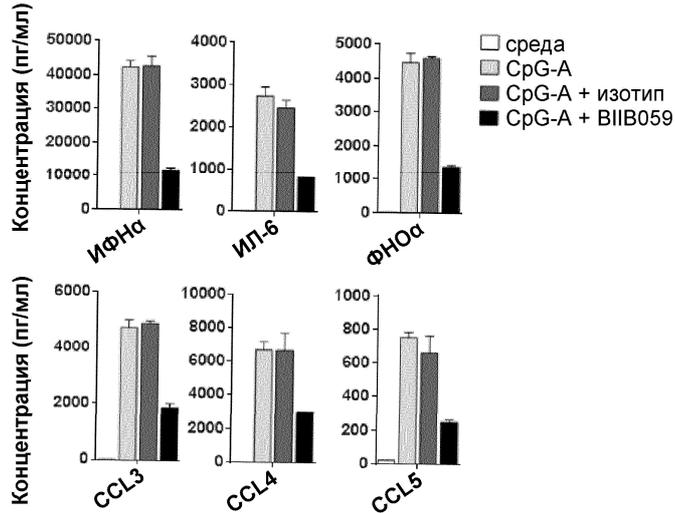
Фиг. 29С



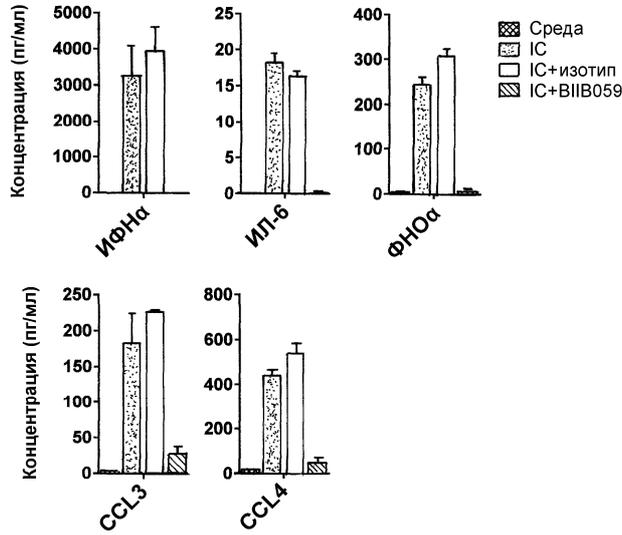
Фиг. 30-1



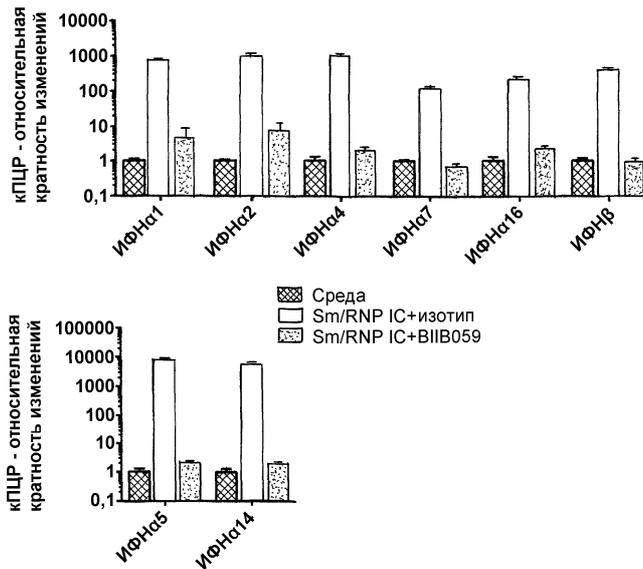




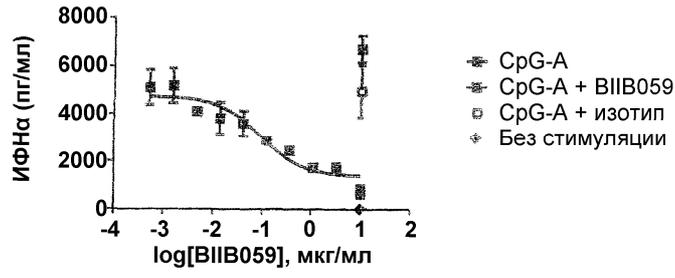
Фиг. 32



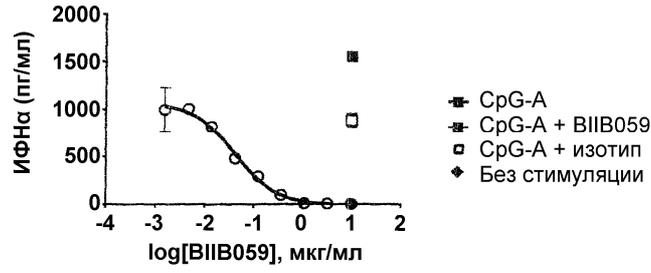
Фиг. 33



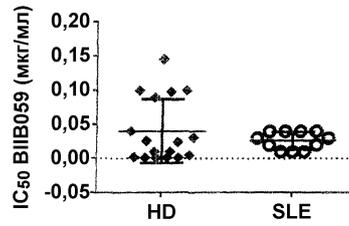
Фиг. 34



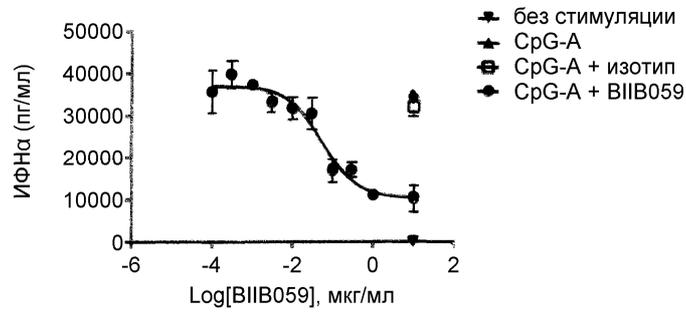
Фиг. 35А



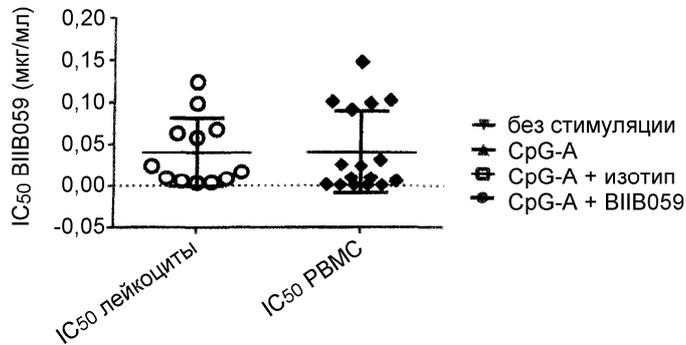
Фиг. 35В



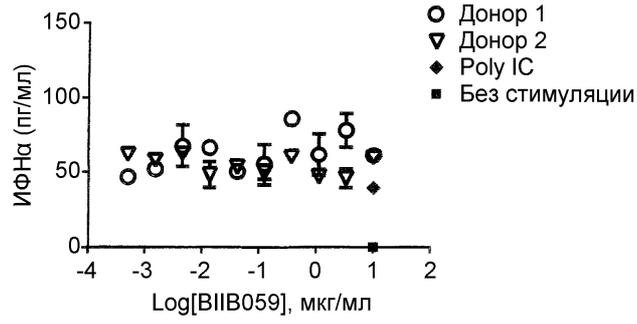
Фиг. 35С



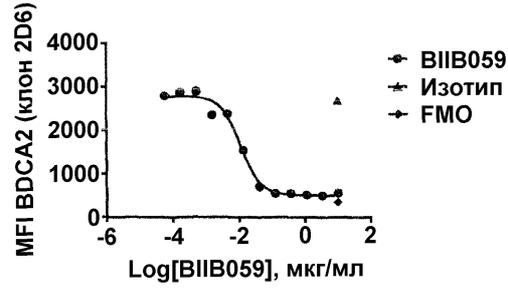
Фиг. 36А



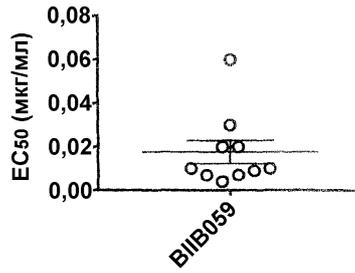
Фиг. 36В



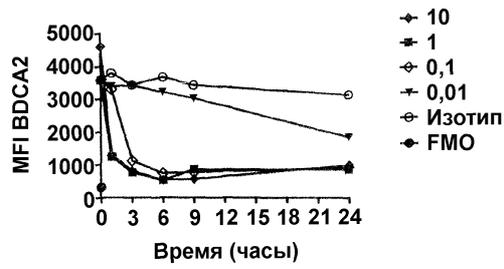
Фиг. 37



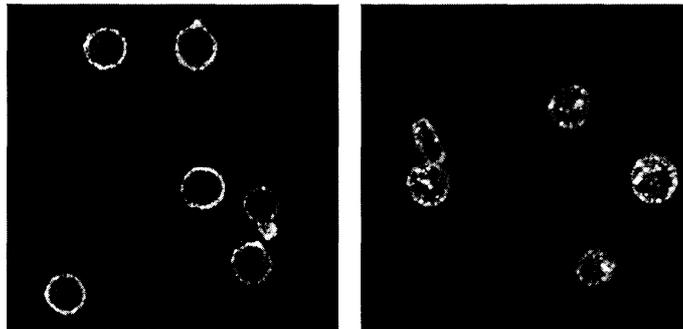
Фиг. 38А



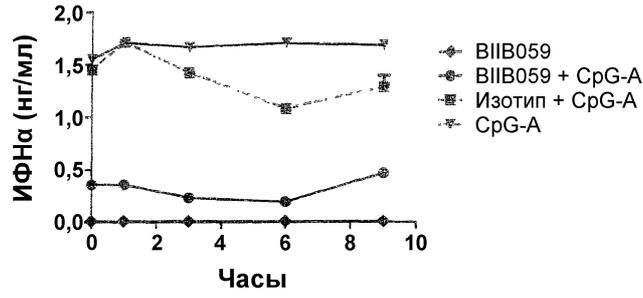
Фиг. 38В



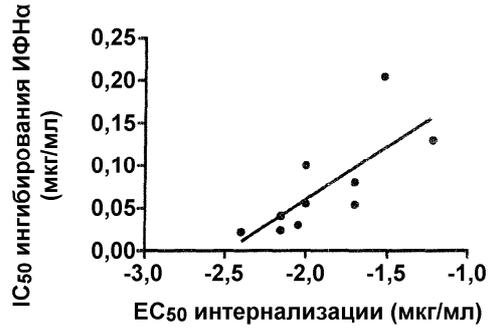
Фиг. 39



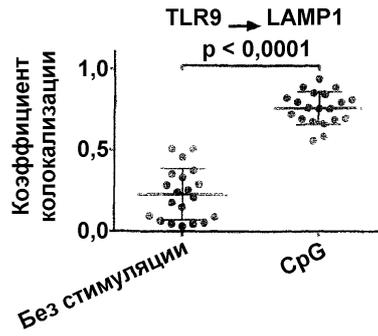
Фиг. 40



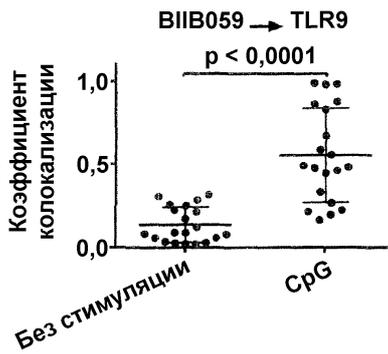
Фиг. 41



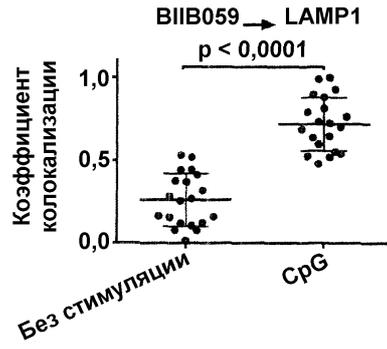
Фиг. 42



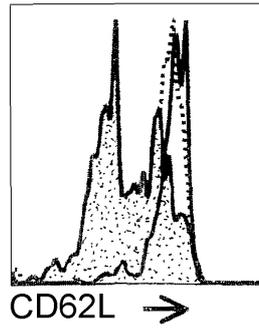
Фиг. 43А



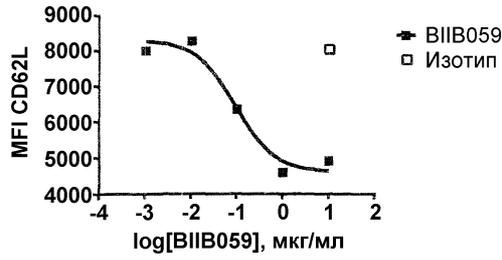
Фиг. 43В



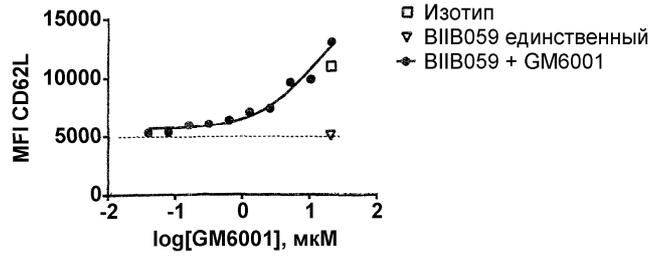
Фиг. 43С



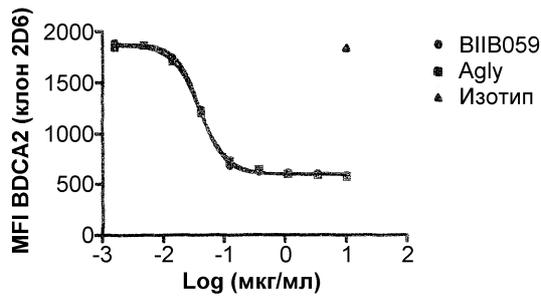
Фиг. 44А



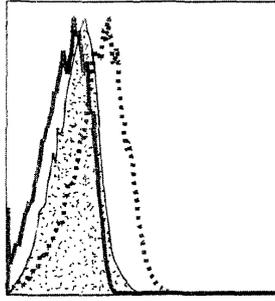
Фиг. 44В



Фиг. 45



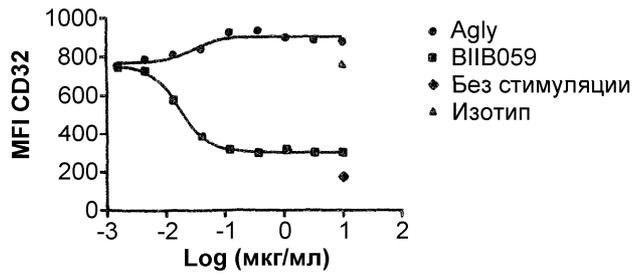
Фиг. 46А



Фиг. 46В



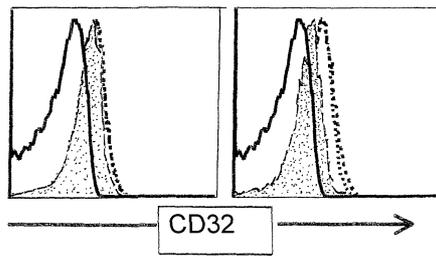
Фиг. 46С



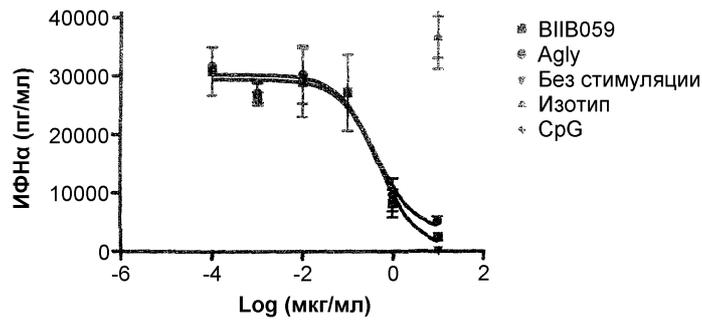
Фиг. 46D

Е

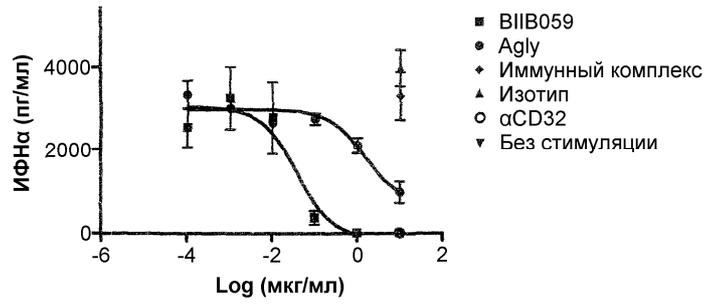
Ф



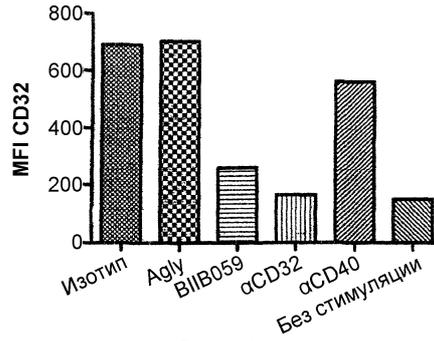
Фиг. 46Е, F



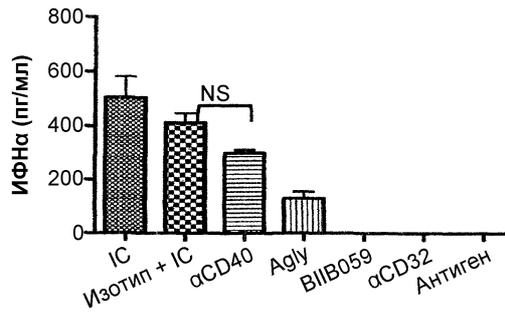
Фиг. 47А



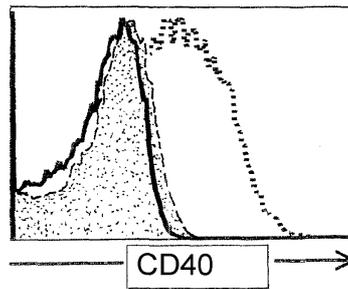
Фиг. 47В



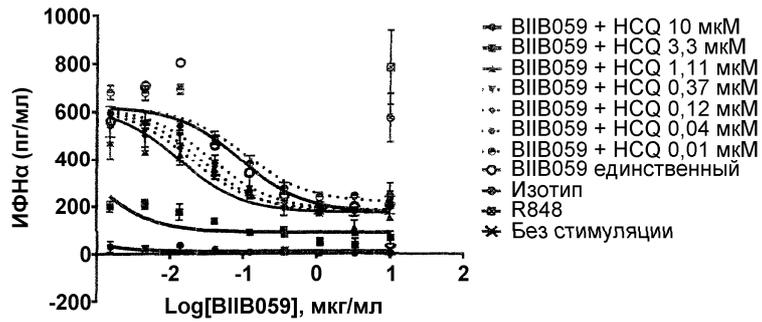
Фиг. 48А



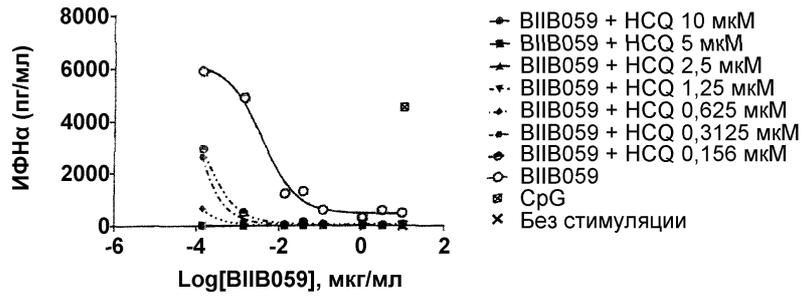
Фиг. 48В



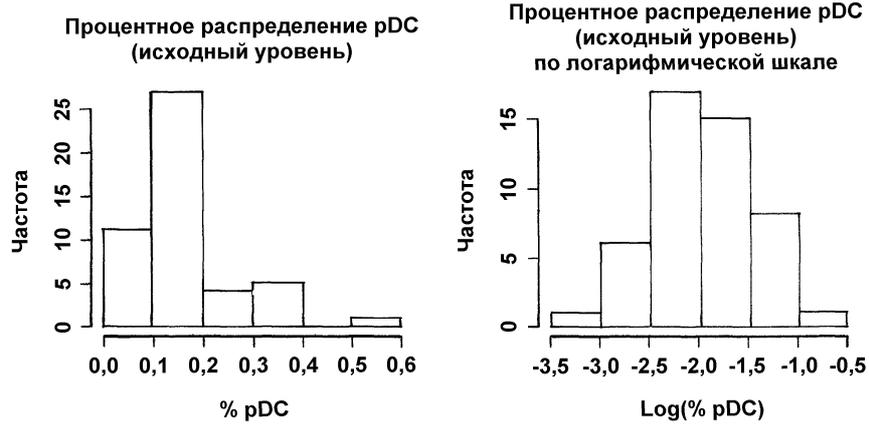
Фиг. 48С



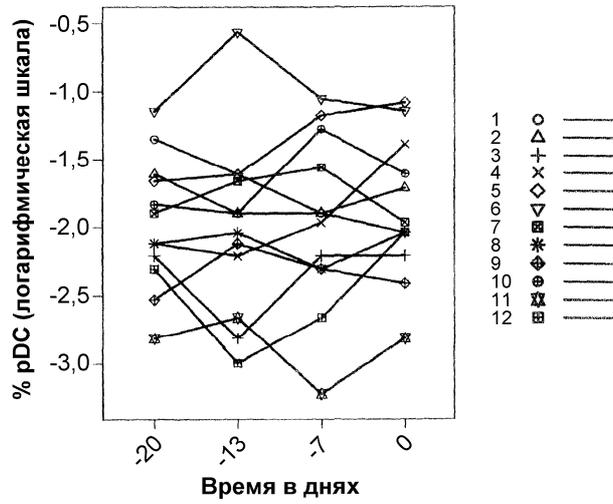
Фиг. 49



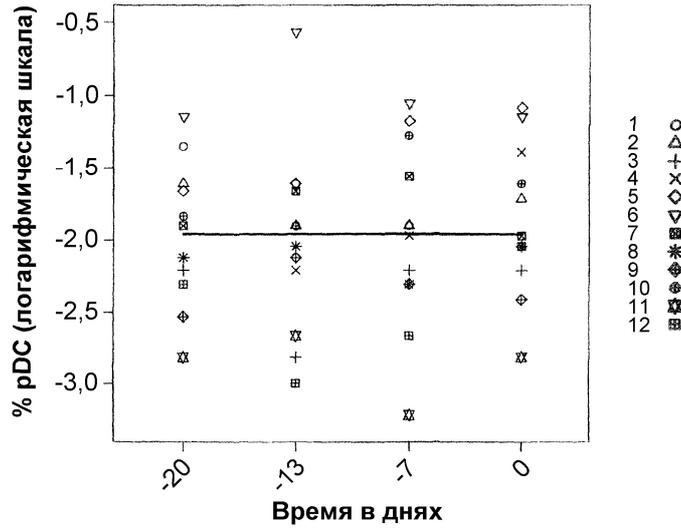
Фиг. 50



Фиг. 51



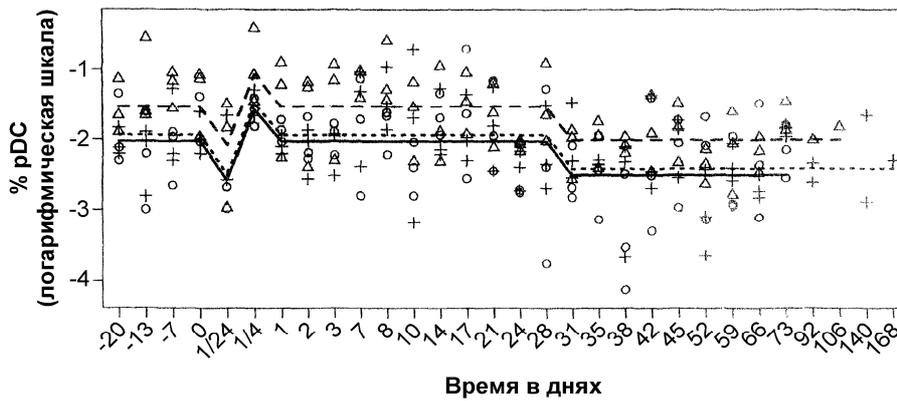
Фиг. 52



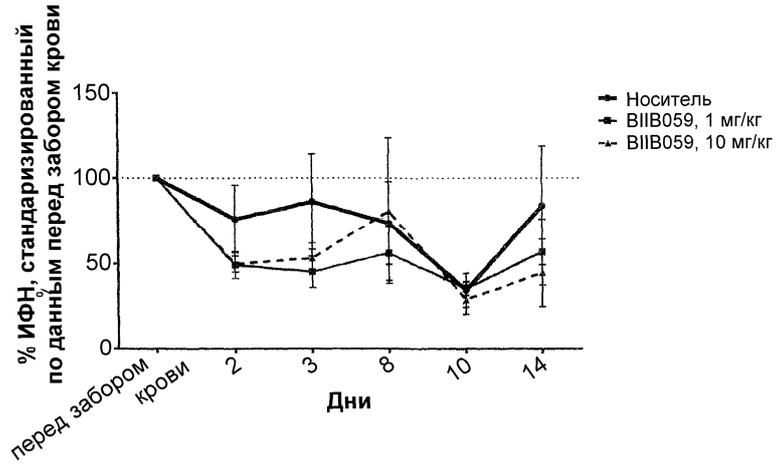
Фиг. 53



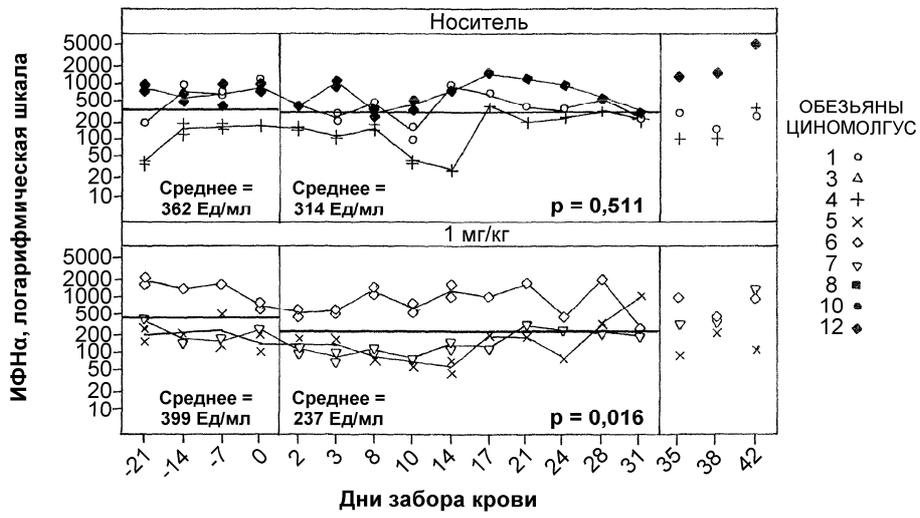
Фиг. 54



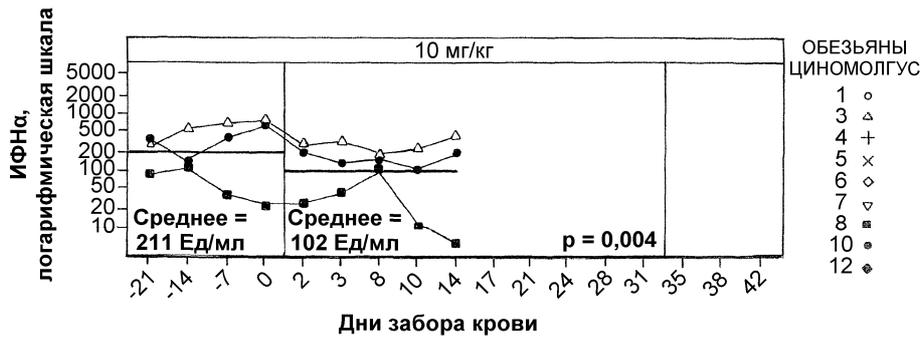
Фиг. 55



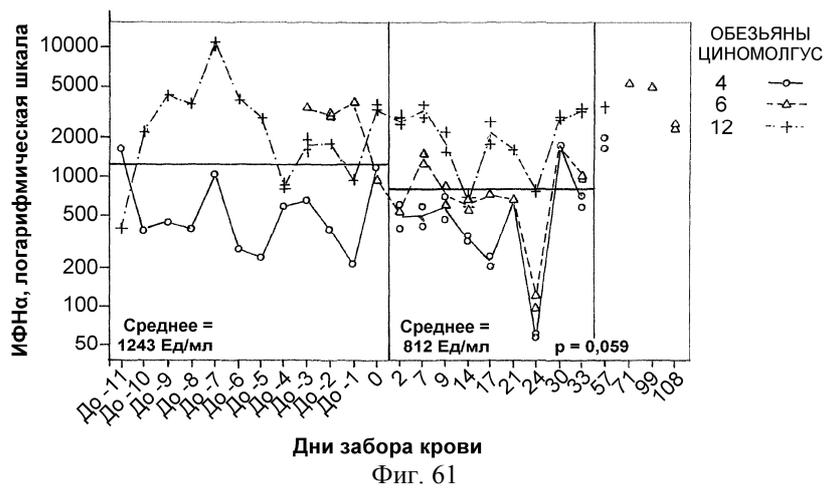
Фиг. 59



Фиг. 60-1



Фиг. 60-2



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2